



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS INTERLEUCINA-12, INTERFERON- γ ,
INTERLEUCINA-4 E INTERLEUCINA-10 E INVESTIGAÇÃO DE
POLIMORFISMOS NOS GENES DO INF- γ (IFNG+874) E DA IL-10 (IL10-1082) NA
MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

TIAGO DA SILVA MEDINA

Belém-Pará

2009

TIAGO DA SILVA MEDINA

**PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS INTERLEUCINA-12, INTERFERON- γ ,
INTERLEUCINA-4 E INTERLEUCINA-10 E INVESTIGAÇÃO DE
POLIMORFISMOS NOS GENES DO INF- γ (IFNG+874) E DA IL-10 (IL10-1082) NA
MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha.

Belém-Pará

2009

TIAGO DA SILVA MEDINA

**PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS INTERLEUCINA-12, INTERFERON- γ ,
INTERLEUCINA-4 E INTERLEUCINA-10 E INVESTIGAÇÃO DE
POLIMORFISMOS NOS GENES DO INF- γ (IFNG+874) E DA IL-10 (IL10-1082) NA
MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Profa. Dra. Marinete Marins Póvoa
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. João Santana da Silva
Depto. de Bioquímica e Imunologia, Ribeirão Preto/USP

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 05 de outubro de 2009.

DEDICATÓRIA

“À minha mãe, Juliana Medina, principal responsável pela formação do meu caráter e do meu saber. O teu nome, mãe, escrito no braço da minha alma persiste como uma estrela nas horas intermináveis.”

“Aos meus irmãos, Gabriel e Túlio, que, apesar das brigas homéricas, sempre estiveram ao meu lado no trem vida.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), instituições que fomentaram este projeto.

À Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha, pela valiosa contribuição durante a minha formação acadêmica e por ter aceitado me orientar durante esta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto, por ter aberto as portas do Laboratório de Virologia para que eu fizesse a caracterização dos polimorfismos IFNG+874 e IL10-1082. Obrigado também por ser sempre prestativo, por confiar em mim e por me auxiliar durante a minha passagem pelo Laboratório de Virologia.

Agradeço também a Sheyla Patrícia Costa, Deise Ohnishi e Cléber Cruz, por me ajudarem na coleta das amostras utilizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. José Maria de Souza e à Profa. Dra. Ana Ventura, por viabilizarem meu estágio no Instituto Evandro Chagas, onde realizei treinamento sobre diagnóstico de malária e fiz as coletas das amostras dos indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*.

Agradeço a todos que aceitaram participar deste estudo. A realização deste estudo somente foi possível graças à valiosa contribuição de vocês.

Aos técnicos do Instituto Evandro Chagas, que me acolheram com todo carinho no Laboratório de Malária e me auxiliaram na leitura das lâminas, na identificação da espécie de *Plasmodium* e na contagem da densidade parasitária. Agradeço a Darci, Vitorino, Sônia, Mírian, Agostinho, Benedito, Lobo, Sônia e Reinaldo.

A Felipe Bonfim Freitas, pela valorosa ajuda na caracterização dos polimorfismos e por me guiar durante os primeiros dias no Laboratório de Virologia.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia: Eliane Silva e Silva, Sheyla Patrícia Costa, Ana Karissa Anaissi, Leide Mariana Pureza, Diego Reymão Moreira, Inaê Santiago, Tássia Furo, Tiago Sabóia, Cassiana Freitas, Mylner Fermiano, Amanda, Rodrigo, Raquel Bouth, Daniela Mayumi, Edcira Pereira, Luciano Franco e Alisson da Silva.

A todos os professores e alunos que integram o Laboratório de Virologia: Prof. Dr. Ricardo Ishak, Prof. Dr. Antonio Carlos Vallinoto, Prof. Dr. Luiz Fernando Machado, Prof. Dr. Sandro Percário, Profa. Rosimar, Profa. Vânia Nakuth, Profa. Simone Conde, Felipe Freitas, Ethienne Santos, Lucimar Di Paula, Andréa Luciana, Elizabeth Pires, Iran Barros Costa, Renata Hermes, Núbia Caroline de Almeida, Jaqueline Cortinhas, Roberta, Ana Cássia, Rafaela Resplande, Leonardo Siravenha, Lúcio Flávio Demétrio, Danilo Moreira, Tany, Bárbara Brasil, Larissa Freitas, Juliana, Alexandre, Luana Viégas, Samara, Isabella, Maria Helena, Irlis, Sandra, Priscila, Glenda e Érica. Agradeço, em

especial, àqueles que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: Felipe Freitas, Bárbara Brasil e Rafaela Resplande.

Indubitavelmente, aos meus pais, Juliana Medina e Pécisio Lucas Medina Olher, pelo amor, carinho e companheirismo devotados a mim. Aos meus irmãos Gabriel e Túlio Medina, às minhas avós Beatriz Biavatti e Ramona Medina Olher, à minha bisavó Inês Brandalizzi Biavatti – que, com 99 anos, continua mais viva do que nunca -, à minha querida tia Sônia Hütner e seus rebentos Daniel e Marielle Hütner, a todos os Pijak, ao meu querido avô Aristides da Silva, ao meu tio Pedro Medina e aos meus primos Melina e Leonardo Medina.

Agradeço, em especial, a Rafaela Bordalo, que talvez tenha sido a pessoa que melhor me entendeu nesse período da minha vida. Obrigado pelos conselhos, pelo apoio, pelo carinho, por ouvir os meus desabaços, por suportar o meu estresse e minhas angústias, por me alegrar, me fazer sorrir e não me deixar desistir.

A todos da turma de Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (2007), em especial Cândida, Davi, Roberta, Iran, Renata, Núbia Caroline, Jaqueline, Rubenilson, Maíra, Adriana, Fabíola, Joyce, Joana, Marluce e Talita.

Agradeço aos professores da Universidade Federal do Pará, pelos ensinamentos, conselhos e dicas.

Agradeço às professoras Antônia Vieira e Karla Ribeiro, por sempre me apoiarem durante a minha passagem pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

A todos da Biomedicina 2003, em especial Marcio Nahum, Diego Reymão, Igor Brasil Costa, Iran Barros Costa, Carlos Eduardo Amaral, Clebson Pantoja, verdadeiros amigos que levarei para a vida toda.

Agradeço à biomédica Dayse Alencar, pelo apoio fornecido durante esse período.

Ao Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (Fundação HEMOPA), por permitir a coleta das amostras utilizadas como grupo controle neste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.2 HISTÓRICO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA MALÁRIA	16
1.3 RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA	20
1.4 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA	26
1.4.1 Resposta imune celular	26
1.4.2 Participação das citocinas Interleucina-12, Interferon-γ, Interleucina-4 e Interleucina-10 na malária	31
1.4.3 Participação das citocinas na malária causada por <i>Plasmodium vivax</i>	36
1.5 POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IFN- γ	39
1.6 POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IL-10	41
1.7 OBJETIVOS	46
1.7.1 Objetivo geral	46
1.7.2 Objetivos específicos	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	47
2.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA.....	48
2.3 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO	

SÉRICA DAS CITOCINAS.....	49
2.4 OBTENÇÃO DO DNA	50
2.5 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO IFNG+874	51
2.6 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO IL10-1082	53
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
3 RESULTADOS	55
3.1 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-12 NA RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA CAUSADA POR <i>P. vivax</i>	55
3.2 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ e IL-10 NO CONTROLE DA DENSIDADE PARASITÁRIA NA MALÁRIA CAUSADA POR <i>P. vivax</i>	57
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉVIA À MALÁRIA CAUSADA POR <i>P. vivax</i> NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS CITOCINAS IFN- γ e IL-10	60
3.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICA E GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS IFN- γ (IFNG+874) E IL-10 (IL10-1082)	62
3.5 INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IFNG+874 NOS NÍVEIS SÉRICOS DE IFN- γ E NA DENSIDADE PARASITÁRIA	66
3.6 INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IL10-1082 NOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-10 E NA DENSIDADE PARASITÁRIA.....	68
3.7 A ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS (IFNG+874/IL10-1082) NÃO INFLUENCIA NO CONTROLE DA DENSIDADE PARASITÁRIA	70
4 DISCUSSÃO	74

5 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	113

RESUMO

A resposta imune na malária é complexa, e os mecanismos de ativação e regulação de linfócitos T efetores e de memória ainda são pouco compreendidos. No presente estudo, determinamos a concentração das citocinas Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-12 (IL-12) no soro de indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*, investigamos os polimorfismos no gene do IFN- γ (IFNG+874) e da IL-10 (IL10-1082) e analisamos a associação destes polimorfismos com a concentração das citocinas e com a densidade parasitária. A concentração das citocinas foi determinada por ELISA, e a genotipagem dos polimorfismos IFNG+874 e IL10-1082 foi realizada pelas técnicas de ASO-PCR e PCR-RFLP, respectivamente. Os indivíduos infectados apresentaram níveis séricos de IFN- γ e IL-10 aumentados. A produção de IFN- γ foi maior nos indivíduos primoinfectados, porém não foi associada com a redução da parasitemia. A produção de IL-10 foi alta e associada com altas parasitemias. As citocinas IL-4 e IL-12 não foram detectadas. As frequências dos genótipos homozigoto mutante AA, heterozigoto AT e selvagem TT do gene do IFN- γ foram 0,51, 0,39 e 0,10, respectivamente. As frequências dos genótipos homozigoto mutante AA, heterozigoto AG e selvagem GG para IL10 foram 0,49, 0,43 e 0,08, respectivamente. Apenas o polimorfismo do IFN- γ foi associado com níveis reduzidos desta citocina. Na malária causada por *P. vivax*, houve produção de citocina que caracteriza o perfil Th1 (IFN- γ), com possível participação da IL-10 na imunorregulação.

ABSTRACT

The malaria immune response is complex, and the activation and regulation mechanisms of the effector and memory T cells remain unclear. In this study, we determined seric levels of Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin-4 (IL-4) and Interleukin-12 (IL-12) in individuals infected by *Plasmodium vivax*. We investigated polymorphisms in IFN- γ (IFNG+874) and IL-10 (IL10-1082) genes and their association with seric levels and parasite density. Concentrations of IFN- γ , IL-10, IL-4 and IL-12 were detected by ELISA, and IFNG+874 and IL10-1082 polymorphisms genotyping were investigated by allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction (ASO-PCR) and PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) methods, respectively. We detected increased levels of IFN- γ and IL-10 in individuals infected by *P. vivax*. IFN- γ levels were higher in individuals who were infected for the first time, but there were no association with parasite elimination. Increased levels of IL-10 were associated with higher parasite densities. We did not detect IL-4 and IL-12 seric levels. The frequencies of AA, AT, TT genotypes of IFNG+874 were 0,51, 0,39 e 0,10, respectively. The frequencies of AA, AG, GG genotypes of IL10-1082 were 0,49, 0,43 e 0,08, respectively. We also showed that IFG+874 polymorphism is associated with decreased levels of IFN- γ . The results show a Th1-driven immune response which can be regulated by IL-10 in naturally *P.vivax*-infected individuals.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é causada por protozoários intracelulares, classificados no filo Apicomplexa, na ordem Eucoccidiida, na família Plasmodiidae e no gênero *Plasmodium*. Existem cerca de 120 espécies de *Plasmodium* que podem infectar aves, répteis, roedores e primatas (Bruce-Chwatt, 1985; Moore *et al.*, 2002), porém somente cinco espécies causam a doença em humanos (Richards & Beeson, 2009); o *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), o *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), o *Plasmodium malarie* (Laveran, 1881), o *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e o *Plasmodium knowlesi* (Knowles & Das Gupta, 1932). O ciclo de vida deste protozoário ocorre em dois hospedeiros. O mosquito fêmea do gênero *Anopheles* desenvolve o ciclo sexuado e, portanto, é considerado o hospedeiro invertebrado ou definitivo. Durante o repasto sanguíneo, estes mosquitos transmitem a malária ao homem (hospedeiro vertebrado), no qual se desenvolve o ciclo assexuado do *Plasmodium* (Blackman, 2004).

A Organização Mundial da Saúde estima que anualmente sejam registrados cerca de 500 milhões de casos de malária em todo o mundo, distribuídos em aproximadamente 90 países (WHO, 2007). Em países do Sudeste Asiático e nas Américas Central e do Sul, estima-se que aproximadamente 1,2 bilhão de pessoas resida em áreas hipoendêmicas ou mesoendêmicas de malária. O *Plasmodium vivax* é a espécie mais prevalente nessas regiões, causando cerca

de 80 a 90 milhões de casos de malária por ano (Mendis *et al.*, 2001). No Brasil, a malária causada por *P. vivax* representa 75 a 80% dos casos registrados anualmente, e aproximadamente 99% destes casos ocorrem na Região Amazônica (Oliveira *et al.*, 2006).

O conhecimento acerca da imunidade natural adquirida por indivíduos que residem em áreas endêmicas poderá auxiliar na identificação dos mecanismos de proteção contra a malária, em especial os da imunidade adaptativa, com ênfase nos mecanismos de ativação e regulação de linfócitos T efetores e de memória, contribuindo para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária (Good *et al.*, 2004). Também é importante a realização de estudos para identificar os antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora (Moorthy *et al.*, 2004).

Vários antígenos candidatos a comporem vacinas contra a malária estão sendo avaliados em estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos. Os estudos apresentam resultados relacionados à imunogenicidade das preparações, estimulando a resposta imune protetora mediada por anticorpos e/ou por ação direta de linfócitos T CD8⁺, principalmente durante o ciclo hepático, e linfócitos T CD4⁺ na resposta imune contra o estágio sanguíneo. A indução da resposta imune celular direta ou a liberação de várias citocinas pode tornar esta resposta mais eficiente (Heppner *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria desses estudos foi realizada na malária causada por *P. falciparum*.

Na malária causada por *P. vivax*, os estudos acerca da resposta imune celular são restritos, principalmente pela dificuldade de manter *in vitro* o

cultivo contínuo deste parasito (Merino *et al.*, 2003). Assim, a caracterização do perfil de citocinas poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos mediados pela imunidade celular relacionados à ativação, aos mecanismos efetores e à regulação da resposta imune adquirida contra o parasito, sendo relevante para a compreensão da aquisição e regulação da resposta imune.

1.2 HISTÓRICO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA MALÁRIA

Em áreas endêmicas localizadas no continente africano, crianças com menos de cinco anos de idade geralmente morrem durante as primeiras infecções por *Plasmodium falciparum*. Por outro lado, crianças que sobrevivem às infecções agudas iniciais desenvolvem imunidade capaz de limitar os níveis de parasitemia sem a necessidade de tratamento com antimaláricos (McGregor *et al.*, 1956). A exposição freqüente contribui para a menor mortalidade, mas mesmo após múltiplos episódios de infecção aguda, o hospedeiro tem grandes dificuldades para desenvolver imunidade protetora contra a malária.

Estudo realizado por Yoshida & Andersson (1972) sugeriu que algumas populações de células T atuam por meio de mecanismos citotóxicos após a interação com anticorpos ligados às células alvo. A citotoxicidade mediada por células T contra hemácias de camundongos infectadas por *P. berghei* foi primeiramente observada por Coleman e colaboradores (1975). As hemácias parasitadas se tornam suscetíveis à aglutinação e à opsonização após a exposição de antígenos na superfície da célula parasitada (Brown, 1969).

A descoberta de que camundongos infectados por *P. berghei* irradiados desenvolveram resposta imune protetora influenciou diversos estudos na tentativa de desenvolvimento de vacinas, tanto em macacos quanto em humanos. Foram utilizados, então, antígenos que passaram por processos de atenuação no próprio mosquito *Anopheles*, ou ainda antígenos provenientes de formas eritrocíticas do *Plasmodium* (Silverman, 1975). Estudo desenvolvido por Clyde *et al.* (1973) mostrou que a irradiação de mosquitos *A. stephensi* infectados por esporozoítas de *P. falciparum* diminuiu a patogenicidade destes parasitos. Contudo, a dificuldade na obtenção de grandes quantidades do antígeno limitou o uso deste método.

A imunização de macacos com hemácias infectadas contendo esquizontes mortos e com adjuvante completo de Freund foi eficiente contra algumas cepas de *P. knowlesi*, porém esta eficiência não foi observada contra outras espécies de *Plasmodium* (Brown, 1969).

A imunidade na malária é timo-dependente, e os linfócitos podem ser transferidos para receptores singênicos por meio da transferência adotiva. Foi postulado, então, que a resposta imune efetora na malária é resultado da atuação de células T auxiliares e de anticorpos protetores presentes no soro. As células T, durante o reconhecimento de antígenos, podem estimular a ativação de células B e de macrófagos. Em estudo realizado com camundongos infectados por *P. berghei*, a depleção de células T resultou na recrudescência da doença em poucos dias, mostrando que estas células são cruciais para a manutenção da

subpatência. Além disso, a afinidade e a efetividade das células T aumentaram durante a infecção por *P. berghei* (Brown *et al.*, 1976).

Ao transferir células do baço e de linfonodos para camundongos infectados por *P. berghei*, Stechschulte (1969) observou que houve uma melhora significativa da doença. A partir de observações semelhantes, como em estudos envolvendo a depleção *in vivo* de células T, muitos autores sugeriram que o desenvolvimento da imunidade protetora contra o parasito era dependente da resposta imune mediada por células. Estudo realizado em camundongos tratados com soro anti-timócitos e infectados por *P. berghei* mostrou que os mecanismos inatos de resistência estavam prejudicados, mas nada influenciou na produção de anticorpos (Spira *et al.*, 1970). A timectomia neonatal de camundongos infectados por *P. berghei* também reduziu a resposta imune protetora, causando o aparecimento de parasitemias persistentes (Brown *et al.*, 1968; Stechschulte, 1969). Camundongos infectados por *P. berghei*, após depleção de células T e B, responderam com menos eficiência ao parasito do que os camundongos que não tiveram suas células depletadas (Gravely & Kreier, 1976).

Muitos estudos sugerem que as células T têm um importante papel na imunidade contra os parasitos da malária. Camundongos timectomizados (Brown *et al.*, 1968; Stechschulte, 1969; McDonald & Phillips, 1978) ou camundongos nude/nude (Clark & Allison, 1974; Weinbaum *et al.*, 1976) são mais suscetíveis ao *P. berghei*, ao *P. yoelli* ou ao *P. chabaudi* do que os camundongos normais. Clark *et al.* (1976) sugeriu que os linfócitos T são responsáveis pela liberação de fatores solúveis que têm atividade antiparasitária.

Os linfócitos de indivíduos infectados por *P. falciparum* sofrem proliferação celular *in vitro*, durante estimulação com antígeno do parasita (Wyler & Oppenheim, 1974). As células T podem auxiliar na indução da síntese de anticorpos e na produção de mediadores solúveis da inflamação (Wyler & Brown, 1977). Em alguns modelos animais, a imunidade pode ser induzida na ausência de anticorpos (Weidanz & Grun, 1983), e, em outros, a imunidade pode ser transferida por meio de células T purificadas para animais naive (Jayawardena *et al.*, 1982). Indivíduos infectados ou aqueles que residem em áreas endêmicas de malária desenvolvem respostas por células T contra os antígenos do parasita (Wyler & Oppenheim, 1974; Wyler & Brown, 1977; Troye-Blomberg *et al.*, 1983; Bygbjerg *et al.*, 1985).

Ao cultivar células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados na presença de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, Sinigaglia *et al.* (1985) observaram que houve expansão clonal de tipos específicos de células T após adição de mitógenos na cultura de células, sendo que tanto clones de células T CD4 quanto os de células T CD8 responderam eficientemente aos antígenos da malária. Esses dados corroboram com o estudo realizado por Brown *et al.* (1976), o qual sugeriu que linfócitos T CD4 podem atuar como células auxiliares na produção de anticorpos por linfócitos B, além de serem necessários para a indução da imunidade protetora contra os antígenos do parasito.

O antígeno CD8 é frequentemente encontrado nos linfócitos T citotóxicos, explicando o efeito dessas células sobre hemácias parasitadas (Allison & Eugui, 1982; Deans & Cohen, 1983). Todos os clones de células T CD4 e T CD8

produziram IFN- γ após estimulação antigênica, o que sugere que estas células estão envolvidas na proteção contra a malária, pois o IFN- γ pode ativar macrófagos capazes de eliminar o *Plasmodium*. Todos os clones responderam aos antígenos na presença da célula apresentadora de antígeno apropriada, mostrando que as respostas foram restritas ao MHC (Sinigaglia *et al.*, 1985).

1.3 RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA

O ciclo de vida do *Plasmodium* apresenta várias formas evolutivas, e em cada fase deste ciclo ocorre expressão preferencial de um conjunto de moléculas, as quais participam do estabelecimento da infecção. Esta composição complexa também apresenta moléculas com propriedades antigênicas que são responsáveis pela ativação da resposta imune do hospedeiro. Portanto, a resposta imune na malária é diversificada e estágio-específica, atuando contra as diferentes formas evolutivas do parasito. Esta resposta pode ser influenciada por fatores relacionados ao hospedeiro e pela exposição ao parasito (Plebanski & Hiil, 2000; Malaguarnera & Musumeci, 2002; Becker *et al.*, 2004; Langhorne *et al.*, 2008).

O ciclo inicia quando o mosquito inocula os esporozoítos na derme do hospedeiro intermediário no momento do repasto sanguíneo. Esses parasitos atravessam o endotélio vascular e alcançam o fígado em menos de 30 minutos. A interação dos esporozoítos com as células que compõem a derme ainda é pouco compreendida, mas é importante, uma vez que esta interação pode influenciar a

ativação de células da resposta imune inata e, assim, impedir o estabelecimento da infecção (Blackman, 2004; Stevenson & Riley, 2004).

A imunidade inata na malária compreende a participação das moléculas do sistema complemento, ativação de macrófagos, células NK e NKT. As moléculas do sistema complemento causam a lise direta do parasito, os macrófagos fagocitam os parasitos livres e os eritrócitos parasitados, e os linfócitos NK e NKT induzem a lise das células parasitadas (Engwerda & Good, 2005). Além destas, também participam as células dendríticas que iniciam a resposta imune adquirida (Urban *et al.*, 1999; Diallo *et al.*, 2008).

A resposta imune adquirida contra os esporozoítos e os demais estágios hepáticos é limitada e geralmente não impede o desenvolvimento do estágio eritrocítico. Os esporozoítos, assim como as formas sexuais, possuem antígenos de superfície pouco imunogênicos e menos polimórficos do que os antígenos das formas sanguíneas, provavelmente porque os esporozoítos sofrem menor pressão seletiva pelo sistema imune do hospedeiro (Struik & Riley, 2004). Essa baixa ativação da resposta imune contra formas do ciclo pré-eritrocítico pode estar associada a fatores de tolerância inerentes ao fígado ou ao tempo reduzido que o esporozoíto permanece na corrente sanguínea, antes de infectar os hepatócitos (Moore *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do ciclo hepático também depende de interações moleculares entre o parasito e o hospedeiro. Os esporozoítos possuem proteínas que contêm domínios de perforinas localizadas em organelas secretórias, como o micronema. Foi demonstrado que, após a invasão do parênquima hepático, o

esporozoíto continua a migrar entre vários hepatócitos até encontrar o ambiente ideal para a sua reprodução, onde ocorre a interação parasito/hospedeiro que melhor favoreça a diferenciação (Mota & Rodriguez, 2004; Bano *et al.*, 2007).

Durante a invasão, inicia-se a formação do vacúolo parasitóforo. Nesse momento, são expressas várias proteínas na membrana desse vacúolo, as quais podem contribuir para a evasão da resposta imune. Após a invasão, o esporozoíto se diferencia em trofozoíto hepático, que, por sua vez, se desenvolve em esquizonte hepático. Nesta etapa do ciclo, o parasito realiza reprodução assexuada por esquizogonia. Os esquizontes hepáticos se rompem e podem liberar até 40.000 merozoítos para a circulação, levando ao aumento da carga parasitária, que dará início ao ciclo sanguíneo (Mota & Rodriguez, 2004; Langhorne *et al.*, 2008).

Várias moléculas que participam do processo de invasão foram identificadas nas organelas do complexo apical, o qual caracteriza os parasitas do filo Apicomplexa. Este complexo é formado pelas organelas róptrias, micronemas e grânulos densos (Blackman, 2004). Entre as proteínas secretadas pelo complexo apical estão a proteína circunsporozoíta (CS) e a proteína relacionada à trombospondina (TRAP).

No início da infecção, os anticorpos podem desencadear resposta imune contra os esporozoítos ao reconhecerem a proteína circunsporozoíta (CS), localizada na superfície do parasito, e impedir a invasão dos hepatócitos. Porém, essa resposta geralmente não é suficientemente rápida para impedir esta invasão,

e os esporozoítos alcançam o fígado em poucos minutos (Ferreira & Ribeiro, 2000; Moore *et al.*, 2002).

Outro estudo mostrou que a imunização com peptídeos sintéticos derivados da CS de *P. vivax* induziu a produção de anticorpos, sendo que os títulos foram maiores em indivíduos imunizados, quando comparados com indivíduos residentes em áreas endêmicas. Esta imunização também foi capaz de induzir respostas mediadas por células T, com produção de IFN- γ . Este estudo confirmou que os peptídeos derivados da CS são imunogênicos e candidatos a compor preparações vacinais (Herrera *et al.*, 2005).

Durante a fase hepática, a resposta imune é predominantemente celular. A redução da densidade parasitária nesse estágio depende da ativação dos linfócitos T CD8⁺, além de linfócitos T CD4⁺ capazes de polarizar a resposta para Th1 no início da infecção e direcionar a resposta para Th2 durante o curso da infecção (Taylor-Robinson *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 1998; Greenwood *et al.*, 2008).

Os hepatócitos infectados se rompem e liberam, na corrente sanguínea, vesículas denominadas de merossomas contendo agregados de merozoítas em seu interior. Os merozoítas rompem os merossomas e invadem rapidamente os eritrócitos, representando um importante mecanismo de evasão da resposta imune humoral, pois a exposição dos parasitos aos anticorpos é de curta duração (Greenwood *et al.*, 2008). A invasão celular é mediada por proteínas de superfície e por proteínas liberadas pelo complexo apical (Sinnis & Sim, 1997;

Bannister *et al.*, 2000). A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é um processo complexo, composto pelas seguintes etapas: reconhecimento por proteínas de superfície, reorientação apical, formação da junção irreversível e do vacúolo parasitóforo, além das modificações do citoesqueleto da célula hospedeira (O'Donnell & Blackman, 2005).

Na primeira etapa do processo de invasão, as principais proteínas envolvidas são da família das Proteínas de Superfície do Merozoíto (MSP). A MSP1, componente dessa família, tem uma função essencial no processo de invasão do eritrócito. Por ter função extremamente importante no desenvolvimento da infecção pelo *Plasmodium*, a MSP1 é conservada e bastante imunogênica, sendo um excelente candidato a componente vacinal (Goel *et al.*, 2003; Gaur *et al.*, 2004; Richards & Beeson, 2009). Após esse contato inicial, a junção é estabilizada e ocorre aumento na eletrondensidade desta região de contato entre o eritrócito e o merozoíto. Nesta etapa, a principal molécula envolvida é o Antígeno-1 da Membrana Apical (AMA1) (O'Donnell & Blackman, 2005). Outras moléculas que participam da invasão das células vermelhas pelo *P. vivax* são a Proteína Ligante de Duffy e a Proteína Ligante de Reticulócito (Galinski & Barnwell, 2008). Após esta etapa, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos, que evoluem posteriormente para esquizontes (O'Donnell & Blackman, 2005).

A resposta imune contra os parasitos da fase sanguínea é relacionada com a produção de anticorpos, porque o eritrócito não apresenta moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), necessárias para a apresentação de antígenos aos linfócitos T. Entretanto, parasitos livres

podem entrar em contato com células apresentadoras de antígenos, principalmente no baço, e iniciar uma resposta imune celular mediada por linfócitos T CD4⁺, responsáveis pela secreção de citocinas (Ndungu *et al.*, 2005).

A resposta imune contra as formas sanguíneas é de grande importância, pois esta fase do ciclo de vida do *Plasmodium* é responsável pelos sintomas clínicos da doença. Esta resposta imune é predominantemente dependente dos mecanismos da imunidade humoral, embora outros mecanismos protetores também tenham sido descritos, incluindo imunidade inata, produção de citocinas e a proliferação de células T (Plebanski & Hill, 2000; Garraud *et al.*, 2003; Moorthy *et al.*, 2004; Langhorne *et al.*, 2008).

Um importante mecanismo para a aquisição de resposta imune celular protetora é o desenvolvimento de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória. Células T virgens que expressam receptores de superfície CD45RA, ligante de CD62 (CD62L) e CCR7 são sequestradas nos órgãos linfóides secundários, nos quais serão ativadas, sofrerão proliferação e diferenciação, após apresentação dos antígenos pelas células dendríticas. Uma vez ativadas, as células T podem tanto produzir IFN- γ quanto participar da resposta imune por meio de mecanismos citotóxicos. Após a eliminação do parasito, cerca de 5 a 10% das células permanecem como células T de memória, as quais atuam durante a fase de defesa primária do hospedeiro (Keating *et al.*, 2005). A magnitude das respostas por células T produtoras de IFN- γ é amplamente utilizada para identificar

componentes vacinais imunogênicos, entretanto estas respostas geralmente diminuem ou desaparecem dentro de algumas semanas (Keating *et al.*, 2005).

1.4 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA

1.4.1 Resposta imune celular

As células T CD4⁺ estão envolvidas na indução da resposta imune contra as formas do estágio sanguíneo, enquanto que as células T CD8⁺ atuam por meio de mecanismos de citotoxicidade contra os estágios hepáticos do parasito (Torre *et al.*, 2002). No processo de regulação dessa resposta, as citocinas podem inibir a ativação e a proliferação dos linfócitos e induzir linfócitos T reguladores (Perry *et al.*, 2004; Ndungu *et al.*, 2005).

Em 1992, Rodrigues e colaboradores confirmaram a participação de linfócitos T CD8⁺ na malária, em experimentos realizados em camundongos BALB/c imunizados com esporozoítos irradiados de *P. yoelii*. Essa subpopulação de linfócitos apresentou intensa atividade lítica, capacidade de degradação de DNA em presença de peptídeos de *Plasmodium*, além de intensa produção *in vitro* de BLT-esterase, IFN- γ e TNF- α (Rodrigues *et al.*, 2003).

A imunização de voluntários com esporozoítos irradiados de *P. falciparum* conferiu imunidade estéril e induziu ativação de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e anticorpos específicos contra a CS (Nardin & Nussenzweig, 1993; Hoffman *et al.*, 2002). No entanto, observou-se que a exposição natural ao *P. falciparum*

não confere imunidade estéril como observado nos ensaios de imunização com esporozoítos irradiados. Essa diferença ocorre, provavelmente, porque a irradiação reduz a capacidade de evasão do parasito, permitindo a sua exposição ao sistema imune do hospedeiro por períodos mais longos, bem como a maior ativação das células em ensaios experimentais (Rodrigues *et al.*, 2003).

Em humanos, a resposta de linfócitos T CD8⁺ aos epítotos da fase hepática de *P. falciparum*, e mais recentemente de *P. vivax*, tem sido descrita em indivíduos expostos à malária. Estes estudos mostraram a participação das moléculas de MHC de classe I na apresentação de antígenos da fase hepática de *P. vivax* aos linfócitos T CD8⁺ (Arévalo-Herrera *et al.*, 2002). Estas moléculas ativam os linfócitos T CD8⁺ específicos, que são capazes de promover lise dos hepatócitos infectados (González *et al.*, 2000; Jobe *et al.*, 2009).

Os linfócitos T CD4⁺ também participam da resposta imune adaptativa contra a malária. Em camundongos infectados com *P. chabaudi*, verificou-se a participação dos linfócitos T CD4⁺ na imunidade protetora contra o estágio eritrocítico. Foi demonstrado que as subpopulações Th1 e Th2 exercem proteção contra a malária por meio de diferentes mecanismos. No início da infecção, as células Th1 secretam IFN- γ que favorece a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, enquanto que as células Th2 favorecem a produção de anticorpos IgG1. Na fase inicial da infecção, os linfócitos T CD4⁺ participam da redução da densidade parasitária, sendo que, durante o curso da infecção, a proporção de células Th2 aumenta, favorecendo o desenvolvimento da imunidade

mediada por anticorpos e, conseqüentemente, a redução da parasitemia e a resolução da infecção patente (Taylor-Robinson *et al.*, 1993; Fonseca *et al.*, 2007).

A vacinação de indivíduos adultos com a preparação RTS,S/SBAS2, que inclui a proteína recombinante contendo a região C-terminal da CS, induziu resposta imune protetora após desafio com *P. falciparum*. A RTS,S/SBAS2 estimulou linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ . Dessa forma, os mecanismos protetores estimulados pela vacina podem proteger contra a malária através da ativação de células T CD4⁺, polarizando a resposta para Th1 e auxiliando na redução e/ou eliminação da parasitemia (Lalvani *et al.*, 1999; Heppner *et al.*, 2005). Pinder e colaboradores (2004) verificaram que essa resposta está associada a altos níveis de proliferação celular.

Dentre as citocinas produzidas por macrófagos, linfócitos T ativados, células de Kupffer, células NK e células endoteliais, as principais citocinas envolvidas na resposta imune celular na malária são o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina 12 (IL-12). Estas citocinas participam da inibição do desenvolvimento do estágio hepático, sendo que a participação do TNF- α é a melhor caracterizada (Figura 1). A cascata inflamatória pode ser regulada por diversos mecanismos, entre os quais o bloqueio de moléculas capazes de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Também tem sido analisada a participação de citocinas imunorreguladoras, como a Interleucina-10

(IL-10) e Fator de Crescimento e Transformação - β (TGF- β) (Ferreira & Ribeiro, 2000; Jason *et al.*, 2001).

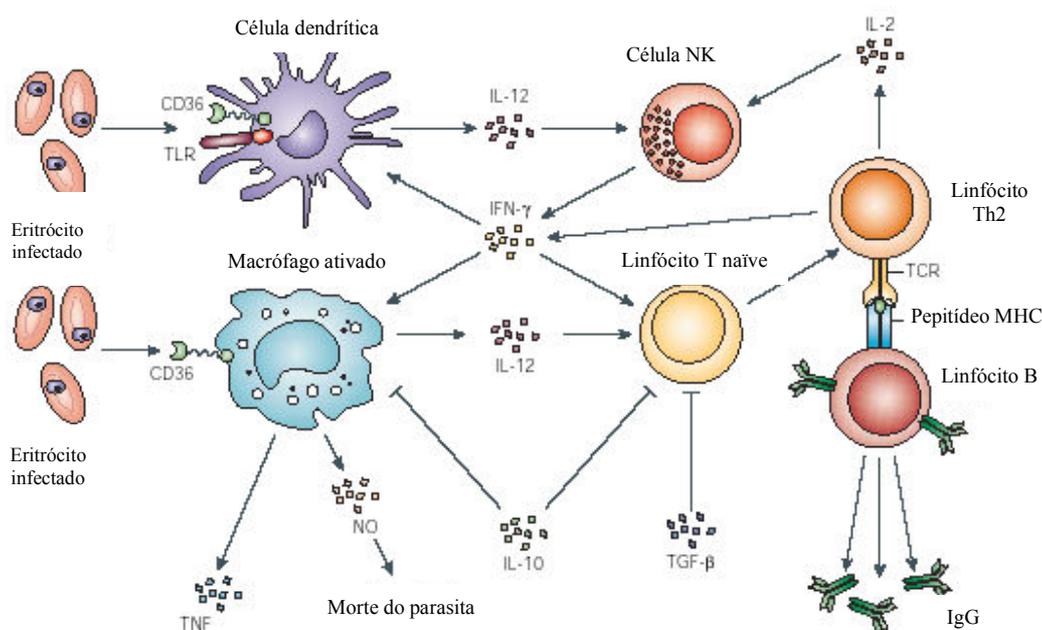


Figura 1: Resposta imune na malária: A célula dendrítica (CD) processa e apresenta os epítopos do parasita. A produção de IL-12 pela CD ativa células NK, as quais produzem IFN- γ e induzem a diferenciação de linfócito T CD4⁺. A expansão clonal dos linfócitos T específicos induz a ativação de NK, CD e macrófagos, amplificando a resposta imune adaptativa. Os macrófagos secretam NO e TNF. A ativação de linfócitos B específicos estimula a produção de anticorpos IgG. A regulação negativa da resposta imune inata e adaptativa envolve a participação das citocinas IL-10 e TGF- β .

Fonte: Adaptado de STEVENSON & RILEY, 2004.

Várias citocinas produzidas por linfócitos T ativados, monócitos, células de Kupffer, células NK e células endoteliais são capazes de inibir o desenvolvimento do estágio hepático, sendo que as principais citocinas envolvidas

nesta fase são IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (Ferreira & Ribeiro, 2000; Jason *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2006).

Estudo realizado com células mononucleares de sangue periférico de neonatos, com mães positivas para malária ou com placenta positiva, estimuladas com antígeno bruto de *P. falciparum*, mostrou que a resposta do tipo Th2 foi predominante. Esta resposta foi avaliada pela proporção de células produtoras de IFN- γ em relação às células produtoras de IL-4 (Achidi *et al.*, 2005). Existem algumas hipóteses para explicar a polarização da resposta imune para Th2 na malária. Foi proposto que essa polarização pode refletir o potencial de evasão do parasita, ou pode estar associada à imunidade parcial desenvolvida por indivíduos de área endêmica, devido à exposição frequente aos antígenos do parasito. Essa resposta também pode estar associada à ativação de linfócitos T CD4⁺ que podem produzir outras citocinas ligadas à ativação da capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺, envolvidos na resposta imune contra as formas hepáticas (Perkmann *et al.*, 2005).

Em indivíduos infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum* que foram submetidos a tratamento com drogas antimaláricas, observou-se rápida diminuição de citocinas Th2 e aumento concomitante da expressão de citocinas Th1, estas últimas necessárias para a eliminação do parasito intracelular (Perkmann *et al.*, 2005).

As células T reguladoras atuam na manutenção da auto-tolerância imunológica, bem como no controle das respostas imunes aos patógenos,

micróbios comensais e antígenos. Essas células atuam diretamente ou secretam citocinas antiinflamatórias, tais como a IL-10 e o TGF- β . As células T reguladoras têm um papel importante na infecção causada por *P. falciparum*, principalmente em casos de malária cerebral. Estudo mostrou que em camundongos desprovidos de células T reguladoras e infectados por *P. berghei* houve elevação do número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ (Amante *et al.*, 2007). Células T reguladoras parecem estar associadas com quadros mais graves de infecções causadas por *P. yoelii* em camundongos BALB/c (Chen *et al.*, 2009).

1.4.2 Participação das citocinas Interleucina-12, Interferon- γ , Interleucina-4 e Interleucina-10 na malária

Na resposta imune contra o *Plasmodium*, as principais atividades biológicas da IL-12 estão relacionadas ao aumento da atividade citotóxica das células NK, proliferação de células NK e células T, e produção de IFN- γ por estes tipos celulares. A IL-12 é o componente da resposta imune inicial capaz de ligar a resposta imune inata à imunidade adquirida, e esta citocina pró-inflamatória inicia o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 (Su & Stevenson, 2001; Ong'echa *et al.*, 2007).

A proteção induzida por IL-12 contra o parasito da malária, observada em modelos animais, está relacionada com a atividade que esta citocina tem de aumentar a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th1, promovendo uma maior secreção de IFN- γ . Os monócitos são estimulados pelo

IFN- γ a secretarem TNF- α , o qual promove a formação de radicais livres tóxicos, como o óxido nítrico (Perkins *et al.*, 2000). A produção de IL-12 por macrófagos ativado é suprimida na presença de IL-4 e IL-10, entretanto as funções Th2-dependentes, tais como a produção de IL-4, IL-10 e IgE, são suprimidas pela IL-12 (Keller *et al.*, 2006). A produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, está relacionada à redução da parasitemia (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Ndungu *et al.*, 2005).

Existem evidências de que a imunidade protetora na malária seja mediada pela ativação de citocinas do tipo Th1, tais como IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-18. As citocinas IL-12 e IFN- γ induzem uma resposta imune do tipo Th1 em indivíduos infectados por *P. falciparum*, participando efetivamente na defesa do hospedeiro. Além disso, a IL-18 e a IL-12 atuam em sinergismo na ativação de células NK, células B e T (Torre *et al.*, 2002; Perkmann *et al.*, 2005).

Em um estudo no qual foi determinada a quantidade de citocinas intracelulares produzidas por células T CD4⁺, observou-se que os níveis de IL-4 estavam elevados durante a fase aguda da malária causada por *P. falciparum*, enquanto que esses níveis decresciam à medida que havia uma redução da parasitemia. No momento em que há diminuição dos níveis de IL-4, ocorre a inibição das células Th2, que podem prevenir a recrudescência da malária. Entretanto, as evidências ainda são pouco consistentes no sentido de mostrar clara associação entre os níveis de IL-4 e a redução da parasitemia em infecções maláricas, pois tais evidências foram observadas num estudo feito *in vitro*, no qual

houve uma supressão da atividade dos macrófagos anti-*P. falciparum* (Winkler *et al.*, 1998; Alam *et al.* 2008).

A Interleucina-4 tem sido associada com o controle e a eliminação do *Plasmodium* em infecções subpatentes, pois os linfócitos B ativados por esta citocina são responsáveis pela produção de anticorpos contra o parasita (Siddiqui *et al.*, 2007). Todavia, existem estudos realizados com camundongos deficientes de IL-4, os quais conseguiram controlar a infecção primária por *P. chabaudi*, embora a parasitemia recrudescente tenha sido bastante elevada. A IL-4 também tem sido associada com a mudança de classe para os isotipos IgG1 e IgE (Von Der Weid *et al.*, 1994; Petritus & Burns, 2008).

O interferon- γ (IFN- γ) é uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células T CD8⁺, T CD4⁺ do tipo Th1, células NK e linfócitos T $\gamma\delta$. Na malária, o IFN- γ tem ação antiparasitária direta e, em sinergismo com o TNF- α , capaz de induzir a produção do óxido nítrico (NO) e radicais livres. A ação do IFN- γ , assim como das demais citocinas pró-inflamatórias, deve ser controlada para que ocorra produção em nível adequado e, conseqüentemente, a eliminação da infecção com poucos danos para o hospedeiro (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002).

Camundongos tratados *in vivo* com anticorpos anti-IFN- γ e desafiados com *P. yoelii* apresentaram alta mortalidade, mostrando que a produção de IFN- γ no início da infecção pode conferir resistência ao parasita (Angulo & Fresno, 2002). Tem sido descrito que o IFN- γ induz a participação tanto da IL-12 quanto da IL-18 e, em contrapartida, a produção de IFN- γ mediada por

células NK é altamente dependente de IL-12 e parece ser parcialmente dependente de IL-18. A produção de IFN- γ está relacionada com a maior proteção da maioria dos modelos animais expostos ao parasito, visto que esta citocina tem a capacidade de ativar macrófagos, os quais produzem reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio, substâncias tóxicas necessárias para a eliminação dos estágios sanguíneos dos parasitas da malária. O IFN- γ inicia a resposta imune celular, contribuindo para a eliminação de patógenos intracelulares (Torre *et al.*, 2002).

Vários estudos mostraram que a resposta Th1 é importante para a eliminação do *P. falciparum*. Crianças não imunes infectadas por *P. falciparum* apresentaram baixos níveis de IFN- γ e IL-12 e mesmo após a estimulação *in vitro* não foi possível aumentar os níveis destas citocinas. Outros estudos demonstraram que, em pacientes com malária não grave, houve produção de IFN- γ em resposta aos antígenos do parasita, enquanto que na malária grave não foi observada a produção desta citocina (Angulo & Fresno, 2002; Newman *et al.*, 2006).

O IFN- γ tem um importante papel na ativação das células apresentadoras de antígeno e na expressão das moléculas de MHC de classe I e II, favorecendo a apresentação de antígenos do parasito. O IFN- γ está intimamente relacionado com a indução de mecanismos efetores antiparasitários e também atua na imunidade protetora contra os estágios sanguíneos da malária,

além de eliminar diretamente o parasito no interior do hepatócito (John *et al.*, 2004).

Tanto o IFN- γ quanto a IL-10 são componentes importantes na regulação das respostas imunes do tipo Th1, porém a IL-10 é responsável pela diminuição da síntese de IFN- γ . Existem evidências de que a ausência de IFN- γ e a presença de IL-10 medeiam a inibição da resposta Th1 em neonatos cujas mães tiveram malária (Brustoski *et al.*, 2005).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória produzida tardiamente por células Th2, células T CD8⁺, monócitos e células B ativadas. Em processos infecciosos causados por *P. falciparum*, ocorre um aumento na produção de IL-10 quando a parasitemia está elevada (Nussenblatt *et al.*, 2001). Em virtude da sua capacidade de inibir a produção de citocinas por linfócitos T ativados, a IL-10 regula a produção de importantes citocinas, como IFN- γ e IL-12 (Prakash *et al.*, 2006).

Estudos em camundongos mostraram que a deficiência de IL-10 em animais infectados por *P. chabaudi* aumentou a mortalidade nestes animais. Também foi observado que esses animais desenvolveram hipoglicemia, anemia severa e houve aumento na concentração de IFN- γ e TNF- α , quando comparados com os não deficientes de IL-10 (Sanni *et al.*, 2004). Estudo realizado com crianças africanas anêmicas e com alta parasitemia por *P. falciparum* demonstrou que os níveis de IL-12 diminuíram e que os níveis de IL-10 e TNF- α estavam aumentados, porém constatou-se que apenas a IL-10 foi capaz de suprimir a

produção de IL-12. A presença de IL-10 também atua prevenindo os danos teciduais desencadeados pela inflamação, devido à participação dos macrófagos na malária cerebral (Malaguarnera & Musumeci, 2002).

Os monócitos são as fontes primárias da produção de IL-10 durante a resposta imune inata e possuem mecanismos que auxiliam na inibição da produção de IL-12 (Keller *et al.*, 2006). A presença de IL-10 suprime a geração de uma resposta do tipo Th1 por meio da inibição da expressão de MHC de classe I e II, diminuindo a participação das células apresentadoras de antígeno (Brustoski *et al.*, 2005). Todavia, as citocinas IL-4 e IL-10, envolvidas na resposta Th2, provavelmente não atuam durante a fase aguda da doença (Torre *et al.*, 2002).

1.4.3 Participação das citocinas na malária causada por *Plasmodium vivax*

Na malária causada por *P. vivax*, os níveis séricos do TNF- α estavam aumentados no início do tratamento do indivíduo infectado, em comparação com a concentração detectada após o tratamento. Este estudo foi realizado em indivíduos primoinfectados, residentes no estado do Pará, e mostrou que não houve associação entre a concentração desta citocina e a densidade parasitária, mas houve associação entre os quadros febris e os níveis de TNF- α (Silva, 2002). A secreção de citocinas inflamatórias também foi associada com a liberação de glicosilfosfatidilinositol derivada do parasita, estimulando a liberação de TNF- α , IL-1 e IL-6 de monócitos e macrófagos (Karunaweera *et al.*, 2007).

Estudo realizado na Turquia mostrou que a densidade parasitária elevada está associada com níveis aumentados de IL-10 e IL-12 na malária causada por *P. vivax*. Indivíduos com alta densidade parasitária apresentavam níveis significativamente maiores de IL-1 β e de IL-10 do que indivíduos não infectados. Níveis elevados de IL-6 e IL-10 também estão relacionados com quadros febris. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a idade e a produção de IL-8, mas não houve correlação com a IL-1 β , IL-2, IL-4, IL6, IL-10 e IL-12. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a severidade pode estar relacionada ao padrão de citocinas produzidas (Zeyrek *et al.*, 2006).

Fernandes e colaboradores (2008) analisaram a produção de citocinas em indivíduos que residem na região Amazônica infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum*. Indivíduos infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum* apresentaram níveis séricos elevados de TNF- α , IFN- γ , MIF e MCP-1, quando comparados com o grupo controle. Concentrações séricas elevadas de TNF- α , IFN- γ , MIF (Fator inibidor de migração), e MCP-1 (Proteína-1 quimiotática de monócitos) foram detectadas tanto em indivíduos infectados por *P. vivax* como por *P. falciparum*. Entretanto, os níveis séricos de IL-10 estavam aumentados em indivíduos infectados por *P. vivax*, mas não naqueles infectados por *P. falciparum*. Também foi mostrado que indivíduos anêmicos infectados por *P. falciparum* apresentaram níveis elevados de IL-12 e IL-10, enquanto que os indivíduos não-anêmicos infectados por *P. falciparum* apresentaram níveis elevados de TNF- α . Foi mostrada correlação positiva entre as concentrações séricas de MCP-1 e a

densidade parasitária em indivíduos infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum*. Também foi observada correlação positiva entre os níveis de IL-12 e a densidade parasitária em indivíduos infectados por *P. vivax*, mas não naqueles infectados por *P. falciparum*.

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos infectados por *P. vivax* foram cultivadas *in vitro* com o antígeno rico em triptofano (PvTRAg) recombinante para a detecção de citocinas no sobrenadante. Os resultados mostraram que CMSP de indivíduos infectados por *P. vivax* produziram níveis significativamente maiores de citocinas do perfil Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-12) e do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) do que CMSP de indivíduos do grupo controle, após estímulo com o antígeno recombinante (Alam *et al.*, 2008).

Níveis séricos de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 foram detectados em indivíduos infectados por *P. vivax* com disfunção hepática ou não. Níveis significativamente maiores de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ foram observados em indivíduos infectados por *P. vivax* com disfunção hepática, quando comparados com aqueles infectados por *P. vivax* sem disfunção hepática. Porém, níveis significativamente elevados de IL-12 foram detectados em indivíduos infectados sem disfunção hepática, em comparação com aqueles com disfunção hepática (Yeom *et al.*, 2003).

1.5 POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IFN- γ

O IFN- γ humano é codificado por um único gene contendo quatro éxons e três íntrons, localizado na região 12q24.1 do cromossomo 12, em cópia única (Trent *et al.*, 1982). Polimorfismos nesse gene têm sido associados com a suscetibilidade em diversas doenças (Cabantous *et al.*, 2005; Kalami-Sarvestani *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2008).

O promotor e as regiões intrônicas provavelmente interagem na sinalização extracelular, resultando na ativação do fator de transcrição NF κ B, o que promove a transcrição do IFNG. O principal polimorfismo no gene que codifica o IFN- γ (polimorfismo IFNG +874T/A) está localizado no seu primeiro íntron, na posição +874, e pode influenciar na produção de IFN- γ . Análises sobre a função biológica do polimorfismo +874T/A sugeriram que indivíduos portadores do alelo T, selvagem, produzem quantidades normais de IFN- γ , enquanto que os portadores do alelo A, mutante, produzem níveis diminuídos desta citocina, o que pode explicar a frequente associação deste alelo com a suscetibilidade observada em várias doenças (Matos *et al.*, 2007).

Em estudo realizado no Rio de Janeiro, Brasil, foi observada frequência similar do genótipo TT tanto em indivíduos com leishmaniose cutânea ou com leishmaniose mucosa, quando comparada com a observada na população controle. Não houve associação do polimorfismo IFNG+874 com desenvolvimento da leishmaniose ou com a progressão para formas mais graves da doença. Como

esperado, os indivíduos com leishmaniose cutânea que apresentaram o genótipo AA produziram quantidades significativamente menores de IFN- γ quando comparados com aqueles que apresentaram os genótipos AT ou TT. Porém, em indivíduos com leishmaniose mucosa, não houve diferença na produção de IFN- γ quando os genótipos foram comparados. Assim, o polimorfismo IFNG+874 pode influenciar a produção do IFN- γ durante a leishmaniose cutânea, embora não previna o desenvolvimento da doença (Matos *et al.*, 2007).

Em estudo realizado em indivíduos iranianos infectados por leishmaniose cutânea, houve uma frequência significativamente maior do alelo T na população controle do que em indivíduos com leishmaniose cutânea crônica, o que sugere que o desenvolvimento de leishmaniose cutânea crônica é, pelo menos em parte, influenciado pela produção diminuída de IFN- γ , que é determinada pela substituição do alelo T para o alelo A, na posição +874, no gene que codifica o IFN- γ (Kalami-Sarvestani *et al.*, 2006).

Outros polimorfismos também foram descritos para o gene do IFN- γ . A mudança de G para T, na posição -183, na região promotora do gene do IFN- γ , cria um sítio de ligação para o fator de transcrição nuclear, responsável pelo aumento da transcrição do gene que codifica o IFN- γ . Estudo realizado em crianças que residem em Bamako, Mali, mostrou que o alelo IFNG-183T está associado com o menor risco de desenvolvimento da malária cerebral causada por *P. falciparum*. O genótipo IFNG-183G/T também foi associado com o menor risco de desenvolver malária cerebral (Cabantous *et al.*, 2005).

O primeiro íntron do IFNG contém regiões repetidas em tandem (CA)_n, formando 9 alelos diferentes. Os alelos (CA)₁₂ e (CA)₁₃ estão associados com a produção aumentada e diminuída de IFN- γ , respectivamente. Sete alelos (CA)_n - (CA)₁₂ a (CA)₁₈ - foram associados com o risco de desenvolvimento de malária cerebral. Indivíduos com o genótipo (CA)₁₄/(CA)₁₄ tiveram 70% menos chance de progredir para a malária cerebral. Após a análise dos haplótipos, ao combinar os polimorfismos IFNG(CA)_n com os polimorfismos IFNG-183G/T, foi observado que o haplótipo IFNG-183T-(CA)₁₄ está associado com a proteção contra a malária cerebral (Cabantous *et al.*, 2005).

Polimorfismos na região promotora do gene que codifica o receptor 1 de IFN- γ também foram relacionados com a suscetibilidade à malária cerebral em crianças que residem em Gâmbia. Indivíduos pertencentes ao grupo étnico Mandinka que foram heterozigotos para o polimorfismo na posição -56 da região promotora do gene do receptor 1 de IFN- γ apresentaram menor chance de desenvolver malária cerebral. Além disso, quando a população geral foi analisada, o alelo IFNGR1-470delTT foi associado com a maior proteção contra a malária severa (Koch *et al.*, 2002).

1.6 POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IL-10

O gene que codifica a IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32, e contém uma região promotora com pelo menos 5kb, onde foram descritos mais

de 27 polimorfismos. Polimorfismos na região promotora de IL-10 formam genótipos e/ou haplótipos que estão relacionados com a produção de níveis aumentados ou diminuídos desta citocina (Giordani *et al.*, 2003).

Polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 são estudados com frequência, principalmente os localizados nas posições -1082, -819 e -592. Um exemplo claro da participação desses polimorfismos foi mostrado por Koss *et al.* (2000), ao ser verificado que o haplótipo IL10-1082A/IL10-819T/IL10-592A está envolvido com a baixa produção de IL-10 na doença inflamatória do intestino.

Visto que a patogênese de doenças infecciosas poligênicas, tais como a malária, é condicionada pela variabilidade genética nas regiões promotoras e/ou codificantes de genes que originam citocinas pró- e anti-inflamatórias, um melhor entendimento da doença pode ser obtido por meio da identificação de polimorfismos nesses genes críticos, capazes de mediar o desenvolvimento e o curso clínico da doença (Ouma *et al.*, 2008).

Aproximadamente três quartos da variabilidade interindividual nos níveis produzidos de IL-10 humana foram atribuídos à variação polimórfica encontrada no gene que codifica a IL-10 (Lazarus *et al.*, 2002). Um polimorfismo na posição -1082, dentro da região promotora do gene que codifica a IL-10, é responsável pela produção diminuída de IL-10. Este polimorfismo é caracterizado pela substituição de guanina (G) por adenina (A) na posição -1082, formando os genótipos -1082 GG (responsável pela produção de IL-10 em níveis normais), -1082 GA (produção de IL-10 em níveis intermediários) e -1082 AA (produção diminuída de IL-10) (Turner *et al.*, 1997).

Vários estudos envolvendo a associação entre polimorfismos no gene que codifica a IL-10 e a patogênese aumentada em algumas doenças infecciosas foram realizados. O alelo IL10-1082A foi associado com a ocorrência de retinocoroidite toxoplásmica em indivíduos que residem em Minas Gerais, Brasil. Além disso, sugeriu-se que o genótipo AG também pode estar associado com a retinocoroidite toxoplásmica (Cordeiro *et al.*, 2008).

Polimorfismos em outras posições na região promotora do gene de IL-10 também foram estudados. Foi observado que o polimorfismo na posição -819 da região promotora do gene que codifica a IL-10 altera a produção de IL-10. Em estudo realizado na Bahia, Brasil, em indivíduos infectados por *Leishmania braziliensis*, aqueles que apresentaram o genótipo IL10-819C/C produziram níveis elevados de IL-10 em relação aos indivíduos que apresentaram os genótipos IL10-819C/T e T/T (Salhi *et al.*, 2008).

Polimorfismos nas posições -1082 (IL10-1082) e -592 (IL10-592) da região promotora do gene de IL-10 não apresentaram associação com a suscetibilidade à infecção por *P. falciparum* em uma população da Tanzânia (Carpenter *et al.*, 2009).

Carpenter e colaboradores (2007) mostraram, ao estudar uma população da Tanzânia, que existem evidências fracas de que o alelo IL10-592A está associado com a maior produção de IgE total em indivíduos infectados por *P. falciparum*. Também foi mostrada associação negativa entre o alelo IL10-1082A e a produção de anticorpos IgG4 anti-*P. falciparum*. O haplótipo IL10-1082A/IL10-

592A também foi associado negativamente com a produção de IgG4 e IgE específica.

Algumas variantes (-1082A/G, -819T/C e -592A/C) na região promotora do gene de IL-10 foram relacionadas com os níveis séricos de algumas citocinas (IL-10, TNF- α , IL-6 e IL-12) e com o desenvolvimento da anemia severa em crianças quenianas que residem em área de transmissão holoendêmica de *P. falciparum*. As análises sugeriram que o haplótipo -1082G/-819C/-592C (GCC) é um dos fatores que auxiliam na proteção contra o desenvolvimento de anemia severa e é responsável pela produção aumentada de IL-10. Embora nenhum outro haplótipo tenha sido associado com a suscetibilidade à anemia severa, indivíduos com o haplótipo -1082A/-819T/-592A (ATA) tiveram maior risco de desenvolver anemia severa e produziram quantidades pequenas de IL-10. Ratificando esses resultados, a presença do haplótipo GCC foi associada com níveis elevados de hemoglobina, quando comparado com os haplótipos não-GCC, enquanto que o haplótipo ATA foi associado com níveis reduzidos de hemoglobina. Resultados adicionais revelaram que a taxa de IL-10:TNF- α foi maior no grupo de indivíduos com o haplótipo GCC e menor no grupo com o haplótipo ATA, enquanto que a taxa de IL-10:IL-12 foi maior neste último grupo. Esses dados mostram que os diferentes haplótipos da região promotora do gene de IL-10 são condicionantes para o desenvolvimento da anemia severa e alteram os níveis séricos das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Acredita-se, portanto, que crianças infectadas por *P. falciparum* que apresentam o haplótipo GCC produzem quantidades maiores de

IL-10, as quais podem regular a produção de TNF- α , protegendo-as contra o desenvolvimento de anemia severa. Crianças com o haplótipo ATA, entretanto, produzem níveis reduzidos de IL-10, o que permite a maior expressão de TNF- α , tornando-as mais suscetíveis à anemia severa (Ouma *et al.*, 2008).

Os estudos acerca da participação das citocinas antiinflamatórias na malária são de grande relevância para a compreensão dos mecanismos da imunidade e da fisiopatologia da doença. A compreensão desta imunorregulação poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos efetores e reguladores na malária e no desenvolvimento de intervenções estratégicas, como as vacinas (Plebanski & Hill, 2000; Garraud *et al.*, 2003; Moorthy *et al.*, 2004; Richards & Beeson, 2009).

Os resultados obtidos nesse estudo visam analisar a participação das citocinas nos mecanismos imunológicos na malária e relacionar com o controle da parasitemia em indivíduos expostos naturalmente à malária causada por *P. vivax*. A identificação de polimorfismos em genes que codificam citocinas que participam da resposta imune contra o *P. vivax* é essencial para determinar se os genótipos identificados podem influenciar nas concentrações das citocinas, as quais podem atuar na ativação e regulação da resposta imune.

No estado Pará, esta caracterização ainda não foi realizada e deverá fornecer informações relevantes para os estudos que têm como objetivo a compreensão dos mecanismos da resposta imune, visando o desenvolvimento de vacina contra a malária causada por *Plasmodium vivax*, a espécie de parasito mais prevalente no Brasil.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Analisar aspectos imunológicos e genéticos relacionados à resposta imune celular na malária causada por *Plasmodium vivax*.

1.7.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração das citocinas Interleucina-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina (IL-4) e Interleucina 10 (IL-10) no soro de indivíduos infectados por *P. vivax*.
- Verificar se os níveis séricos destas citocinas estão associados com a densidade parasitária.
- Analisar se a exposição prévia à malária influencia nos níveis séricos destas citocinas.
- Determinar a frequência de polimorfismos nos genes do IFN- γ (IFNG +874T/A) e da IL-10 (posição -1082), e verificar se existe associação destes polimorfismos com a concentração das citocinas e com a densidade parasitária na malária causada por *P. vivax*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas de pacientes atendidos em Belém, Pará, no Laboratório de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas, após o diagnóstico pelo exame da gota espessa e antes de iniciar o tratamento. Foram coletadas 132 amostras de indivíduos infectados por *P. vivax*. Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa receberam informações sobre os objetivos, os riscos e os benefícios do trabalho (Anexo I) e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). Foram excluídos do estudo os menores de 12 anos de idade, gestantes ou que relataram outras doenças. Durante o atendimento, foi preenchida uma ficha epidemiológica (Anexo III), com os dados informados. Neste estudo, utilizamos os dados sobre sexo, idade e número de episódios prévios de malária.

No grupo de indivíduos infectados por *P. vivax*, 66,6% são do sexo masculino e 33,4% do sexo feminino. A média de idade neste grupo foi $32,07 \pm 13,40$ anos, com variação de 12 a 68 anos. A média da densidade parasitária foi $6.270,66 \pm 7.051,19$ parasitos/ μL , com variação de 12 a 40.000 parasitos/ μL . Os indivíduos foram agrupados em faixas de densidade parasitária, sendo que 24,8% foram incluídos na faixa de ≤ 1.000 parasitos/ μL , 28,1% na faixa de 1.001 a 5.000 parasitos/ μL , 31,4% na faixa de 5.001 a 10.000 e 15,7% na faixa de > 10.000 parasitos/ μL . Os indivíduos também foram agrupados de acordo com o número de

episódios prévios de malária, sendo que 14,2% são primoinfectados, 37,6% tiveram um único episódio prévio de malária e 48,2% tiveram mais de um episódio prévio de malária.

Para compor o grupo controle, foram coletadas amostras de soro de 86 indivíduos sadios, selecionados para doação de sangue no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (Fundação HEMOPA). Neste grupo, 71,8% são do sexo masculino, enquanto que 28,2% são do sexo feminino. A média de idade foi $29,99 \pm 9,24$ anos, com variação de 18 a 48 anos.

Para a realização dos testes de quantificação das citocinas, foram coletados cinco mililitros de sangue de cada indivíduo em tubos a vácuo sem anticoagulante, que permaneceram à temperatura ambiente até a separação do soro. Após a separação, o sangue foi centrifugado, e alíquotas de soro foram mantidas a -20°C até o momento da realização dos ensaios.

No momento da coleta do sangue, foi realizada a pesquisa de parasitos pelo exame da gota espessa, método recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2005).

2.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA

A pesquisa de parasitos foi realizada por técnicos especializados do Instituto Evandro Chagas, por meio do exame parasitológico, pela técnica da gota espessa. Uma amostra de sangue foi obtida pela punção da polpa digital do paciente. As preparações sanguíneas foram coradas pelo Método de Walker,

utilizando-se o corante Giemsa. A leitura foi realizada em microscópio ótico, determinando-se o número de parasitos por μL de sangue.

2.3 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS CITOCINAS

A detecção das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, conforme recomendado pelo fabricante do kit (BD Biosciences – Pharmingen, San Diego, USA). A placa foi sensibilizada com anticorpos monoclonais diluídos em tampão carbonato a 0,05 M (pH 9,6) para detecção das citocinas IL-12, IFN- γ , IL-10 e IL-4. A placa contendo os anticorpos de captura foi incubada a 4°C por 16 horas. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween 20, 0,05%, e foram adicionados 200 μL de PBS-SBF (Soro Bovino Fetal) 10%, durante uma hora, a temperatura ambiente. Após esta etapa, foram adicionados 100 μL de soro em cada poço, e a placa permaneceu a temperatura ambiente por duas horas. As amostras foram analisadas em duplicata.

Após o período de incubação, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween 20 0,05%. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção específico para a citocina a ser pesquisada. Este anticorpo estava conjugado à estreptavidina-peroxidase. Após uma hora, a reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/mL de tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. Em seguida, a placa foi incubada por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida

pela adição de 50 μ L de HCl 2N. A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA (BioTek, USA) em comprimento de onda de 450 nm (DO_{450}).

Para determinar a concentração sérica em pg/mL das citocinas IFN- γ , IL-10, IL4 e IL12, curvas padrão foram estabelecidas utilizando-se citocinas recombinantes nas concentrações que variaram de 4,7 a 300 pg/mL, obtidas por diluição seriada em PBS-SBF 10%. Desta forma, foram obtidas as seguintes concentrações para a curva padrão: 300, 150, 75, 37,5, 18,8, 9,4 e 4,7 pg/mL. Para transformar os valores de densidade ótica em pg/mL, utilizamos o software GraphPad InStat (versão 3.01, 1998).

2.4 OBTENÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico do parasito foi realizada pela técnica do Fenol/Clorofórmio, após lise celular com adição de proteinase K. Foram utilizados 150 μ L de sangue, obtido a partir do coágulo sanguíneo. Após a separação do soro, o material foi mantido a -20°C , e no momento da extração foi diluído em igual volume de PBS. Em seguida, foram adicionados 480 μ L da solução de extração (0,375 M NaCl / 0,12 M EDTA pH 8,0, proteinase K 20 mg/mL e SDS 20%), e foi mantido a 37°C , durante 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 3.500 g, a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, foram realizados dois ciclos de extração com 500 μ L de

fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, e uma extração com 500 μL de clorofórmio. No final de cada ciclo, as fases foram separadas por centrifugação a 10.000 g a temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Em seguida, foram transferidos 400 μL do sobrenadante para um tubo contendo 40 μL de acetato de sódio 3M (pH 4,7), e foi adicionado 1,0 mL de etanol absoluto gelado. Após homogeneizar lentamente por inversão, o material foi mantido a -20°C , durante 16 horas. Decorrido esse período, o material foi centrifugado a 10.000 g, durante 1 hora. O sobrenadante foi desprezado, e foram adicionados 200 μL de etanol 70% gelado ao precipitado, que foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 g. Após descartar o sobrenadante e deixar o precipitado secar ao ar, foram adicionados 50 μL de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0).

A quantificação do DNA foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O DNA foi mantido a -20°C até o momento do uso.

2.5 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO IFNG+874

A técnica de ASO-PCR (*allele specific oligonucleotide – polymerase chain reaction*) foi utilizada para a detecção do polimorfismo no gene de INF- γ , na posição +874, a partir do DNA extraído de 77 indivíduos infectados por *P. vivax*. Nesta técnica, utiliza-se um iniciador comum [INF- γ (+874) PC] para ambos os

alelos e um iniciador [INF- γ (+874) T] que detecta somente o alelo IFNG+874T ou outro [INF- γ (+874) A] que detecta somente o alelo IFNG+874A.

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 30 μ L, contendo 500 ng de DNA, 0,2 μ M de cada dNTP, 5 pmol/ μ L de cada iniciador, MgCl₂ a 2,0 mM, KCl a 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores utilizados nesta reação foram: INF- γ (+874) PC: 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3'; INF- γ (+874) T: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3' ou INF- γ (+874) A: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3', os quais amplificam um segmento de 262 pb (Pravica *et al.*, 1999). As amplificações foram feitas no termociclador *Peltier Thermal Cycler* (Biocycler, USA).

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C (desnaturação) por 40 segundos, 60°C (hibridização) por 40 segundos, 72°C (extensão) por 50 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A interpretação do resultado foi determinada pela presença ou ausência do produto amplificado, conforme o iniciador alelo específico utilizado. Para o gene IFNG, os produtos amplificados apresentaram 262 pb. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, contendo 5 μ L de *Syber Safe* (Invitrogen, USA), e foram visualizados em transiluminador com fonte de luz ultravioleta (Vilber Lourmat, França).

2.6 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO IL10-1082

Os alelos A e G, localizados na posição -1082 do gene que codifica a IL-10, foram identificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de digestão enzimática com a endonuclease de restrição MnlI. A substituição do nucleotídeo G pelo nucleotídeo A dá origem a um sítio de restrição na região promotora do gene de IL-10, o qual é reconhecido pela enzima.

A PCR foi realizada em um volume de 50 μ L contendo 100 ng de DNA extraído, 200 Mm de cada dNTP, 200 nmol de cada iniciador, KCl_2 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores envolvidos nesta reação foram (-1082Fw) 5'-TCTGAAGAAGTCCTGATGTC-3' e (-1082Rv) 5'-CTCTTACCTATCCCTACTTCC-3', os quais amplificam um produto de 190 pares de base (Lee *et al.*, 2005). Também foram analisadas 77 amostras de DNA para a caracterização do polimorfismo IL10-1082.

O produto amplificado de 190pb foi submetido à incubação a 37°C, durante 4 horas, na presença da endonuclease de restrição MnlI, sendo clivado em 125pb e 65pb para ambos os alelos, devido a presença de um sítio de restrição natural. Para o alelo G, selvagem, há ainda um outro sítio de restrição, fazendo com que este alelo seja clivado em 93pb, 65pb e 32pb. Porém, com a troca de G para A, o segundo sítio de restrição deixa de existir, alterando o padrão de bandas para 125pb e 65pb.

Os produtos da amplificação e da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 e 4%, respectivamente, corados com 5 μ L de *Syber Safe* (Invitrogen, USA), e foram visualizados em transiluminador com fonte de luz ultravioleta (Vilber Lourmat, França).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram organizados em tabelas de contingência, e a análise estatística foi realizada no programa BioEstat 5.0v (Ayres *et al.*, 2007), sendo estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O teste t foi utilizado para comparar as médias dos grupos homocedásticos e com distribuição normal, enquanto que o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar as médias dos grupos heterocedásticos. A análise de variância, seguida ou não do teste de *Tukey*, foi utilizada para verificar a associação da concentração sérica das citocinas IFN- γ e IL-10 com a densidade parasitária e com o número de episódios prévios de malária.

3 RESULTADOS

3.1 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-12 NA RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax*.

Com a finalidade de avaliar a participação de citocinas que caracterizam a ativação de células da imunidade inata e de diferentes subpopulações de linfócitos, analisamos a concentração das citocinas IL-12, IL-4, IFN- γ e IL-10 em amostras de soro de indivíduos infectados por *P. vivax*.

A concentração sérica da citocina IFN- γ foi analisada em 132 amostras de indivíduos infectados por *P. vivax* e em 86 amostras de indivíduos do grupo controle (Tabela 1). Em indivíduos infectados, observamos que houve aumento na concentração desta citocina. Neste grupo, a média da concentração de IFN- γ foi $44,50 \pm 75,05$ pg/mL, enquanto que no grupo controle foi $1,47 \pm 8,43$ pg/mL. A diferença observada foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). No grupo de indivíduos infectados, a concentração variou de 0,0 a 332,85 pg/mL, enquanto que no grupo controle variou de 0,0 a 68,09 pg/mL.

A concentração da citocina IL-10 foi analisada em amostras de soro de 131 indivíduos infectados por *P. vivax* e 77 indivíduos do grupo controle (Tabela 1). No grupo de indivíduos infectados, a média das concentrações de IL-10 foi $283,80 \pm 216,71$ pg/mL, enquanto no grupo controle foi $2,07 \pm 4,31$ pg/mL. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Em indivíduos

infectados, o aumento observado nos níveis de IL-10 foi cerca de 100 vezes quando comparado ao grupo controle. Os níveis séricos de IL-10 variaram de 0,0 a 586,33 pg/mL no grupo de indivíduos infectados, e de 0,0 a 27,51 pg/mL no grupo controle.

A concentração da citocina IL-4 foi analisada em amostras de soro de 81 indivíduos infectados e 78 indivíduos do grupo controle (Tabela 1). Somente no grupo de infectado houve detecção desta citocina, porém os níveis foram muito baixos. A média da concentração de IL-4 neste grupo foi $0,32 \pm 1,48$ pg/mL. No grupo controle todas as amostras foram negativas, e no grupo de indivíduos infectados as concentrações variaram de 0,0 a 9,75 pg/mL. Como os níveis séricos de IL-4 foram muito baixos nos indivíduos do grupo infectado e todos os indivíduos do grupo controle foram negativos, a análise estatística não foi realizada.

A concentração sérica da citocina IL-12 foi determinada em 78 amostras de indivíduos infectados e em 77 amostras de indivíduos do grupo controle (Tabela 1). Nos dois grupos os níveis séricos foram baixos, sendo que no grupo de indivíduos infectados a concentração média de IL-12 foi menor que a observada no grupo controle. A média da concentração no grupo infectado foi $3,43 \pm 12,65$ pg/mL, e no grupo controle foi $7,03 \pm 14,83$ pg/mL. A variação da concentração sérica de IL-12 no grupo de indivíduos infectados foi de 0,0 a 99,65 pg/mL, enquanto que no grupo controle variou de 0,0 a 80,71pg/mL. Como os níveis séricos de IL-12 foram muito baixos tanto no grupo de indivíduos infectados como no controle, a análise estatística não foi realizada.

Tabela 1 - Concentração sérica das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-12 em indivíduos infectados por *P. vivax*.

Citocinas	Concentração sérica das citocinas (pg/mL) Média \pm dp (Variação)		
	Indivíduos infectados	Indivíduos do grupo controle	p
IFN-γ	44,50 \pm 75,05 (0,0 - 332,85)	1,47 \pm 8,43 (0,0 - 68,09)	<0,0001
IL-10	283,80 \pm 216,71 (0,0 - 586,33)	2,07 \pm 4,31 (0,0 - 27,51)	<0,0001
IL-4	0,32 \pm 1,48 (0,0 - 9,75)	0,0 \pm 0,0 (0,0 - 0,0)	NR*
IL-12	3,43 \pm 12,65 (0,0 - 99,65)	7,03 \pm 14,83 (0,0 - 80,71)	NR*

Indivíduos infectados: IFN- γ (n=132), IL-10 (n=131), IL-4 (n=81) e IL-12 (n=78).

Grupo controle: IFN- γ (n=86), IL-10 (n=77), IL-4(n=78) e IL-12 (n=77).

*NR: Não realizado.

3.2. PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ E IL-10 NO CONTROLE DA DENSIDADE PARASITÁRIA NA MALÁRIA CAUSADA POR *P. vivax*.

Com o intuito de verificar se a presença destas citocinas pode contribuir para o controle da parasitemia, as concentrações séricas das citocinas IFN- γ e IL-10 foram comparadas em grupos de indivíduos que, de acordo com o número de parasitos no sangue periférico, foram distribuídos em quatro faixas de densidade parasitária. As faixas analisadas incluíram indivíduos que apresentaram menos de 1.000, 1001 a 5.000, 5.001 a 10.000, e mais de 10.000 parasitos/ μ L.

Na Tabela 2, podemos observar que nas diferentes faixas de densidade parasitária os níveis séricos de IFN- γ aumentaram, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. No grupo de indivíduos com menor densidade parasitária (≤ 1.000 parasitos/ μL), a média das concentrações foi $30,87 \pm 71,26$ pg/mL. No grupo com densidade parasitária de 1.001 a 5.000 parasitos/ μL a média foi $37,81 \pm 69,95$ pg/mL. No grupo que apresentou densidade parasitária de 5.001 a 10.000 parasitos/ μL houve pequeno aumento na concentração de IFN- γ ($49,08 \pm 71,99$ pg/mL). Na faixa de densidade parasitária mais alta (> 10.000 parasitos/ μL), a média da concentração sérica desta citocina foi $63,22 \pm 77,67$ pg/mL, porém esta elevação da concentração de IFN- γ em relação aos outros grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,5671$).

Também realizamos outra análise sem distribuir a densidade parasitária em faixas, e verificamos que não houve correlação ($r=0,0737$) entre a concentração de IFN- γ e a parasitemia, apesar da tendência de aumento observada entre a faixa de parasitemia mais baixa (≤ 1.000 parasitos/ μL) e a faixa de parasitemia mais alta (> 10.000 parasitos/ μL).

Para avaliar se a IL-10 pode estar regulando mecanismos efetores que atuam no controle do número de parasitos, analisamos os níveis séricos desta citocina nas diferentes faixas de densidade parasitária.

Na Tabela 2, observamos que houve aumento nos níveis séricos de IL-10 de acordo com o aumento na densidade parasitária. No grupo com densidade parasitária baixa (≤ 1.000 parasitos/ μL) a média da concentração desta

citocina foi $172,68 \pm 184,56$ pg/mL. Na faixa de 1.001 a 5.000 parasitos/ μ L, aumentou para $298,77 \pm 222,40$ pg/mL. Nas faixas de densidade parasitárias mais altas (5.001 a 10.000 parasitos/ μ L e >10.000 parasitos/ μ L), as concentrações foram semelhantes, $324,34 \pm 212,07$ pg/mL e $364,31 \pm 213,57$ pg/mL, respectivamente.

Tabela 2 - Concentração sérica das citocinas IFN- γ e IL-10 nas diferentes faixas de densidade parasitária.

Faixas de densidade parasitária (parasitos/ μ L)	Concentração sérica das citocinas (pg/mL)	
	Média \pm dp (Variação)	
	IFN- γ	IL-10
≤ 1.000 (n=30)	$30,87 \pm 71,26$ (0,0 - 324,55)	$172,68 \pm 184,56$ (0,0 - 573,11)
1.001 - 5.000 (n=34)	$37,81 \pm 69,95$ (0,0 - 287,69)	$298,77 \pm 222,40$ (4,06 - 576,89)
5.001 - 10.000 (n=38)	$49,08 \pm 71,99$ (0,0 - 332,85)	$324,34 \pm 212,07$ (0,75 - 586,33)
>10.000 (n=19)	$63,22 \pm 77,67$ (0,0 - 298,88)	$364,31 \pm 213,57$ (0,0 - 579,41)

A comparação das concentrações séricas de IL-10 nas diferentes faixas de densidade parasitária mostrou que houve diferença estatisticamente

significativa entre o grupo ≤ 1.000 parasitos/ μL com o grupo 5.001 a 10.000 parasitos/ μL ($p < 0,05$) e o grupo ≤ 1.000 parasitos/ μL com > 10.000 parasitos/ μL ($p < 0,05$). A comparação entre as demais faixas não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$). Na análise de correlação, verificamos que apesar do aumento da concentração de IL-10 na faixa das parasitemias mais altas a correlação foi baixa ($r = 0,1379$).

3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉVIA À MALÁRIA CAUSADA POR *P. vivax* NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS CITOCINAS IFN- γ E IL-10

A concentração sérica das citocinas IFN- γ e IL-10 também foi analisada em grupos de indivíduos infectados por *P. vivax*, distribuídos de acordo com o número de episódios prévios de malária.

No grupo que relatou nunca ter tido malária, a média da concentração de IFN- γ foi $81,84 \pm 102,59$ pg/mL, conforme observado na Tabela 3. Nos grupos de indivíduos que relataram exposição prévia, a concentração desta citocina no soro foi menor, quando comparamos com o grupo de indivíduos primoinfectados. No grupo que relatou exposição prévia, observamos que a reexposição não contribuiu para a produção desta citocina. As médias das concentrações nos grupos que relataram um ou mais de um episódio foram $29,08 \pm 58,84$ pg/mL e $21,41 \pm 49,42$ pg/mL, respectivamente.

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa na comparação entre o grupo que nunca teve malária (primoinfectados) e os grupos que relataram um ou mais de um episódio ($p < 0,05$), sugerindo que na primeira exposição ao parasito os níveis séricos de IFN- γ foram mais altos, quando comparados com os níveis séricos dos indivíduos que relataram episódio prévio de malária. Nos dois grupos que relataram exposição prévia as concentrações foram semelhantes, sugerindo que a reexposição ao parasito não influenciou na produção de IFN- γ ($p > 0,05$).

A análise para avaliar o efeito da exposição na concentração de IL-10 mostrou que houve aumento da concentração desta citocina, quando comparamos o grupo de indivíduos que nunca teve malária (primoinfectados) com os grupos de indivíduos que relataram exposição prévia ao parasito (Tabela 3). No grupo que relatou nunca ter tido malária, a média foi $326,47 \pm 196,09$ pg/mL. No grupo de indivíduos com 1 episódio prévio de malária, foram detectados os menores níveis séricos de IL-10, a média foi $184,78 \pm 189,08$ pg/mL. No grupo de indivíduos que relatou ter tido mais de um episódio, a média foi $265,96 \pm 215,08$ pg/mL. Embora no grupo de primoinfectados a concentração de IL-10 tenha sido maior que nos grupos de indivíduos que relataram exposição, não houve diferença estatística ($p = 0,0861$). Este resultado mostra que a reexposição ao *P. vivax* não influenciou na produção de IL-10.

Tabela 3 - Comparação das concentrações séricas das citocinas IFN- γ e IL-10 no grupo de indivíduos infectados por *P. vivax*, distribuídos de acordo com o número de episódios prévios de malária.

Número de episódios prévios de malária	Concentração sérica das citocinas (pg/mL)	
	Média \pm dp (Variação)	
	IFN- γ	IL-10
Nunca teve malária (n=12)	81,84 \pm 102,59 (0,0 – 287,69)	326,47 \pm 196,09 (65,28 – 570,59)
1 episódio (n=32)	29,05 \pm 58,84 (0,0 – 298,88)	184,78 \pm 189,08 (0,0 – 533,45)
> 1 episódio (n=41)	21,41 \pm 49,42 (0,0 – 281,70)	265,96 \pm 215,08 (0,0 – 570,59)

IFN- γ : Nunca teve x 1 episódio ($p < 0,05$), Nunca teve x > 1 episódio ($p < 0,05$), 1 episódio x > 1 episódio ($p > 0,05$).

IL-10: Nunca teve x 1 episódio ($p > 0,05$), Nunca teve x > 1 episódio ($p > 0,05$), 1 episódio x > 1 episódio ($p > 0,05$).

3.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICA E GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS IFN- γ (IFNG+874) E IL-10 (IL10-1082)

Para determinar se polimorfismos nos genes que codificam o IFN- γ e a IL-10 estão associados com a menor produção destas citocinas na malária, investigamos o polimorfismo na posição +874 do gene que codifica o IFN- γ e na

posição -1082 do gene que codifica a IL-10, em um grupo de 77 indivíduos infectados por *P. vivax*.

Todas as variantes alélicas foram detectadas tanto no polimorfismo IFNG+874 quanto no IL10-1082 (Figura 2). Além disso, as frequências genotípicas dos polimorfismos IFNG+874 e IL10-1082 estão em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p=0,5388$; $p=0,7515$, respectivamente).

Na Tabela 4, podemos observar que as frequências dos alelos A e T para o polimorfismo IFNG+874 foram 70,13% (108/154) e 29,87% (46/154), respectivamente. Na análise das frequências genotípicas, o genótipo homozigoto mutante AA foi o mais prevalente, e a frequência deste genótipo foi 50,65% (39/77). O genótipo heterozigoto AT apresentou frequência de 38,96% (30/77). O genótipo homozigoto selvagem TT foi o menos prevalente, sendo que apenas 10,39% (8/77) dos indivíduos infectados apresentaram este genótipo.

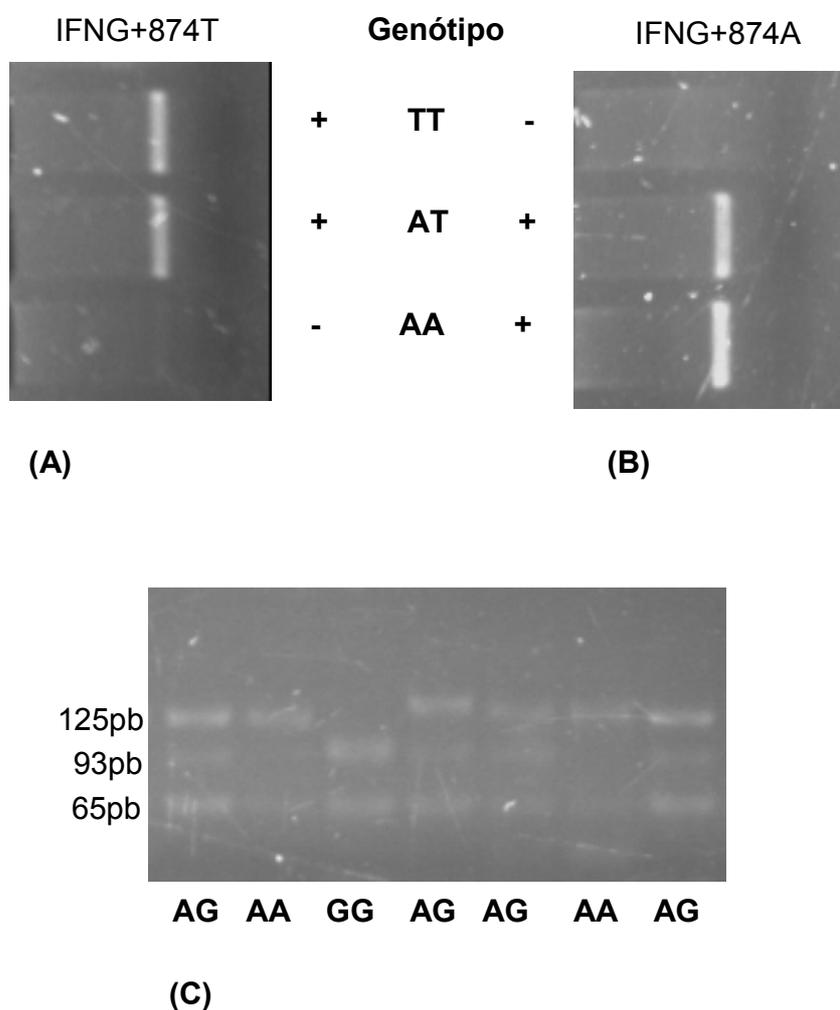


Figura 2: Genotipagem dos polimorfismos nos genes do IFN- γ (IFNG+874T) e da IL-10 (IL10 -1082). (A) Amplificação da seqüência de 262 pb do gene que codifica o IFN- γ para o alelo IFNG+874T. (B) Amplificação para o alelo IFNG+874A. (C) Digestão enzimática do produto amplificado de 190 pb do gene que codifica a IL-10, alelo G (93, 65 e 32pb) e alelo A (125 e 65pb).

Tabela 4 - Distribuição das freqüências alélica e genotípica do polimorfismo IFNG+874 em indivíduos infectados por *P. vivax*.

Análise genética	Freqüências n (%)	
	Alélica	Genotípica
Alelos		
A	108 (70,13)	---
T	46 (29,87)	---
Genótipos		
AA	---	39 (50,65)
AT	---	30 (38,96)
TT	---	8 (10,39)
Total	154 (100)	77 (100)

Na Tabela 5, podemos observar que as freqüências dos alelos A e G para o polimorfismo IL10-1082 foram 70,78% (109/154) e 29,22% (45/154), respectivamente. Na análise das freqüências genotípicas, o genótipo homozigoto mutante AA e o heterozigoto AG ocorreram com freqüências semelhantes. A freqüência destes genótipos foram 49,35% (38/77) e 42,86% (33/77), respectivamente. O genótipo homozigoto selvagem GG foi o menos prevalente, sendo que apenas 7,79% (6/77) dos indivíduos infectados apresentaram este genótipo.

Tabela 5 - Distribuição das freqüências alélica e genotípica do polimorfismo IL10-1082 em indivíduos infectados por *P. vivax*.

Análise genética	Frequências n (%)	
	Alélica	Genotípica
Alelos		
A	109 (70,78)	---
G	45 (29,22)	---
Genótipos		
AA	---	38 (49,35)
AG	---	33 (42,86)
GG	---	6 (7,79)
Total	154 (100)	77 (100)

3.5 INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IFNG+874 NOS NÍVEIS SÉRICOS DE IFN- γ E NA DENSIDADE PARASITÁRIA

Com o intuito de verificar se o polimorfismo IFNG+874 influencia nos níveis séricos de IFN- γ , comparamos as médias das concentrações de IFN- γ no grupo de indivíduos homozigotos mutantes (genótipo AA) com as concentrações do grupo de indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (genótipos AT e TT) (Tabela 6). No grupo com genótipo AA, composto por 39 indivíduos, a concentração de IFN- γ foi $30,85 \pm 54,22$ pg/mL, com variação de 0,0 a 281,70 pg/mL. No grupo que apresenta o alelo selvagem, composto por 30 indivíduos com genótipo AT e 8 com genótipo TT, a média da concentração de IFN- γ foi

76,60 ± 99,54 pg/mL, variando de 0,0 a 332,85 pg/mL. Neste grupo, a concentração de IFN- γ foi mais alta, quando comparada com o grupo com genótipo AA ($p=0,0186$). Desta forma, observamos que na malária causada por *P. vivax*, o polimorfismo no gene do IFN- γ influenciou na produção da citocina, sendo associado com a produção diminuída de IFN- γ .

Para determinar se o polimorfismo IFNG+874 influencia na densidade parasitária, as médias das densidades parasitárias foram comparadas no grupo de indivíduos homocigotos mutantes (genótipo AA) e no grupo de indivíduos que apresentam o alelo selvagem (genótipos AT e TT) (Tabela 6). A média da densidade parasitária no grupo de indivíduos homocigotos mutantes foi 5.126 ± 4.779,98 parasitos/ μ L, com variação de 12 a 20.000 parasitos/ μ L e no grupo que tem a presença do alelo selvagem, a média da densidade parasitária foi 5.917,76 ± 7.516,64 parasitos/ μ L, com variação de 25 a 40.000 parasitos/ μ L. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,4248$). Este resultado mostra que o polimorfismo influenciou na concentração da citocina, mas não está associado diretamente com a eliminação do parasito.

Tabela 6 – Concentração sérica de IFN- γ e densidade parasitária no grupo de indivíduos homozigotos mutantes (genótipo AA) e no grupo de indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (genótipos AT e TT) para o polimorfismo IFNG+874.

Genótipo	Concentração sérica de IFN-γ (pg/mL) Média \pm dp (Variação)	Densidade parasitária (parasitos/μL) Média \pm dp (Variação)
AA (n=39)	30,85 \pm 54,22 (0,0 – 281,70)	5.126 \pm 4.779,98 (12 – 20.000)
AT e TT (n=38)	76,60 \pm 99,54 (0,0 – 332,85)	5.917,76 \pm 7.516,64 (25 – 40.000)
p	0,0186	0,4348

3.6 INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IL10-1082 NOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-10 E NA DENSIDADE PARASITÁRIA

Neste estudo também analisamos se o polimorfismo na região promotora do gene da IL-10 (IL10-1082) pode influenciar nos níveis séricos e na densidade parasitária. A concentração sérica de IL-10 foi analisada no grupo de indivíduos homozigotos mutantes (genótipo AA) e no grupo de indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (genótipos AG e GG).

No grupo de homozigotos mutantes AA, composto por 38 indivíduos, a média da concentração sérica de IL-10 foi $301,47 \pm 213,30$ pg/mL, variando de 4,68 a 578,46 pg/mL. No grupo que tem a presença do alelo selvagem, composto por 33 indivíduos com genótipo AG e 6 com genótipo GG, a média da concentração sérica de IL-10 foi $360,84 \pm 199,00$ pg/mL, variando de 37,11 a 586,33 pg/mL (Tabela 7). As concentrações foram semelhantes nos dois grupos ($p=0,1064$). Porém, no grupo de indivíduos homozigotos mutantes AA, os níveis séricos de IL-10 foram mais baixos, quando comparados com o grupo que apresenta o alelo selvagem (AG e GG). Devido ao pequeno número de indivíduos com genótipo GG, não foi possível estabelecer comparações estatísticas entre o grupo homozigoto selvagem e o homozigoto mutante.

Com o objetivo de verificar uma possível associação entre o polimorfismo IL10-1082 e a densidade parasitária, a média da densidade parasitária foi comparada entre o grupo de indivíduos homozigotos mutantes (genótipo AA) e o grupo de indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (genótipos AG e GG) (Tabela 7). A média da densidade parasitária no grupo de indivíduos homozigotos mutantes foi $5.287,49 \pm 7.392,26$ parasitos/ μ L, com variação de 12 a 40.000 parasitos/ μ L. No grupo que tem a presença do alelo selvagem, a média da densidade parasitária foi $5.760,53 \pm 5.076,04$ parasitos/ μ L, com variação de 200 a 20.000 parasitos/ μ L. A comparação estatística mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0833$).

Tabela 7 – Concentração sérica de IL-10 e densidade parasitária no grupo de indivíduos homozigotos mutantes (genótipo AA) e no grupo de indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (genótipos AG e GG) para o polimorfismo IL10-1082.

Genótipo	Concentração sérica de IL-10 (pg/mL) Média ± dp (Variação)	Densidade parasitária (parasitos/μL) Média ± dp (Variação)
AA (n=38)	301,47 ± 213,30 (4,68 – 578,46)	5.287,49 ± 7.392,26 (12 – 40.000)
AG e GG (n=39)	360,84 ± 199,00 (37,11 – 586,33)	5.760,53 ± 5.076,04 (200 – 20.000)
p	0,1064	0,0833

3.7 A ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS (IFNG+874 / IL10-1082) NÃO INFLUENCIA NO CONTROLE DA DENSIDADE PARASITÁRIA

A associação dos polimorfismos em indivíduos com genótipos homozigotos mutantes tanto para IFN- γ quanto para IL-10 pode contribuir para o estabelecimento de resposta imune pouco efetora na eliminação dos parasitos. A fim de verificar se isto pode estar ocorrendo na malária causada por *P. vivax*, analisamos grupos de indivíduos que apresentaram os dois polimorfismos,

genótipos IFNG+874 e IL10-1082. Para tanto, as médias das densidades parasitárias foram comparadas entre dois grupos, um composto pelos indivíduos com genótipos homozigotos mutantes (IFNG+874AA / IL10-1082AA) e outro com os genótipos que têm a presença do alelo selvagem (IFNG+874AT ou TT / IL10-1082 AG ou GG).

Na Tabela 8, podemos observar que no grupo IFNG+874AA / IL10-1082AA, com baixa produção de IFN- γ , a média da densidade parasitária foi $4.840 \pm 5.160,46$ parasitos/ μ L, com variação de 12 a 20.000 parasitos/ μ L. No grupo IFNG+874AT ou TT / IL10-1082 AG ou GG, com alta produção de IFN- γ , a média da densidade parasitária foi $6.060 \pm 5.664,14$ parasitos/ μ L, variando de 200 a 20.000 parasitos/ μ L. Nos dois grupos, a concentração de IL-10 foi semelhante. No grupo com maior produção de IFN- γ (IFNG+874AT ou TT / IL10-1082 AG ou GG), a média da densidade parasitária foi maior, porém esta diferença não foi significativa ($p=0,2436$).

Tabela 8 – Comparação da densidade parasitária em grupos de indivíduos com os dois polimorfismos (IFN- γ e IL10) agrupados nos genótipos homozigoto mutante (IFNG+874AA / IL10-1082AA) ou com a presença do alelo selvagem (IFNG+874AT ou TT / IL10-1082 AG ou GG).

Genótipos	Densidade parasitária (parasitos/μL) Média \pm dp (Variação)
IFNG+874AA / IL10-1082AA (n=19)	4.840 \pm 5.160,46 (12 – 20.000)
IFNG+874AT ou TT / IL10-1082 AG ou GG (n=20)	6.060 \pm 5.664,14 (200 – 20.000)
p	0,2436

Também analisamos a densidade parasitária em um grupo de indivíduos que apresentaram genótipo homozigoto mutante apenas para uma das citocinas. Os indivíduos que apresentaram genótipo homozigoto mutante apenas para IL-10 (IL10-1082AA) e o alelo selvagem para IFN- γ (IFNG+874AT ou TT) constituíram o grupo IFNG+874AT ou TT / IL10-1082AA. Neste grupo a densidade parasitária foi semelhante ao grupo constituído por indivíduos que apresentaram genótipo homozigoto mutante apenas para IFN- γ (IFNG+874AA), mas não no gene da IL-10 (IL10-1082 AG ou GG), os quais constituíram o grupo

IFNG+874AA / IL10-1082 AG ou GG (Tabela 9). A média da densidade parasitária foi $3.745,59 \pm 3.862,58$ parasitos/ μ L no grupo de indivíduos com o genótipo IFNG+874AT ou TT / IL10-1082AA, sendo que a parasitemia variou de 25 a 12.000 parasitos/ μ L. No grupo de indivíduos com o genótipo IFNG+874AA / IL10-1082 AG ou GG, a média da densidade parasitária foi mais elevada ($5.427,78 \pm 4.472,11$ parasitos/ μ L), a parasitemia variou de 200 a 17.500 parasitos/ μ L, porém a diferença observada entre os dois grupos não foi significativa ($p=0,0880$).

Tabela 9 – Comparação da densidade parasitária no grupo de indivíduos com genótipo homozigoto mutante apenas para IFN- γ (IFNG+874AA / IL10-1082 AG ou GG) e no grupo com genótipo homozigoto mutante apenas para IL-10 (IFNG+874AT ou TT / IL10-1082AA).

Genótipos	Densidade parasitária (parasitos/μL) Média \pm dp (Variação)
IFNG+874AT ou TT / IL10-1082AA (n=17)	$3.745,59 \pm 3.862,58$ (25 – 12.000)
IFNG+874AA / IL10-1082 AG ou GG (n=18)	$5.427,78 \pm 4.472,11$ (200 – 17.500)
p	0,0880

4. DISCUSSÃO

Na malária, a resposta imune é complexa, e vários aspectos ainda são pouco compreendidos. Os estudos acerca da resposta imune na malária causada por *P. vivax* são importantes, considerando que, no Brasil, esta espécie é responsável por 75 a 80% dos casos de malária. Porém, tanto o cultivo do parasito como a infecção experimental é possível em condições muito restritas. O cultivo depende da obtenção de reticulócitos, e a infecção experimental é realizada em primatas. Diante destas limitações, os estudos na malária humana são valiosos mesmo considerando as limitações para verificar efeitos diretos dos mecanismos efetores e reguladores da resposta imune.

Neste estudo, analisamos a participação de citocinas que estão relacionadas com a ativação de células da imunidade inata (IL-12), ativação da imunidade humoral (IL-4), ativação da imunidade celular (IFN- γ) e citocina que atua na regulação da resposta imune (IL-10). A quantificação destas citocinas mostrou que os níveis séricos de IFN- γ e de IL-10 estão elevados na malária causada por *P. vivax*. A participação destas citocinas tem sido bem descrita na malária causada por *P. falciparum*, porém, recentemente, Fernandes e colaboradores (2008) mostraram níveis elevados de IFN- γ em indivíduos infectados por *P. vivax* e por *P. falciparum*, mas observou níveis elevados de IL-10 somente na infecção por *P. vivax*. Outros estudos também mostraram níveis

séricos elevados de IL-10 em indivíduos infectados por *P. vivax* (Zeyrek *et al.*, 2006) e por *P. falciparum* (Ong'echa *et al.*, 2007).

A produção destas citocinas também foi observada em estudo *in vitro*. Siddiqui e colaboradores (2007) mostraram que houve produção de IFN- γ e de IL-10 por células monucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos infectados por *P. vivax*, estimuladas em cultura com a proteína recombinante PvTARAAg55 e re-estimuladas com fitohemaglutinina (PHA).

Os níveis séricos de IFN- γ apresentaram variação individual, mas a concentração média (44,50 pg/mL) foi semelhante à observada em um estudo recente que analisou níveis séricos. Nesse estudo a concentração de IFN- γ em indivíduos infectados por *P. vivax* foi 32,87 pg/mL (Alam *et al.*, 2008). Fernandes e colaboradores (2008), que também analisaram amostras coletadas no estado do Pará, observaram produção desta citocina tanto em indivíduos infectados por *P. vivax* como por *P. falciparum*, sendo que a concentração estava em torno de 100 pg/mL. Outro estudo observou que, durante os episódios de febre alta os níveis de IFN- γ estavam aumentados. A concentração média de IFN- γ em indivíduos infectados por *P. vivax* e com hiperpirexia foi 312,60 pg/mL, enquanto que nos infectados e sem hiperpirexia foi 112,90 pg/mL (Seoh *et al.*, 2003).

Estudo realizado na Coréia do Sul mostrou que a concentração IFN- γ em indivíduos infectados por *P. vivax* e sem disfunção hepática foi baixa (24,7 pg/mL), enquanto em indivíduos infectados e com disfunção hepática os níveis estavam elevados (460,70 pg/mL) (Yeom *et al.* 2003). A produção desta citocina

também foi mostrada em culturas de CMSP estimuladas com o antígeno recombinante, foram detectados 23,16 pg/mL. Após o re-estímulo com PHA, a concentração média de IFN- γ não aumentou, foram detectados 19,35 pg/mL (Siddiqui *et al.*, 2007).

Recentemente, alguns estudos mostraram a produção de IFN- γ na malária causada por *P. vivax*, porém não avaliaram a sua participação no controle da parasitemia. No nosso estudo, observamos que houve um aumento desta citocina na faixa mais alta de parasitemia, mas esta diferença não foi significativa. Também observamos correlação baixa entre a concentração desta citocina e a parasitemia. No entanto, não foi possível estabelecer a participação do IFN- γ no controle da parasitemia. Duas situações podem ter contribuído para isto, uma pode ter sido o tamanho da amostra e outra a necessidade de análises mais precisas para determinar o número de parasitos no sangue periférico, uma vez que pode haver variação na leitura da gota espessa. Na área da gota espessa é possível contar até 800 campos, mas a recomendação do Ministério da saúde é a contagem de apenas 100 campos.

Observamos, neste estudo, que a concentração sérica de IL-10 foi de 283,80pg/mL. Esta concentração foi mais alta, quando comparada com um estudo realizado na Turquia, no qual foram incluídos 79 indivíduos infectados por *P. vivax*, e a concentração de IL-10 foi 54,2pg/mL (Zeyrek *et al.*, 2006). Em um estudo realizado no Brasil, no qual as amostras também foram coletadas em

Belém, os níveis de IL-10 foram semelhantes aos observados no nosso estudo (Fernandes *et al.*, 2008).

Outros estudos que analisaram a produção por CMSP estimuladas em cultura com antígenos recombinantes mostraram níveis elevados desta citocina. A concentração média de IL-10, detectada em cultura na presença da proteína PvTRAg, foi de 177,55 pg/mL (Alam *et al.*, 2008). Em indivíduos infectados e sem disfunção hepática, a concentração média de IL-10 foi 68,70 pg/mL, e nos infectados que apresentavam disfunção hepática foi 141,90pg/mL (Yeom *et al.*, 2003). Nestas duas situações, a concentração foi menor que a observada no nosso estudo. Após o estímulo *in vitro* de CMSP com antígeno recombinante de *P. vivax*, a concentração desta citocina foi 157,42 pg/mL, e após o reestímulo com PHA foi 142,07 pg/mL (Siddiqui *et al.*, 2007).

Seoh e colaboradores (2003) observaram que a concentração média de IL-10 em indivíduos infectados por *P. vivax* e com hiperpirexia foi de 583,40 pg/mL e naqueles sem hiperpirexia foi significativamente menor (142,40 pg/mL).

A concentração média de IL-10 observada no nosso estudo foi mais alta quando comparada com outros estudos realizados *in vitro* ou *in vivo*. Neste estudo, não foi possível associar a concentração com a intensidade da febre, pois, no momento da coleta da amostra de soro, não foi realizada a verificação da temperatura corporal.

A resposta imune na malária causada por *P. vivax* é caracterizada, portanto, pela participação de citocina do perfil Th1 (IFN- γ), as quais são

importantes para o controle eficiente da densidade parasitária (Siddiqui *et al.*, 2007). A IL-10 participa da regulação da resposta pró-inflamatória desencadeada pelo IFN- γ , bloqueando a síntese desta citocina e modulando a expressão de moléculas de MHC I e II, o que impede o desenvolvimento de respostas Th1 exacerbadas, envolvidas com a patogênese da doença. A regulação de IFN- γ pela IL-10 também foi mostrada por Brustoski e colaboradores (2005), que observaram, ao adicionar anticorpos anti-IL-10 humana em cultura de células mononucleares do cordão umbilical estimuladas com eritrócitos infectados, que a produção de IFN- γ aumentou significativamente.

Os níveis séricos das outras duas citocinas analisadas, IL-12 e IL-4, foram muito baixos. Vários trabalhos que analisaram a IL-12 em adultos e crianças com malária causada por *P. falciparum* também não verificaram produção expressiva desta citocina (Luty *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2000; Chaiyaroj *et al.*, 2004; Ong'echa *et al.*, 2007). Na malária causada por *P. vivax*, poucos estudos analisaram a concentração destas citocinas. Fernandes e colaboradores (2008) não verificaram produção de IL-12, tanto na malária causada por *P. vivax* como por *P. falciparum*. Porém, não analisaram a concentração da IL-4.

Por outro lado, alguns estudos detectaram níveis séricos elevados de IL-4 e IL-12 em indivíduos infectados por *P. vivax*. Zeyrek e colaboradores (2006) mostraram que as concentrações médias de IL-4 e IL-12 em indivíduos infectados por *P. vivax* foram 16,3 pg/mL e 174,2 pg/mL, respectivamente. Posteriormente, Alam e colaboradores (2008) detectaram concentrações médias

de IL-4 e IL-12 de 151,04 pg/mL e 104,53 pg/mL em indivíduos infectados por *P. vivax*, respectivamente.

Em 2003, Yeom e colaboradores detectaram baixos níveis séricos de IL-4 tanto em indivíduos infectados por *P. vivax* com disfunção hepática (9,7 pg/mL) como nos indivíduos infectados sem disfunção hepática (3,2 pg/mL), enquanto que os níveis séricos de IL-12 foram elevados nos indivíduos com disfunção hepática (131,80 pg/mL) e sem disfunção hepática (147,10 pg/mL).

A baixa concentração sérica de IL-12 observada no nosso estudo pode estar relacionada com o período de produção desta citocina, uma vez que as amostras analisadas foram coletadas após a manifestação de sintomas e a confirmação do diagnóstico, portanto, na fase sanguínea do ciclo de vida do parasito, após dias ou semanas do momento da infecção.

A produção de IL-12 é mais expressiva no início da resposta imune, como descrito em estudo realizado *in vitro*. Ong'echa e colaboradores (2007) mostraram que os transcritos de IL-12p40 estavam aumentados nas primeiras 24 horas após o estímulo de CMSP estimuladas com hemozoína de *P. falciparum*, porém diminuíram para níveis basais 48 horas após o estímulo. Com base na análise temporal, considerando o momento do estabelecimento da infecção e a cinética da resposta imune, podemos inferir que, provavelmente, a concentração sérica desta citocina estava em níveis basais no momento da coleta dos soros, representando, assim, apenas uma das situações esperadas. Outra explicação para este resultado seria a regulação da IL-12 pela IL-10, considerando

que nesta fase a participação das citocinas que medeiam os mecanismos efetores se sobrepõem as citocinas envolvidas com a ativação dos linfócitos.

Neste estudo, não detectamos produção de IL-4 na resposta imune contra o *P. vivax*, apesar de estar bem descrita a participação da resposta imune humoral na malária, principalmente pela produção de anticorpos das classes IgG1 e IgG3, que participam da resposta contra as formas sanguíneas do parasito (Omosun *et al.*, 2005). Na malária, a aquisição de anticorpos está bem estabelecida, porém a participação desses anticorpos na proteção ainda é controversa (Struik & Riley, 2004). A resposta imune humoral na malária pode ser mantida independente de IL-4 ou os níveis séricos desta citocina podem aumentar ou diminuir consideravelmente com o decorrer da infecção.

Por outro lado, os baixos níveis de IL-4 associados com os altos níveis de IL-10 sugerem que a participação da resposta imune reguladora na malária pode ter mais importância que a resposta Th2, como proposto por Torre e colaboradores (2002). Neste estudo, foram detectados níveis séricos reduzidos de IL-4 tanto no dia de admissão (D₀) dos indivíduos infectados por *P. falciparum* como no terceiro dia (D₃) após o aparecimento dos sintomas. Outros estudos observaram resultados semelhantes e também sugeriram participação da IL-10 na regulação da resposta mediada por IL-4, na malária causada por *P. falciparum* (Jason *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 2006).

Analisamos a concentração sérica de IFN- γ e IL-10 em diferentes faixas de densidade parasitária e não observamos associação entre níveis séricos elevados de IFN- γ e controle da parasitemia.

Concentrações séricas elevadas de IFN- γ não estavam associadas com a redução da parasitemia. Este resultado não confirma um papel importante que tem sido atribuído a esta citocina nos mecanismos efetores da malária, a eliminação das formas sanguíneas do parasito. Na malária causada por *P. vivax*, ainda não existem dados acerca desta participação. Porém, estudos sugeriram que o IFN- γ pode limitar a multiplicação parasitária em indivíduos infectados por *P. falciparum* (Farouk *et al.*, 2005; Diouf *et al.*, 2007).

Nas faixas de altas parasitemias, observamos que houve aumento na concentração sérica de IL-10. Este resultado sugere que a resposta anti-inflamatória pode estar atuando para regular a resposta pró-inflamatória, que participa tanto da ação direta para eliminação do parasito como pode contribuir para a fisiopatogenia da doença. Assim, no momento em que esta resposta pró-inflamatória é regulada por altas concentrações séricas de IL-10, a densidade parasitária aumenta. O resultado obtido neste trabalho está de acordo com outros estudos, os quais mostraram correlação positiva entre os níveis de IL-10 e a densidade parasitária em indivíduos infectados por *P. vivax* (Zeyrek *et al.*, 2006) e por *P. falciparum* (Luty *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2000; Ong'echa *et al.*, 2007).

A produção de IFN- γ e IL-10 em indivíduos primoinfectados foi maior que nos indivíduos expostos anteriormente à malária. Em relação à IL-10, observamos que a exposição prévia e a reexposição ao parasito não influenciaram na produção desta citocina. Estes resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, pela ineficácia da geração de clones de memória. Na malária, a imunidade protetora é gradualmente adquirida pela exposição natural de indivíduos que residem em áreas endêmicas, mas é rapidamente perdida no momento em que a exposição do indivíduo ao parasito deixa de existir, indicando que a memória imunológica na malária é de curta duração e requer constante exposição ao parasito (Struik & Riley, 2004; Todryk *et al.*, 2008; Roestenberg *et al.*, 2009).

A produção de células de memória de longa duração parece estar relacionada com níveis elevados de IL-2 induzidos rapidamente e com a ativação de células T produtoras de IFN- γ (Minigo *et al.*, 2007). Porém, como podemos observar, os resultados obtidos no nosso estudo sugerem que a produção de IFN- γ pode estar sendo regulada por altos níveis de IL-10.

Neste estudo também investigamos o polimorfismo na posição +874 do gene que codifica o IFN- γ e o polimorfismo na posição -1082 do gene que codifica a IL-10 para verificar se os genótipos homozigotos mutantes estão associados com a menor produção sérica destas citocinas, além de analisar as possíveis implicações dos polimorfismos sobre a densidade parasitária na malária causada por *P. vivax*. Até o momento, não há relatos de estudos na literatura que

associam os polimorfismos IFNG+874 e IL10-1082 com a malária causada por *P. vivax*. Recentemente, um estudo que investigou polimorfismos na região promotora do gene que codifica o TNF- α mostrou que o alelo A na posição -308 e o alelo C na posição -1031 estão associados com níveis séricos elevados desta citocina, porém não foi observada a associação destes alelos com a suscetibilidade à malária causada por *P. vivax* (Sohail *et al.*, 2008).

As frequências dos alelos A e T para o polimorfismo IFNG+874 foram 0,70 e 0,30, respectivamente, enquanto que as frequências dos alelos A e G para o polimorfismo IL10-1082 foram 0,71 e 0,29, respectivamente. As frequências alélicas obtidas neste estudo para ambos os polimorfismos foram semelhantes às obtidas em outras doenças infecciosas ou não infecciosas. Matos e colaboradores (2007) investigaram o polimorfismo IFNG+874 e verificaram frequências para os alelos A e T iguais a 0,63 e 0,37 em indivíduos com leishmaniose cutânea, e de 0,67 e 0,33 em indivíduos com leishmaniose mucosa, respectivamente. Em estudo realizado na China por Chen e colaboradores (2007), a prevalência do alelo mutante A foi alta, com frequência de 0,86 para este alelo e de 0,14 para o alelo T em indivíduos com púrpura trombocitopênica idiopática, enquanto que no grupo controle as frequências dos alelos A e T foram de 0,89 e 0,11, respectivamente.

O polimorfismo IL10-1082 também foi investigado em indivíduos com leishmaniose. Salhi e colaboradores (2008) verificaram frequências de 0,69 e 0,31 para os alelos A e G, respectivamente, em indivíduos infectados por *Leishmania*

braziliensis. A distribuição dessas frequências também foi descrita em indivíduos infectados pelo HIV. Chatterjee e colaboradores (2009) verificaram que as frequências para os alelos A e G foi de 0,72 e 0,28, respectivamente, em indivíduos soropositivos para HIV-1, e de 0,71 e 0,29, respectivamente, em indivíduos soronegativos para HIV-1.

Na análise das frequências genotípicas, o genótipo homozigoto mutante AA para o polimorfismo IFNG+874 foi o mais prevalente. Os genótipos AA, AT e TT apresentaram frequências de 0,51, 0,39 e 0,10, respectivamente. Estas frequências são similares às encontradas em outros estudos. Matos e colaboradores (2007) observaram frequências de 0,47, 0,41 e 0,12 para os genótipos AA, AT e TT, respectivamente, em indivíduos com leishmaniose mucosa. Recentemente, Ansari e colaboradores (2009) descreveram frequências de 0,45, 0,40 e 0,15 para os genótipos AA, AT e TT, respectivamente, em indivíduos com tuberculose disseminada. A descrição de frequências elevadas dos genótipos homozigoto mutante AA e heterozigoto AT foi confirmada por vários trabalhos, que analisaram diferentes doenças infecciosas, como observado no trabalho de Amim e colaboradores (2008), os quais observaram em um estudo com tuberculose, realizado no Brasil, frequências de 0,57, 0,27 e 0,16 para os genótipos AA, AT e TT, respectivamente. Em estudo realizado com indivíduos com síndrome respiratória aguda, realizado na China, as frequências encontradas foram 0,70, 0,27 e 0,03 para os genótipos AA, AT e TT, respectivamente (Chong *et al.*, 2006).

Na análise das freqüências genóticas para o polimorfismo IL10-1082, a freqüência do genótipo homozigoto mutante AA também foi a mais prevalente. Os genótipos AA, AG e GG apresentaram freqüências de 0,49, 0,43 e 0,08, respectivamente. Outros estudos também verificaram maior prevalência do genótipo mutante e descreveram freqüências genóticas semelhantes às observadas nesse estudo. Ouma e colaboradores (2008) verificaram freqüências de 0,44, 0,40 e 0,16 para os genótipos AA, AG e GG, respectivamente, em indivíduos com anemia severa causada por *P. falciparum*. Na infecção por HIV, as freqüências obtidas para os genótipos AA, AG e GG foram 0,55, 0,33 e 0,11 em indivíduos soropositivos para HIV-1, respectivamente, e de 0,51, 0,40 e 0,09 em indivíduos soronegativos para HIV-1 (Chatterjee *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos neste estudo apontam que indivíduos que apresentam o genótipo homozigoto mutante AA para o polimorfismo IFNG+874 têm níveis séricos diminuídos de IFN- γ , enquanto que portadores do alelo selvagem T (genótipo AT e TT) apresentam níveis elevados desta citocina no soro. Este resultado está de acordo com o estudo de Ansari e colaboradores (2009), que mostraram níveis elevados, intermediários e baixos de IFN- γ associados aos genótipos TT, AT e AA, respectivamente, em cultura contendo sangue total estimulado com antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. Outro estudo mostrou que indivíduos que têm a presença do alelo T (AT e TT) produzem níveis elevados de IFN- γ , quando comparados com indivíduos homozigotos mutantes (AA), após a detecção de IFN- γ por ELISPOT, em culturas de células

mononucleares na presença de antígenos PPD e ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Sallakci *et al.*, 2007). Estudo semelhante foi realizado com CMSP de indivíduos com leishmaniose cutânea ou com leishmaniose mucosa. As culturas foram estimuladas com antígenos de promastigota de *L. braziliensis*. Na leishmaniose cutânea, observou-se que indivíduos com o genótipo AA produziram níveis mais baixos de IFN- γ do que indivíduos com os genótipos AT e TT, porém, na leishmaniose mucosa não houve diferença (Matos *et al.*, 2007).

O polimorfismo IL10-1082 também foi associado com a produção sérica de IL-10. Os indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (AG e GG) apresentaram níveis séricos de IL-10 maiores do que os indivíduos homocigotos mutantes (AA), porém a diferença não foi significativa. Neste estudo, o polimorfismo IL10-1082 não alterou a produção sérica desta citocina. Os efeitos do polimorfismo IL10-1082 sobre os níveis séricos de IL-10 também foram analisados por Hohaus e colaboradores (2009), que mostraram que o genótipo GG está associado com a maior produção de IL-10 do que os genótipos que têm a presença do alelo mutante (AA e AG), em europeus com Linfoma de Hodgkin. Porém, um estudo realizado para verificar a produção de IL-10 em cultura contendo CMSP estimuladas com antígeno de *M. tuberculosis* mostrou que o polimorfismo IL10-1082 não estava associado com os níveis de IL-10 (Selvaraj *et al.*, 2008).

Ao analisar se o polimorfismo IFNG+874 está associado com a eliminação do parasito, não observamos diferenças entre o grupo de indivíduos

homozigotos mutantes AA e o grupo que tem o alelo selvagem (genótipos AT e TT). Quanto ao polimorfismo IL10-1082, também observamos que indivíduos homozigotos mutantes AA têm a mesma capacidade de eliminação dos parasitos que os indivíduos que têm a presença do alelo selvagem (AG e GG), sugerindo que os polimorfismos no gene que codifica o IFN- γ e no gene que codifica IL-10 não estão associados com a eliminação do parasito.

Os polimorfismos IFNG+874 e IL10-1082, embora interfiram na produção de IFN- γ e IL-10, respectivamente, não foram associados com a eliminação do parasito na malária causada por *P. vivax*. No estudo realizado por Carpenter e colaboradores (2009), também não foi observada associação entre o polimorfismo IL10-1082 e a densidade parasitária na malária causada por *P. falciparum*. No estudo de Carpenter e colaboradores (2009), não foi analisado o polimorfismo no gene do IFN- γ .

Para verificar se a ocorrência de genótipos associados interfere na parasitemia, analisamos indivíduos homozigotos mutantes tanto para IFNG+874 como para IL10-1082 (IFNG+874AA / IL10-1082AA) e observamos que não houve diferença na capacidade de eliminação dos parasitos, quando comparados com indivíduos que têm a presença do alelo selvagem tanto para IFNG+874 como para IL10-1082 (IFNG+874AT ou TT / IL10-1082AG ou GG). Além disso, observamos que indivíduos que são homozigotos mutantes apenas para IFNG+874 (IFNG+874AA / IL10-1082AG ou GG) apresentam a mesma capacidade de

eliminação do parasito que indivíduos homozigotos mutantes apenas para IL10-1082 (IFNG+874AT ou TT / IL10-1082AA).

Como os níveis séricos de IL-4 e de IL-12 obtidos neste estudo foram muito baixos em todos os indivíduos infectados por *P. vivax*, polimorfismos nos genes que codificam estas citocinas não foram analisados. Estes níveis baixos podem estar mais relacionados ao período de produção destas citocinas do que propriamente pela presença dos polimorfismos. Desta forma, um estudo para associar níveis séricos com polimorfismos teria que estabelecer o momento da detecção destas citocinas.

Estudos realizados com a finalidade de caracterizar fatores genéticos que influenciam os mecanismos da resposta imune podem contribuir com novas estratégias para estudar a resposta imune na malária. Assim, mais estudos imunológicos e moleculares devem ser realizados, com o objetivo de caracterizar fatores genéticos e identificar mecanismos efetores envolvidos na aquisição de proteção, capazes de eliminar ou controlar a parasitemia na malária humana.

5. CONCLUSÕES

- Durante a infecção patente por *Plasmodium vivax*, houve produção das citocinas Interferon- γ (IFN- γ) e Interleucina-10 (IL-10), mas não foram detectados níveis séricos de Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-12 (IL-12).
- Os níveis séricos das citocinas IFN- γ e IL-10 apresentaram grande variação individual e a concentração média foi $44,50 \pm 75,05$ pg/mL e $283,80 \pm 216,71$ pg/mL, respectivamente.
- As concentrações séricas da citocina IFN- γ foram semelhantes nas diferentes faixas de densidade parasitária, enquanto que a concentração da citocina IL-10 foi maior no grupo com parasitemia mais alta.
- A produção da citocina IFN- γ foi maior nos indivíduos primoinfectados, enquanto que para IL-10 não houve diferença.
- A frequência do genótipo homozigoto mutante para a citocina IFN- γ (IFNG +874T/A) foi 50,65% e apresentou associação com a menor produção da citocina.

- A frequência do genótipo homozigoto mutante para a citocina IL-10 (IL10-1082) foi 49,35% e não afetou a produção da citocina.

- Os polimorfismos (IFNG+874 e IL10-1082) não alteraram a densidade parasitária, quando ocorreram tanto no gene de apenas uma citocina (IFN- γ ou IL10) como nos genes das duas citocinas (IFN- γ e IL10).

- Durante a infecção patente por *Plasmodium vivax* houve produção de citocina que caracteriza o perfil Th1 (IFN- γ), com possível participação da IL-10 na imunorregulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIDI EA, ANCHANG JK, MINANG JT, AHMADOU MJ, TROYE-BLOMBERG M. Studies on *Plasmodium falciparum* isotypic antibodies and numbers of IL-4 and IFN-gamma secreting cells in paired maternal cord blood from South West Cameroon. **Int J Infect Dis.** **9:** 159-169, 2005.
- ALAM MT, BORA H, MITTRA P, SINGH N, SHARMA YD. Cellular immune responses to recombinant *Plasmodium vivax* tryptophan-rich antigen (PvTRAg) among individuals exposed to vivax malaria. **Parasite Immunol.** **30:** 379-383, 2008.
- ALLISON AC & EUGUI EM. A radical interpretation of immunity to malaria parasites. **Lancet.** **2:** 1431-1433, 1982.
- AMANTE FH, STANLEY AC, RANDALL LM, ZHOU Y, HAQUE A, MCSWEENEY K, WATERS AP, JANSE CJ, GOOD MF, HILL GR, ENGWERDA CR. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Am J Pathol.** **2:** 548-559, 2007.
- AMIM LHL, PACHECO AG, FONSECA-COSTA J, LOREDO CS, RABAHI MF, MELO MH, RIBEIRO FCV, MELLO FCQ, OLIVEIRA MM, SILVA JRL, OTTENHOFF TH, KRITSKI AL, SANTOS AR. Role of IFN- γ +874A/T single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilian subjects. **Mol Bio Rep.** **35:** 563-566, 2008.
- ANGULO I & FRESNO M. Cytokines in the Pathogenesis of and Protection against Malaria. **Am Society for Microbiol.** **9:** 1145-1152, 2002.

- ANSARI A, TALAT N, JAMIL B, HASAN Z, RAZZAKI T, DAWOOD G, HUSSAIN R. Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. **PloS One.** **4:** e4778, 2009.
- ARÉVALO-HERRERA M, VALENCIA AZ, VERGARA J, BONELO A, FLEISCHHAUER K, GONZALEZ JM, RESTREPO JC, LOPEZ JA, VALMORI D, CORRADIN G, HERRERA S. Identification of HLA-A2 restricted CD8(+) T-lymphocyte responses to *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria. **Parasite Immunol.** **24:** 161-169, 2002.
- ARTAVANIS-TSAKONAS K & RILEY EM. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. **J Immunol.** **169:** 2956-2963, 2002.
- ARTAVANIS-TSAKONAS K, TONGREN JE, RILEY EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin Exp Immunol.** **133:** 145-152, 2003.
- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq,** 2007.
- BANNISTER LH, HOPKINS JM, FOWLER RE, KRISHNA S, MITCHELL GH. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitol Today.** **16:** 427-433, 2000.

- BANO N, ROMANO JD, JAYABALASINGHAM B, COPPENS I. Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. **Int J Parasitol.** **37:** 1329-1341, 2007.
- BECKER K, TILLEY L, VENNERSTROM JL, ROBERTS D, ROGERSON S, GINSBURG H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interaction. **Int J Parasitol.** **34:** 163-189, 2004.
- BLACKMAN MJ. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. **Cell Microbiol.** **6:** 893-903, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Diagnóstico laboratorial da Malária. **Série A. Normas e Manuais Técnicos.** Brasília: MS, p. 42-43, 2005.
- BROWN KN, ALLISON AC, TAYLOR RB. *Plasmodium berghei* infections in thymectomized rats. **Nature.** **219:** 292-293, 1968.
- BROWN KN. Immunity to protozoal infections. **Proc Roy Soc Med.** **62:** 301-302, 1969.
- BROWN KN, JARRA W, HILLS LA. T cells and protective immunity to *Plasmodium berghei* in rats. **Infect Immun.** **14:** 858-871, 1976.
- BRUCE-CHWATT LJ. **Essential malariology.** 2^a ed. London, William Heinemann Medical Books. 1985. 452p.
- BRUSTOSKI K, MÖLLER U, KRAMER M, PETELSKI A, BRENNER S, PALMER DR, BONGARTZ M, KREMSNER PG, LUTY AJF, KRZYCH U. IFN- γ and IL-10 Mediate Parasite-Specific Immune Responses os Cord Blood Cells

- Induced by Pregnancy-Associated *Plasmodium falciparum* Malaria. **J Immunol.** **174**: 1738-1745, 2005.
- BYGBJERG IC, JEPSEN S, THEANDER TG, ODUM N. Specific proliferative response of human lymphocytes to purified soluble antigens from *Plasmodium falciparum in vitro* cultures and to antigens from malaria patients' sera. **Clin Exp Immunol.** **59**: 421-426. 1985.
- CABANTOUS S, POUDIOUGOU B, TRAORE A, KEITA M, CISSE MB, DOUMBO O, DESSEIN AJ, MARQUET S. Evidence that Interferon- γ plays a protective role during cerebral malaria. **J Infect Dis.** **192**: 854-860, 2005.
- CARPENTER D, ABUSHAMA H, BERECZKY S, FÄRNERT A, ROTH I, TROYE-BLOMBERG M, QUINNELL RJ, SHAW MA. Immunogenetic control of antibody responsiveness in a malaria endemic area. **Hum Immunol.** **68**: 165-169, 2007.
- CARPENTER D, ROTH I, FÄRNERT A, ABUSHAMA H, QUINNELL RJ, SHAW MA. Genetics of susceptibility to malaria related phenotypes. **Infect Genet Evol.** **9**: 97-103, 2009.
- CHAIYAROJ SC, RUTTA ASM, MUENTHAISON K, WATKINS P, UBOL MN, LOOAREESUWAN S. Reduced levels of transforming growth factor- β 1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. **Acta Trop.** **89**: 319-327, 2004.

- CHATTERJEE A, RATHORE A, SIVARAMA P, YAMAMOTO N, DHOLE TN. Genetic association of IL-10 gene promoter polymorphism and HIV-1 infection in North Indians. **J Clin Immunol.** **29:** 71-77, 2009.
- CHEN G, LIU J, WANG QH, WU Y, FENG H, ZHENG W, GUO SY, LI DM, WANG JC, CAO YM. Effects of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells on early *Plasmodium yoelii* 17XL infection in BALB/c mice. **Parasitology.** **136:** 1107-1120, 2009.
- CHEN X, XU J, CHEN Z, ZHOU Z, FENG X, ZHOU Y, REN Q, YANG R, HAN ZC. Interferon- γ +874A/T and interleukin-4 intron3 VNTR gene polymorphisms in Chinese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. **Eur J Haematol.** **79:** 191-197, 2007.
- CHONG WP, IP WKE, TSO GHW, NG MW, WONG WHS, LAW HKW, YUNG RWH, CHOW EY, AU KL, CHAN EYT, LIM W, PEIRIS JSM, LAU YL. The interferon gamma gene polymorphism +874A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. **BMC Infect Dis.** **6:** 82, 2006.
- CLARK IA & ALLISON AC. *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelli* infections in nude mice. **Nature.** **252:** 328-329, 1974.
- CLARK IA, ALLISON AC, COX FE. Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG. **Nature.** **259:** 309-311, 1976.
- CLARK IA, BUDD AC, ALLEVA LM, COWDEN WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malar J.** **5:** 85-117, 2006.

- CLYDE DF, MOST H, MCCARTHY VC. Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. **Am J of Med Sci.** **266:** 169-177, 1973.
- COLEMAN RM, RENCRICCA NJ, STOUT JP, BRISSETTE WH, SMITH DM. Splenic mediated erythrocyte cytotoxicity in malaria. **Immunology.** **29:** 49-54, 1975.
- CORDEIRO CA, MOREIRA PR, ANDRADE MS, DUTRA WO, CAMPOS WR, ORÉFICE F, TEIXEIRA AL. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **49:** 1979-1982, 2008.
- DEANS JA & COHEN S. Immunology of malaria. **Annu Rev Microbiol.** **37:** 25-49, 1983.
- DIALLO M, ALDEBERT D, MOREAU JC, NDIAYE M, JAMBOU R. Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women. **Int J Parasitol.** **38:** 1557-1565, 2008.
- DIOUF I, FIEVET N, DOUCOURÉ S, NGOM M, ANDRIEU M, MATHIEU JF, GAYE A, THIAW OT, DELORON P. IL-12 producing monocytes and IFN- γ and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by *Plasmodium falciparum*. **J Reprod Immunol.** **74:** 152-162, 2007.
- ENGWERDA CR & GOOD MF. Interactions between malaria parasites and the host immune system. **Curr Opin Immunol.** **17:** 381-387, 2005.
- FAROUK SE, DOLO A, BERECZKY S, KOURIBA B, MAIGA B, FARNERT A, PERLMANN H, HAYANO M, MONTGOMERY SM, DOUMBO OK, TROYE-

- BLOMBERG M. Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. **Microbes Infect.** **7**: 110-117, 2005.
- FERNANDES AAM, CARVALHO LJM, ZANINI GM, VENTURA AMRS, SOUZA JM, COTIAS PM, SILVA-FILHO IL, DANIEL-TADEU CT. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon Region. **Clin Vaccine Immunol.** **15**: 650-658, 2008.
- FERREIRA JO & RIBEIRO CTD. Protective immunity against the preerythrocytic stages of Plasmodia. **J Brazilian Associat Advanc of Science.** **52**: 241-245, 2000.
- FONSECA L, SEIXAS E, BUTCHER G, LANGHORNE J. Cytokine responses of CD4+T cells during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* (ER) blood-stage infection in mice initiated by the natural route of infection. **Malar J.** **6**: 77-85, 2007.
- GALINSKI MR & BARNWELL JW. *Plasmodium vivax*: who cares? **Malar J.** **7**: Suppl 1:S9, 2008.
- GARRAUD O, MAHANTY S, PERRAUT R. Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. **Trends Immunol.** **24**: 30-35, 2003.
- GAUR D, MAYER DC, MILLER LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int J Parasitol.** **34**: 1413-1429, 2004.

- GIORDANI L, BRUZZI P, LASALANDRA C, QUARANTA M, SCHITTULLI F, DELLA RAGIONE F, IOLASCON A. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. **Clin Chem.** **49**: 1664-1667, 2003.
- GOEL VK, LI X, CHEN H, LIU SC, CHISHTI AH, OH SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **100**: 5164-5169, 2003.
- GONZÁLEZ JM, PETER K, ESPOSITO F, NEBIE I, TIERCY JM, BONELO A, AREVALO-HERRERA M, VALMORI D, ROMERO P, HERRERA S, CORRADIN G, LOPEZ JA. HLA-A*0201 restricted CD8+ T-lymphocyte responses to malaria: identification of new *Plasmodium falciparum* epitopes by IFN-gamma ELISPOT. **Parasite Immunol.** **22**: 501-514, 2000.
- GOOD MF, STANISIC D, XU H, ELLIOTT S, WYKES M. The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites. **Immunological Reviews,** **201**: 254-267, 2004.
- GRAVELY SM & KREIER JP. Adoptive transfer of immunity to *Plasmodium berghei* with immune T and B lymphocytes. **Infect Immun.** **14**: 184-190, 1976.
- GREENWOOD BM, FIDOCK DA, KYLE DE, KAPPE SH, ALONSO PL, COLLINS FH, DUFFY PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **J Clin Invest.** **118**: 1266-1276, 2008.
- HEPPNER DG JR, KESTER KE, OCKENHOUSE CF, TORNIEPORTH N, OFORI O, LYON JA, STEWART VA, DUBOIS P, LANAR DE, KRZYCH U,

- MORIS P, ANGOV E, CUMMINGS JF, LEACH A, HALL BT, DUTTA S, SCHWENK R, HILLIER C, BARBOSA A, WARE LA, NAIR L, DARKO CA, WITHERS MR, OGUTU B, POLHEMUS ME, FUKUDA M, PICHYANGKUL S, GETTYACAMIN M, DIGGS C, SOISSON L, MILMAN J, DUBOIS MC, GARÇON N, TUCKER K, WITTES J, PLOWE CV, THERA MA, DUOMBO OK, PAU MG, GOUDSMIT J, BALLOU WR, COHEN J. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine**. **23**: 2243-2250, 2005.
- HERRERA S, BONELO A, PERLAZA BL, FERNÁNDEZ OL, VICTORIA L, LENIS AM, SOTO L, HURTADO H, ACUÑA LM, VÉLEZ JD, PALACIOS R, CHEN-MOK M, CORRADIN G, ARÉVALO-HERRERA M. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in Colombian malaria-naïve volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **Am J Trop Med Hyg**. **73**: 3-9, 2005.
- HOFFMAN SL, GOH LM, LUKE TC, SCHNEIDER I, LE TP, DOOLAN DL, SACCI J, DE LA VEGA P, DOWLER M, PAUL C, GORDON DM, STOUTE JA, CHURCH LW, SEDEGAH M, HEPPNER DG, BALLOU WR, RICHIE TL. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J Infect Dis**. **185**: 1155-1164, 2002.
- HOHAUS S, GIACHELIA M, MASSINI G, VANNATA B, CRISCUOLO M, MARTINI M, D'ALO' F, VOSO MT, LAROCCA LM, LEONE G. Clinical significance of

- interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. **Leuk Res. 33:** 1352-1356, 2009.
- JASON J, ARCHIBALD LK, NWANYANWU OC, BELL M, BUCHANAN I, LARNED J, KAZEMBE PN, DOBBIE H, PAREKH B, BYRD MG, EICK A, HAN A, JARVIS WR. Cytokines and malaria parasitemia. **Clin Immunol. 100:** 208-218, 2001.
- JAYAWARDENA AN, MURPHY DB, JANEWAY CA, GERSHON RK. T-cell mediated immunity in malaria. The Ly phenotype of T cells mediating resistance to *Plasmodium yoelii*. **J. Immunol. 129:** 377-381, 1982.
- JOBE O, DONOFRIO G, SUN G, LIEPINSH D, SCHWENK R, KRZYCH U. Immunization with radiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites induces liver cCD8 α ⁺DC that activate CD8⁺T cells against liver-stage malaria. **PLoS One. 4:** e5075, 2009.
- JOHN CC, MOORMANN AM, SUMBA O, OFULLA AV, PREGIBON DC, KAZURA JW. Gamma Interferon responses to *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen 1 and trombospondin-related adhesive protein and their relationship to age, transmission intensity, and protection against Malaria. **Am Society for Microbiol. 72:** 5135-5142, 2004.
- KALAMI-SARVESTANI E, RASOULI M, MORTAZAVI H, GHARESI-FARD B. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. **Cytokine. 35:** 159-165, 2006.

- KARUNAWEERA N, WANASEKARA D, CHANDRASEKHARAN V, MENDIS K.
Plasmodium vivax: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation. **Malaria J.** **62**:1-14, 2007.
- KEATING SM, BEJON P, BERTHOUD T, VUOLA JM, TODRYK S, WEBSTER DP, DUNACHIE SJ, MOORTHY VS, MCCONKEY SJ, GILBERT SC, HILL AV. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. **J Immunol.** **175(9)**: 5675-5680, 2005.
- KELLER CC, YAMO O, OUMA C, ONG'ECHA JM, OUNAH D, HITTNER JB, VULULE JM, PERKINS DJ. Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12 p40 (IL-12 p40) Transcripts and Circulating IL-12 p40 through an IL-10-Dependent Mechanism: *In Vivo* and *In Vitro* Findings in Severe Malaria Anemia. **Am Society for Microbiol.** **74**: 5249-5260, 2006.
- KNOWLES R & DAS GUPTA BM. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. **Ind Med Gas.** **67**: 301-320, 1932.
- KOCH O, AWOMOYI A, USEN S, JALLOW M, RICHARDSON A, HULL J, PINDER M, NEWPORT M, KWIATKOWSKI D. IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. **J Infect Dis.** **185**: 1684-1687, 2002.
- KOSS K, SATSANGI J, FANNING GC, WELSH KI, JEWELL DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. **Genes Immunol.** **1**: 185-190, 2000.

- LALVANI A, MORIS P, VOSS G, PATHAN AA, KESTER KE, BROOKES R, LEE E, KOUTSOUKOS M, PLEBANSKI M, DELCHAMBRE M, FLANAGAN KL, CARTON C, SLAOUI M, VAN HOECKE C, BALLOU WR, HILL AV, COHEN J. Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. **J Infect Dis.** **180**: 1656-1664, 1999.
- LANGHORNE J, NDUNGU FM, SPONAAS AM, MARSH K. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol.** **9**: 725-732, 2008.
- LAZARUS R, KLIMECKI WT, PALMER LJ, KWIATKOWSKI DJ, SILVERMAN EK, BROWN A, MARTINEZ F, WEISS ST. Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups. **Genomics.** **80**: 223-228, 2002.
- LEE JY, KIM HY, KIM KH, KIM SM, JANG MK, PARK JY, LEE JH, KIM JH, YOO JY. Association of polymorphism of IL-10 and TNF- α genes with gastric cancer in Korea. **Cancer Lett.** **225**: 207-214, 2005.
- LUTY AJF, PERKINS DJ, LELL B, SCHMIDT-OTT R, LEHMAN LG, LUCKNER D, GREVE B, MATOUSEK P, HERBICH K, SCHMID D, WEINBERG B, KREMSNER PG. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect Immun.** **68**: 3909-3915, 2000.
- MALAGUARNERA L & MUSUMECI S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet Infect Dis.** **2**: 472-478, 2002.

- MATOS GI, COVAS CJF, BITTAR RC, GOMES-SILVA A, MARQUES F, MANIERO VC, AMATO VS, OLIVEIRA-NETO MP, MATTOS MS, PIRMEZ C, SAMPAIO EP, MORAES MO, DA-CRUZ AM. IFNG+874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN- γ production. **BMC Infect Dis.** **7:** 33-38, 2007.
- MCDONALD V & PHILLIPS RS. *Plasmodium chabaudi* in mice. Adoptive transfer of immunity with enriched populations of spleen T and B lymphocytes. **Immunology.** **34:** 821-830, 1978.
- MCGREGOR IA, GILLES H, WALTERS JH, DAVIES AH, PEARSON FA. Effects of heavy and repeated malarial infections on Gambian infants and children. **Brit Med J.** **22:** 686-692, 1956.
- MENDIS K, SINA BJ, MARCESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am J Trop Med Hyg.** **64:** 97 - 106, 2001.
- MERINO EF, FERNANDEZ-BECERRA C, MADEIRA AMBN, MACHADO AL, DURHAM A, GRUBER A, HALL N, PORTILLO HA. Pilot survey of expressed sequence tags (ESTs) from the asexual blood stages of *Plasmodium vivax* in human patients. **Malar J.** **2:** 21, 2003.
- MINIGO G, SCALZO K, FLANAGAN KL, PLEBANSKI M. Predicting memory: a prospective readout for malaria vaccines? **Trends Parasitol.** **23:** 341-343, 2007.

- MOORE SA, SURGEY EG, CADWGAN AM. Malaria vaccines: where are we and where are we going? **Lancet Infect Dis. 2:** 737-743, 2002.
- MOORTHY VS, GOOD MF, HILL AV. Malaria vaccine developments. **Lancet, 363:** 150-156, 2004.
- MOTA MM & RODRIGUEZ A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **Cell Microbiol. 6:** 1113-1118, 2004.
- NARDIN EH & NUSSENZWEIG RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. **Annu Rev Immunol. 11:** 687-727, 1993.
- NDUNGU FM, URBAN BC, MARSH K, LANGHORNE J. Regulation of immune response by *Plasmodium*-infected red blood cells. **Parasite Immunol. 27:** 373-384, 2005.
- NEWMAN CK, KORBEL DS, HAFALLA JC, RILEY EM. Cross-Talk with Myeloid Accessory Cells Human Natural Killer Cell Interferon- γ Responses to Malaria. **PloS Pathog. 2:** 1120-1132, 2006.
- NUSSENBLATT V, MUKASA G, METZGER A, NDEEZI G, GARRETT E, SEMBA RD. Anemia and Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Erythropoietin Levels among Children with Acute, Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. **Am Society for Microbiol. 8:** 1164-1170, 2001.
- O'DONNELL RA & BLACKMAN MJ. The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. **Curr Opin Immunol. 8:** 422-427, 2005.

- OLIVEIRA TR, FERNANDEZ-BECERRA C, JIMENEZ MCS, DEL PORTILLO HA, SOARES IS. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. **Malaria J.** **5:** 83, 2006.
- OMOSUN YO, ANUMUDU CI, ADORO S, ODAIBO AB, SODEINDE O, HOLDER AA, NWAGWU M, NWUBA RI. Variation in the relationship between anti-MSP1₁₉ antibody response and age in children infected with *Plasmodium falciparum* during the dry and rainy seasons. **Acta Trop.** **95:** 233-247, 2005.
- ONG'ECHA JM, REMO AM, KRISTOFF J, HITTNER JB, WERE T, OUMA C, OTIENO RO, VULULE JM, KELLER CC, AWANDARE GA, PERKINS DJ. Increased circulating interleukin (IL)-23 in children with malarial anemia: *in vivo* and *in vitro* relationship with co-regulatory cytokines IL-12 and IL-10. **Clin Immunol.** **126:** 211-221, 2007.
- OUMA C, DAVENPORT GC, WERE T, OTIENO MF, HITTNER JB, VULULE JM, MARTINSON J, ONG'ECHA JM, FERRELL RE, PERKINS DJ. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. **Hum Genet.** **124:** 515-524, 2008.
- PACHECO AG, CARDOSO CC, MORAES MO. IFNG+874T/A, IL10-1082G/A and TNF-308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Hum Genet.** **123:** 477-484, 2008.

- PERKINS DJ, WEINBERG JB, KREMSNER PG. Reduced Interleukin-12 and Transforming Growth Factor- β 1 in Severe Childhood Malaria: Relationship of Cytokine Balance with Disease Severity. **J Infect Dis.** **182**: 988-992, 2000.
- PERKMANN T, WINKLER H, GRANINGER W, KREMSNER PG, WINKLER S. Circulating levels of the interleukin (IL)-4 receptor and of IL-18 in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. **Cytokine.** **29**: 153-158, 2005.
- PERRY JA, RUSH A, WILSON RJ, OLVER CS, AVERY AC. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. **J Immunol.** **172**: 475-482, 2004.
- PETRITUS PM & BURNS JM. Suppression of lethal *Plasmodium yoelii* malaria following protective immunization requires antibody-, IL-4-, and IFN- γ -dependent responses induced by vaccination and/or challenge infection. **J Immunol.** **180**: 444-453, 2008.
- PINDER M, REECE WH, PLEBANSKI M, AKINWUNMI P, FLANAGAN KL, LEE EA, DOHERTY T, MILLIGAN P, JAYE A, TORNIEPORTH N, BALLOU R, MCADAM KP, COHEN J, HILL AV. Cellular immunity induced by the recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine, RTS,S/AS02, in semi-immune adults in The Gambia. **Clin Exp Immunol.** **135**: 286-293, 2004.
- PLEBANSKI M & HILL AV. The immunology of malaria infection. **Curr Opin Immunol.** **12**: 437-441, 2000.
- PRAKASH D, FESEL C, JAIN R, CAZENAVE PA, MISHRA GC, PIED S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected

- patients from endemic areas of Central India. **J Infect Dis.** **194:** 198-207, 2006.
- PRAVICA, V., ASDERAKIS, A., PERREY, C., HAJEER, A., SINNOTT, P. J., HUTCHINSON I.V. *In vitro* production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **Eur J Immunogenet.** **26:** 1-3, 1999.
- RICHARDS JS & BEESON JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunol Cell Biol.** **87:** 377-390, 2009.
- RODRIGUES M, NUSSENZWEIG RS, ROMERO P, ZAVALA F. The *in vivo* cytotoxic activity of CD8+ T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules. **J Exp Med.** **175:** 895-905, 1992.
- RODRIGUES MM, BOSCARDIN SB, VASCONCELOS JR, HIYANE MI, SALAY G, SOARES IS. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. **An Acad Bras Cienc.** **75:** 443-468, 2003.
- ROESTENBERG M, MCCALL M, HOPMAN J, WIERSMA J, LUTY AJF, VAN GEMERT GJ, VAN DE VEGTE-BOLMER M, VAN SCHAIJK B, TEELEN K, ARENS T, SPAARMAN L, DE MAST Q, ROEFFEN W, SNOUNOU G, RÉNIA L, VAN DER VEN A, HERMSEN CC, SAUERWEIN R. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **N Engl J Med.** **361:** 468-477, 2009.
- SALHI A, RODRIGUES V, SANTORO F, DESSEIN H, ROMANO A, CASTELLANO LR, SERTORIO M, RAFATI S, CHEVILLARD C, PRATA A,

- ALCAÍS A, ARGIRO L, DESSEIN A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **J Immunol.** **180**: 6139-6148, 2008.
- SALLAKCI N, COSKUN M, BERBER Z, GÜRKAN F, KOCAMAZ H, UYSAL G, BHUJU S, YAVUZER U, SINGH M, YEGIN O. Interferon- γ gene +874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis.** **87**: 225-230, 2007.
- SANNI LA, JARRA W, LI C, LANGHORNE J. Cerebral Edema and Cerebral Hemorrhages in Interleukin-10-Deficient Mice Infected with *Plasmodium chabaudi*. **Am Society for Microbiol.** **72**: 3054-3058, 2004.
- SELVARAJ P, ALAGARASU K, HARISHANKAR M, VIDYARANI M, RAJESWARI DN, NARAYANAN PR. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine.** **43**: 26-33, 2008.
- SEOH JY, KHAN M, PARK SH, PARK HK, SHIN MH, HÁ EH, LEE BE, YOO K, HAN HS, OH S, WI JH, HONG CK, OH CH, KIM YA, PARK JW. Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without hyperpyrexia. **Am J Trop Med Hyg.** **68**: 102-106, 2003.
- SIDDIQUI AA, SINGH N, SHARMA YD. Expression and purification of a *Plasmodium vivax* antigen – PvTARAg55 tryptophan – and alanine-rich antigen and its immunological responses in human subjects. **Vaccine.** **26**: 96-107, 2007.

- SILVA IB. **Malária vivax: Manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas com o Fator de Necrose Tumoral.** Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Belém, Universidade Federal do Pará, 2002.
- SILVERMAN PH. Malaria vaccines. **Br Med J. 2:** 335-336, 1975.
- SINIGAGLIA F, RICHARD J, PINK L. Human T lymphocyte clones specific for malaria (*Plasmodium falciparum*) antigens. **EMBO J. 4:** 3819-3822, 1985.
- SINNIS P & SIM BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. **Trends Microbiol. 5:** 52-58, 1997.
- SOHAIL M, KAUL A, BALI P, RAZIUDDIN M, SINGH MP, SINGH OP, DASH AP, ADAK T. Alleles -308A and -1031C in the TNF- α gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF- α and clinical features of vivax malaria in Indian patients. **Mol Immunol. 45:** 1682-1692, 2008.
- SPIRA DT, SILVERMAN PH, GAINES C. Anti-thymocyte serum effects on *Plasmodium berghei* infection in rats. **Immunology. 19:** 759-766, 1970.
- STECHSCHULTE DJ. *Plasmodium berghei* infection in thymectomized rats. **Proc Soc Exp Biol Med. 131:** 748-752, 1969.
- STEVENSON MM & RILEY EM. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol. 4:** 169-180, 2004.
- STRUIK SS & RILEY EM. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol Rev. 201:** 268-290, 2004.

- SU Z & STEVENSON MM. IL-12 Is Required for Antibody-Mediated Protective Immunity Against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* AS Malaria Infection in Mice. **J Immunol.** **168**: 1348-1355, 2001.
- TAYLOR-ROBINSON AW, PHILLIPS RS, SEVERN A, MONCADA S, LIEW FY. The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. **Science.** **260**: 1931-1934, 1993.
- TODRYK SM, BEJON P, MWANGI T, PLEBANSKI M, URBAN B, MARSH K, HILL AVS, FLANAGAN KL. Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4⁺CD25^{high} T cells with susceptibility in Kenyans. **PloS One.** **3**: e2027, 2008.
- TORRE D, SPERANZA F, GIOLA M, MATTEELLI A, TAMBINI R, BIONDI G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. **Am Society for Microbiol.** **9**: 348-351, 2002.
- TRENT JM, OLSON S, LAWN RM. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. **Proc Natl Acad Sci U S A,** **79**: 7809-7813, 1982.
- TROYE-BLOMBERG M, SJÖHOLM PE, PERLMANN H, PATARROYO ME, PERLMANN P. Regulation of the immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. Non-specific proliferative responses *in vitro* and characterization of lymphocytes. **Clin Exp Immunol.** **53**: 335-344, 1983.

- TURNER DM, WILLIAMS DM, SANKARAN D, LAZARUS M, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet.** **24:** 1-8, 1997.
- URBAN BC, FERGUSON DJ, PAIN A, WILLCOX N, PLEBANSKI M, AUSTYN JM, ROBERTS DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature.** **400:** 73-77, 1999.
- VON DER WEID T, KOPF M, KOHLER G, LANGHORNE J. The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. **Eur J Immunol.** **24:** 2285-2293, 1994.
- WEIDANZ WP & GRUN JL. Antibody-independent mechanisms in the development of acquired immunity to malaria. **Adv Exp Med Biol.** **162:** 409-423, 1983.
- WEINBAUM FI, EVANS CB, TIGELAAR RE. Immunity to *Plasmodium berghei yoelii* in mice. The course of infection in T cell and B cell deficient mice. **J Immunol.** **117:** 1999-2005, 1976.
- WINKLER S, WILLHEIM M, BAIER K, SCHMID D, AICHELBURG A, GRANINGER W, KREMSNER PG. Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect Immun.** **66:** 6040-6044, 1998.
- World Health Organization - Roll Back Malaria. Disponível em <http://www.who.int/>. Acesso em acesso setembro 2007.
- WYLER DJ & OPPENHEIM JJ. Lymphocyte transformation in human *Plasmodium falciparum* malaria. **J Immunol.** **113:** 449-454, 1974.

- WYLER DJ & BROWN J. Malaria antigen-specific T-cell responsiveness during infection with *Plasmodium falciparum*. **Clin Exp Immunol.** **29:** 401-407, 1977.
- YEOM JS, PARK SH, RYU SH, PARK HK, WOO SY, HA EH, LEE BE, YOO K, LEE JH, KIM KH, KIM S, KIM YA, AHN SY, OH S, PARK HJ, MIN GS, SEOH JY, PARK JW. Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** **97:** 687-691, 2003.
- YOSHIDA TD & ANDERSSON B. Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the receptor of activated mouse thymus lymphocytes. **Scand J Immunol.** **1:** 401-408, 1972.
- ZEYREK FY, KURCER MA, ZEYREK D, SIMSEK Z. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. **Parasite Immunol.** **28:** 201-207, 2006.

ANEXOS

ANEXO I

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

1- Título do Projeto: Detecção de citocinas na malária causada por *Plasmodium vivax*

2- Instituição onde será desenvolvido o projeto: Universidade Federal do Pará (UFPA)

3- Objetivos: O objetivo geral deste projeto será contribuir com a geração de conhecimento acerca dos mecanismos de defesa desenvolvidos naturalmente contra a malária causada por *P. vivax*.

4- Procedimentos: Serão coletados 10-15 mL de sangue venoso em tubo a vácuo, contendo anticoagulante. Todo o material utilizado na coleta é descartável e você não será submetido a qualquer risco.

5- Benefícios: A realização desse estudo poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos de defesa que são ativados em indivíduos que estão com malária, e assim, aumentar o conhecimento sobre o que ocorre no organismo de uma pessoa, quando ela foi exposta ao parasito que causa a malária.

6- Ética: Sua participação neste estudo será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa desta pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Também será apresentada uma carta de esclarecimento sobre o estudo e os procedimentos envolvidos, que será lida para você, e caso concorde em participar, você deve assinar para confirmar sua participação e o entendimento dessa pesquisa em malária.

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa: Detecção de citocinas na malária causada por *Plasmodium vivax*

A malária é uma doença causada por um protozoário, transmitida pela picada do mosquito infectado e seus principais sintomas são calafrio, febre e suor. Poucas pesquisas são realizadas para entender como o organismo da pessoa doente reage para se defender da malária. Portanto, a finalidade desse estudo é avaliar o que ocorre no organismo de um indivíduo com malária, contribuindo para o conhecimento sobre essa doença.

A realização deste estudo precisa da participação de pessoas que estão com malária. Esta participação será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa da pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Todo o material utilizado na coleta é descartável. Serão coletados 10-15mL de sangue, e durante este procedimento, você não será submetido a nenhum risco.

Se desejar obter mais informações ou esclarecer qualquer dúvida sobre a sua participação, pode entrar em contato com a professora Maristela Gomes da Cunha, no Departamento de Patologia da Universidade Federal do Pará ou pelo telefone (91) 3201-7565.

Após a leitura e explicações, entendi, não tenho dúvidas e concordei voluntariamente em participar desse estudo.

NOME:

DATA:

RG:

ASSINATURA:

Confirmo ter explicado a natureza e objetivos deste estudo ao paciente acima,

NOME:

RG:

DATA:

ASSINATURA

ANEXO III

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Título do projeto: Detecção de citocinas na malária causada por *Plasmodium vivax*

Nº da amostra:.....Data:.....

Resultado do exame – parasitemia e espécie:

Nome:.....

Sexo: () F () M Idade:..... Local de Nasc.....

Endereço e fone:.....

Quanto tempo mora neste endereço (meses)?

Quanto tempo em área endêmica (meses)?

Deslocou-se nos últimos 30 dias (local)?.....

Local de provável infecção.....

Endereço nos últimos 10 anos:

1Período:

2Período:

Usa alguma proteção individual? () Sim () Não

Se sim, quais (1-mosquiteiro, 2-repelente, 3-quimioprofilaxia, 4-outros)?.....

Quantas malárias já teve?.....Qual (quais) espécie (s)?.....

Tempo da última malária (meses):..... Espécie (s):

Já foi hospitalizado durante alguma malária?.....

Doenças tropicais: () Leishmaniose () Doença de Chagas () Toxoplasmose

Quantas vezes? () 1 () 2 () 3 () mais de 4

Já fez transfusão de sangue () Sim () Não Quantas?

Está tomando medicamento?

História clínica atual (1-febre, 2-cefaléia, 3-calafrios, 4-náuseas, 5-mialgia, 6-outros).....Início dos sintomas.....

Temperatura corporal:Tipo sanguíneo (ABO/Rh):.....

Se mulher, está grávida? () Sim () Não

Observações:

ANEXO IV

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Carta de nº 0015/2007
 Protocolo CEP/IEC - Nº 0012/06
 CAAE: 0021.0.072.000-06

Ananindeua/PA, 09 de março de 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Detecção de citocinas produzidas por linfócitos T específicos e estimulados *in vitro* com antígenos da fase sangüinea de *Plasmódio vivax*”.

Pesquisador Responsável: MARISTELA GOMES DA CUNHA

Conforme tramitação junto ao CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC