



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMUNOREGULAÇÃO NA MALÁRIA ASSINTOMÁTICA:
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIPOXINA A4**

**ALINE MICHELLE BARBOSA BAFICA
ORIENTADOR: DR. MANOEL BARRAL NETTO**

Salvador-Bahia-Brasil
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMUNOREGULAÇÃO NA MALÁRIA ASSINTOMÁTICA:
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIPOXINA A4**

**ALINE MICHELLE BARBOSA BAFICA
ORIENTADOR: DR. MANOEL BARRAL NETTO**

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Imunologia, área de concentração
em Imunologia.

Salvador-Bahia-Brasil
2007

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	1
Resumo	2
Abstract	3
1. Introdução	
1.1 Considerações Gerais.....	4
1.2 Ciclo da malária.....	7
1.3 Manifestações clínicas.....	10
1.3.1 Malária não complicada.....	10
1.3.2 Malária Grave e Complicada.....	11
1.3.3 Malária Assintomática.....	12
1.4 Imunologia da malária.....	14
1.4.1 Imunidade Inata.....	15
1.4.2 Imunidade adquirida.....	17
1.5 Papel das citocinas na patogênese da malária.....	21
1.6 Lipoxina.....	24
2. Objetivos	29
3. Justificativa	30
4. Casuística	31
5. Materiais e Métodos	
5.1 Obtenção das Amostras.....	33
5.2 Extração de DNA.....	33
5.3 <i>Nested</i> PCR.....	34
5.5 Gel de agarose	36
5.6 Extração da Lipoxina A4.....	36

5.7	Quantificação da Lipoxina A4.....	37
5.8	Dosagem de citocinas	37
5.9	Análise Estatística dos dados.....	38
6.	Resultados.....	40
7.	Discussão e Perspectivas.....	55
8.	Conclusão.....	60
9.	Referências Bibliográficas	61
	Anexos.....	72

*“A fórmula da minha felicidade: um sim,
um não, uma linha reta, uma meta.”*

Friedrich Nietzsche

Dedicatória

Aos meus pais Nelson e Duda, pelo
amor e carinho.

Agradecimentos

Ao Dr. Barral, orientador e chefe do laboratório, pela orientação cuidadosa e prestativa com que me conduziu na elaboração desta dissertação.

À Dra. Aldina Barral, meus agradecimentos por seus valiosos questionamentos e contribuições para este trabalho.

Ao Dr. André Báfica, meu agradecimento muito especial pelo incentivo incondicional e pelo carinho, contribuindo desta forma, para a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Luis Marcelo Camargo pela colaboração e trabalho junto aos pacientes da área endêmica.

Ao Dr. Jailson Bittencourt de Andrade, chefe do laboratório de química inorgânica da UFBA, pela colaboração neste trabalho.

À Dra. Cláudia, Dra. Camila e Dr. Johan um agradecimento especial, pelas sugestões e críticas, auxiliando-me neste trabalho e na minha formação científica.

Às secretarias da pós-graduação, em especial a Dilcéa, pela atenção e carinho.

Às secretarias Elze e Andreza pela atenção e carinho.

Aos meus colegas do mestrado, pelo carinho e amizade.

A Capes, pelo apoio financeiro, indispensável para este trabalho.

Aos docentes do Mestrado em Imunologia, pela dedicação.

Agradeço aos meus amigos do LIMI e LIP, pelo carinho e amizade.

À minha grande amiga Gil, por sua amizade e companheirismo fundamentais na minha vida.

Aos meus grandes amigos Rick, Nanda, Dani, Paulinha, George, Gigi, Claudinho, Aline Clara, Camila Mota e Natali, pelo carinho.

Ao meu grande amigo Jorge Tolentino (Jorjão) pela amizade e momentos de descontração.

À minha querida amiga e “boadrasta” Lú, pelo total incentivo, amor e amizade.

À minha cunhada e amiga Cris, pelo incentivo constante, conforto e amizade.

Agradeço aos meus irmãos e sobrinhos pelo amor.

A Irineo, por todo amor e carinho.

À Amandinha, minha afilhada querida, pelos momentos de alegria.

A Deus, pela força que me dá.

Lista de Figuras

Figura 1. Incidência Parasitária Anual da malária, por unidade da Federação. Amazônia Legal, 2005 e 2006.

Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium sp*

Figura 3. Resposta imune inata e adaptativa.

Figura 4. Cascata do Ácido Aracdônico.

Figura 5. Formação da Lipoxina A4.

Figura 6. Área de estudo em Rondônia.

Figura 7. Foto de eletroforese em gel de agarose para pesquisa de *P.vivax* e *P.falciparum* em indivíduos de comunidades ribeirinhas de Rondônia.

Figura 8. Níveis de LXA4 no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

Figura 9. Níveis de IFN- γ no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

Figura 10. Níveis de IL-12/IL-23 p 40 no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

Figura 11. Níveis de TNF- α no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

Figura 12. Níveis de IL-10 no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

Figura 13. Correlação entre os níveis de Lipoxina A4 e IFN- γ , LXA4 e TNF- α e LXA4 e IL-10 no plasma de pacientes com malária.

Figura 14. Níveis de LXA 4 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.

Figura 15. Níveis de IFN- γ no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.

Figura 16. Níveis de IL-12/IL-23p40 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.

Figura 17. Níveis de TNF- α no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.

Figura 18. Níveis de IL-10 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.

Figura 19. Correlação entre os níveis de Lipoxina A4 e IFN- γ no plasma de pacientes com malária sintomática.

Figura 20. Correlação entre os níveis de Lipoxina A4 e IL-10 no plasma de pacientes com malária sintomática.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição de habitantes por gênero e idade

Tabela 2 - Distribuição dos habitantes por idade e número de infecções por *Plasmodium*

Tabela 3 - Distribuição dos habitantes por gênero e número de infecções por *P.vivax* e *P.falciparum* em indivíduos assintomáticos e pacientes sintomáticos

Lista de Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação de Polimerase em cadeia
ELISA	Ensaio Enzimático de Imunoabsorção
LXA4	Lipoxina A4
NO	Óxido nítrico
IFN- γ	Interferon Gama
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
P. vivax	Plasmodium vivax
P. falciparum	Plasmodium falciparum
IPA	Índice Parasitário Anual

Resumo

Lipoxina (LX) A4 é um mediador lipídico antiinflamatório produzido via lipoxigenases, que tem sido demonstrado por ter uma importante função no controle da resposta imune (RI) a patógenos intracelulares. Contudo, não existem dados na literatura sobre o papel da LXA4 regulando a resposta imune em doenças infecciosas humana. Para estudar o possível envolvimento de LXA4 na RI humana contra parasitos, analisamos os níveis de LXA4 no plasma assim como citocinas incluindo IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10 em pacientes com malária e controles da área endêmica no Brasil. Amostras de sangue foram coletadas de indivíduos infectados por *P.vivax* ou *P.falciparum* (sintomáticos e assintomáticos), assim como controles da área endêmica de Rondônia-Brasil. Níveis de LXA4 e citocinas do plasma foram determinados por ELISA. Testes Mann Whitney e ANOVA foram usados para comparar significância estatística entre os grupos. Comparados aos controles endêmicos, pacientes com malária exibiram níveis plasmáticos reduzidos de LXA4 ($p=0,0483$) e aumentados de IFN- γ ($p=0,0034$). Observou-se associação negativa entre IFN- γ e LXA4 e associação positiva entre TNF- α e LXA4, IL-10 e LXA4. Comparados aos controles endêmicos, indivíduos com malária assintomática exibiram baixos níveis de LXA4 ($p<0,05$). Nenhuma diferença foi achada nos níveis de LXA4 do plasma de indivíduos sintomáticos comparados aos controles ou indivíduos assintomáticos. Em contraste, níveis de IFN- γ e IL-10 foram achados elevados em pacientes com malária sintomática comparados aos controles endêmicos ($p<0,05$). Além disso, estes pacientes apresentaram uma significativa diminuição nos níveis de IL-12 p40 comparados aos indivíduos assintomáticos ($p<0,05$). No plasma de pacientes com malária sintomática, observou-se associação negativa entre IFN- γ e LXA4 e associação positiva entre IL-10 e LXA4. Nossos resultados sugerem que LXA4 e outros mediadores como IL-10 estão envolvidos na modulação da resposta pró-inflamatória de pacientes com malária.

Abstract

Lipoxin (LX) A4 is an anti-inflammatory lipid mediator produced via lipoxygenases, which has been demonstrated to play an important role in controlling immune responses to several intracellular pathogens. However, whether LXA4 regulates the immune response (IR) in human infectious diseases has not been described. To study the possible involvement of LXA4 in the IR to parasites in humans, we analyzed plasma levels of LXA4 as well as cytokines including IFN-gamma, IL-12, TNF and IL-10 in malaria patients and control subjects from an endemic area in Brazil. Blood samples were collected from *P. vivax* or *P. falciparum*-infected individuals (symptomatic and asymptomatic) as well as endemic controls from Rondonia State. Plasma LXA4 levels and cytokines were determined by ELISA. Mann Whitney test and Anova test were used to compare statistical significance between groups. Compared to endemic control subjects, malaria patients displayed lower plasma levels of LXA4 ($p=0,0483$) associated with a significant increase in IFN-gamma measurements ($p=0,0034$). Negative association was observed between IFN-gamma and LXA4, positive association was found between TNF- α and LXA4, IL-10 and LXA4. Compared to endemic control subjects, asymptomatic malaria individuals displayed lower plasma levels of LXA4. In comparison with asymptomatic individuals and endemic controls, no differences were found in plasma LXA4 levels from symptomatic malaria patients. In contrast, IFN-gamma and IL-10 levels were found to be elevated in symptomatic malaria patients compared to endemic controls ($p<0,05$). In addition, these patients presented a significantly decreased in IL-12p40 levels compared to asymptomatic malaria individuals ($p<0,05$), but no association were found between IL-12p40 and LXA4. In plasma from symptomatic malaria patients, a negative association between IFN-gamma and LXA4 and positive association between IL-10 and LXA4 were observed. Taken together, our results suggest that LXA4 and other mediators including IL-10 is involved in the modulation of pro-inflammatory responses in malaria patients.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais sobre malária

A malária é uma doença infecciosa sistêmica, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies, das quais apenas 4 parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (Neves, 2002).

A malária gera enormes prejuízos para a população, não só pelos problemas à saúde humana como pelo impacto sobre a produtividade do país, com retardo no desenvolvimento econômico. Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 40% da população mundial, na maior parte aqueles que vivem em países em desenvolvimento, estão sob o risco de contrair malária. Cerca de 300 milhões de casos novos são registrados anualmente, com 1,5 a 2,7 milhões de óbitos por ano. Deste número alarmante, 90% se concentram na África Tropical. Outros países onde a malária se concentra são Índia, Brasil, Sri Lanka, Afeganistão, Vietnã e Colômbia.

Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia brasileira, com registros de 400 mil casos novos por ano (WHO, 2005). Atualmente, a malária concentra-se na região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, com 99,7% dos casos registrados no país (SVS/MS, 2005). No Brasil, a grande extensão geográfica da área endêmica e as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dos agentes transmissores e causais da malária pelas espécies de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (este último com menor frequência).

Em Rondônia foi registrada nos meses de maior incidência da doença, uma média de 60.507 casos de malária de junho a agosto de 2005, correspondendo a 18,2% do total de casos da região Amazônica (SVS/MS, 2005). A incidência da doença em Rondônia é elevada, prejudicando o nível de saúde da população e o desenvolvimento sócio-econômico da região (IPA 61/1.000/2006), demonstrado na figura1.

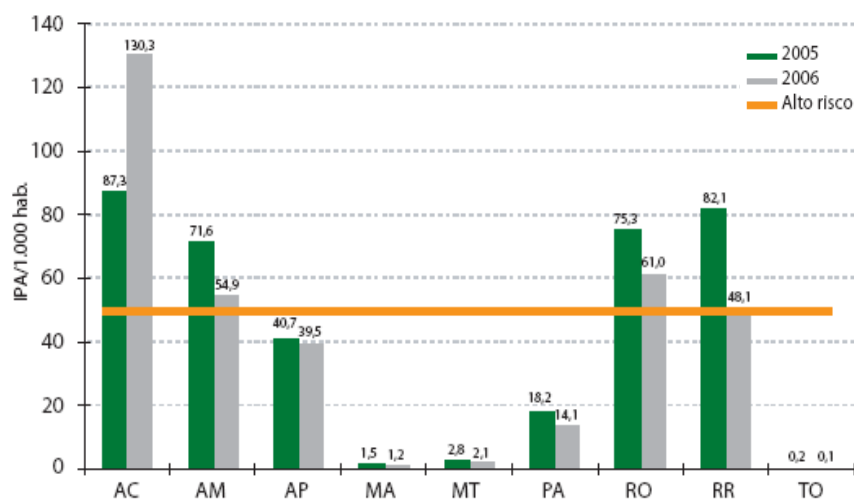
Nos estados das demais regiões, os casos registrados são quase totalmente importados da região Amazônica ou de outros países onde ocorre transmissão. Tem sido registrado o aparecimento de surtos de malária em outros estados do Brasil como Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Ceará, Minas Gerais, Bahia, devido provavelmente, ao grande fluxo migratório dessa população para outras regiões.

Embora a maior parte dos casos de malária, na Amazônia, seja devida ao *P. vivax* e, apesar de haver uma diminuição geral dos casos, é preocupante o aumento do percentual de casos de malária por *P. falciparum*, favorecendo a ocorrência das formas graves e de mortes na região. No período de 1999 a 2004, houve aumento da proporção de malária por *P. falciparum* de 18,6% para 23,7% (SISMAL-SIVEP). Os estados que mais contribuíram para esse crescimento foram Amazonas (11,5%), Amapá (272,6%), Maranhão (112,3%), Pará (19,2%) e Rondônia (22,5%).

Estudos recentes vêm mostrando a alta prevalência de indivíduos com malária assintomática na região amazônica, podendo acarretar em novos problemas de estratégia para controle da infecção (Alves et al, 2002). Devido à elevada incidência, a malária colabora com a decadência do homem na região amazônica, reduzindo a qualidade de vida e limitando o crescimento sócio-

econômico e cultural, sendo assim um dos principais problemas de saúde pública no país.

Fig 1. Incidência Parasitária Anual da malária, por unidade da Federação. Amazônia Legal, 2005 e 2006.



Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS

1.2 Ciclo da malária

O ciclo de vida do parasita é complexo, incluindo estágios no hospedeiro humano e no inseto vetor. Este ciclo de vida é essencialmente o mesmo em todas as espécies de parasitas da malária humana, compreendendo uma fase exógena sexuada (esporogonia) e uma endógena assexuada (esquizogonia), como representado na figura 2.

As fontes de infecção humana para os mosquitos são pessoas doentes ou mesmo indivíduos assintomáticos que albergam as formas sexuadas do parasito.

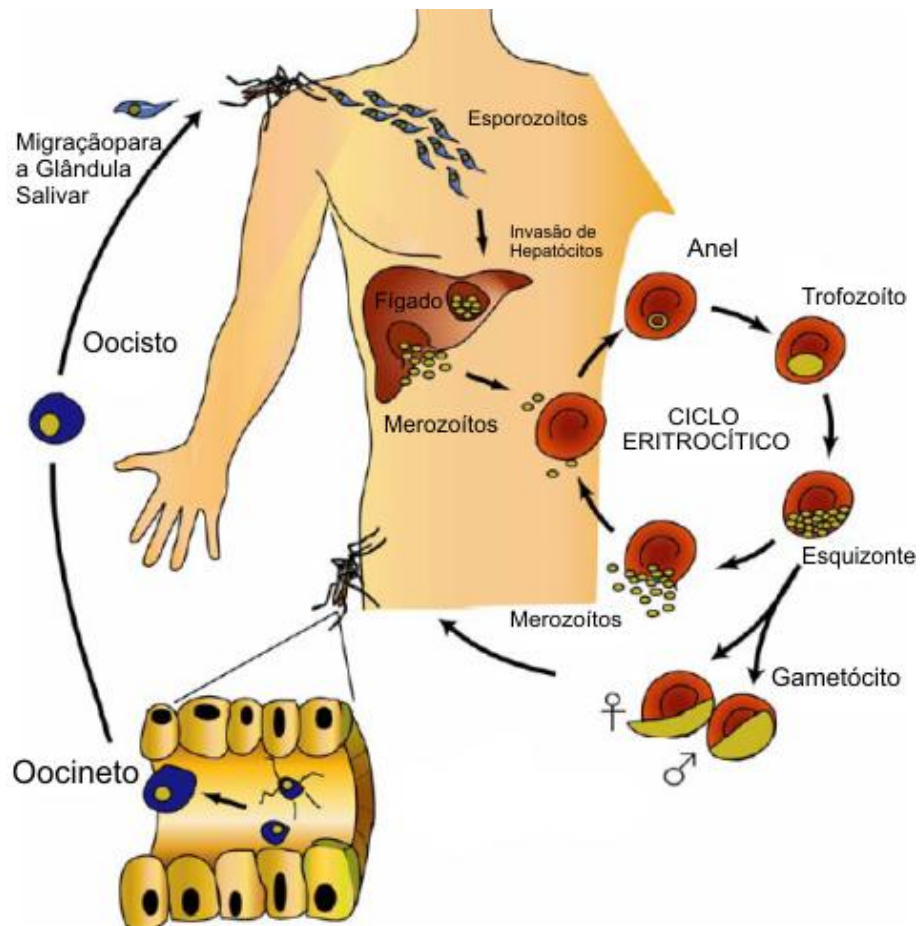
A infecção malárica inicia-se quando os esporozoítos infectantes são inoculados no homem pela fêmea do anopheles quando esta pica o hospedeiro, durante o repasto sanguíneo (Neves, 2002). O *Plasmodium*, aproximadamente após trinta minutos, invade o fígado e amadurece na forma de esquizonte (5 a 15 dias). O *P. vivax* e *P. ovale*, podem evoluir para uma fase estacionária, hipnozoíto, podendo permanecer latentes durante meses, originando esquizontes teciduais em período variável de tempo, responsáveis por recidivas da doença (Cogswell et al, 1983). O desenvolvimento dos esquizontes hepáticos é completamente assintomático e os sintomas se desenvolvem com aumento da carga parasitária no sangue. A forma esquizonte hepático contém entre dez mil a trinta mil merozoítos que são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos. A cada ciclo eritrocitário, a liberação dos produtos do metabolismo do parasito, como a hemozoína, ativa cascatas da inflamação e células imunes, levando a produção

de citocinas pró-inflamatórias, que levam ao aparecimento dos sintomas (Schofield e Grau, 2005).

Após liberação de novos merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuados, os gametócitos. Os gametócitos formados no homem são ingeridos pelo vetor durante a hematofagia. Dentro do mosquito, o parasito amadurece até alcançar o estágio sexual (fase esporogônica) onde, novamente, pode infectar o hospedeiro humano (Rey, 2001). A fecundação ocorre no tubo digestivo do mosquito. A fusão dos gametócitos leva a formação do oocisto, em célula do epitélio intestinal do mosquito. Com a esporulação, ocorre a ruptura do oocisto, liberando os esporozoítos. Estes migram para a glândula salivar do mosquito, sendo posteriormente inoculados no hospedeiro vertebrado.

Os vários estágios do parasito permitem ao *Plasmodium* evadir o sistema imune, infectar o fígado e as células sanguíneas, e desenvolver formas capazes de infectar novamente o mosquito. O *Plasmodium* submete-se a uma série de mudanças no seu ciclo de vida, ocorrendo no homem, maior resposta do sistema imune aos antígenos e aos produtos do parasito no ciclo eritrocítico.

Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium sp.*



Adaptado de Berczky S., 2005.

1.3 Manifestações clínicas da malária

Acredita-se que a manifestação clínica da malária depende de uma série de fatores incluindo a espécie do plasmódio, a idade e a imunidade do hospedeiro contra o parasito (Druihe e Perignon, 1997; Hisaeda et al, 2005).

Na malária, o maior número de casos é clinicamente silencioso, demonstrando a capacidade dos mecanismos imunológicos em evitar os sintomas. Em indivíduos não imunes, as infecções são clinicamente mais evidentes e um menor número de casos pode se tornar grave e levar a morte (Greenwood et al, 2005).

O ciclo eritrocítico assexuado é o responsável pelas manifestações clínicas da malária (Druihe e Perignon, 1994). A passagem do parasito pelo fígado (ciclo exo-eritrocítico) não causa destruição tecidual e não determina sintomas (Doolan e Hoffman, 2000). A destruição dos eritrócitos e a conseqüente liberação dos parasitos e de seus metabólitos na circulação provocam uma resposta do hospedeiro, determinando alterações morfológicas e funcionais observadas no indivíduo com malária (Neves, 2002).

1.3.1 Malária não complicada

Na malária, os sintomas aparecem aproximadamente 9 a 14 dias após a picada do mosquito, embora estes variem em intensidade entre as diferentes espécies de *Plasmodium*. As manifestações clínicas mais freqüentemente observadas na fase aguda são comuns às quatro espécies que parasitam o

homem. Em geral, os acessos maláricos são acompanhados de intensa debilidade física, náuseas e vômito. Adultos não imunes, bem como crianças e gestantes podem apresentar formas mais graves da infecção no caso de *P.falciparum*, podendo levar à morte (Neves, 2002).

O período de incubação de malária varia de acordo com a espécie de plasmódio, sendo de 12 dias para *P.falciparum*, 13 a 17 dias para *P. vivax* e 28 a 30 dias para *P.malariae*. Uma fase sintomática inicial caracterizada por mal-estar, cefaléia, cansaço e a febre clássica da malária. Estes sintomas são comuns a muitas outras infecções, não permitindo um diagnóstico clínico seguro. O acesso malárico coincidente com a ruptura das hemácias ao final da esquizogonia é geralmente acompanhado de calafrio e sudorese. Esta fase dura de 15 minutos à uma hora, sendo seguida por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 40⁰C ou mais. Após um período de duas a seis horas, o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa. Portanto, o padrão na malária mais observado é o da febre cotidiana.

1.3.2 Malária Grave e Complicada

O aparecimento de convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia, hipoglicemia e distúrbio da consciência são indicadores do pior prognóstico. Ambos *P. falciparum* e *P. vivax* podem causar anemia grave, mas somente a infecção por *P. falciparum* causa complicações como a malária cerebral, hipoglicemia e acidose metabólica. As características clínicas da malária grave incluem insuficiência renal aguda, hipoglicemia, icterícia, hemoglobinúria, edema pulmonar agudo e a malária cerebral. Estima-se cerca de 2% dos

indivíduos parasitados pelo *P falciparum* apresentem malária cerebral (Neves, 2002).

Os principais sintomas da malária cerebral são: uma forte cefaléia, hipertermia e vômitos. Em crianças ocorrem convulsões. O paciente evolui para um quadro de coma, com pupilas contraídas e alteração dos reflexos profundos (Neves, 2002). A malária cerebral é consequência de uma cascata de eventos, envolvendo a produção de toxinas pelo parasito e de citocinas pelo hospedeiro e a amplificação da expressão de receptores para citoaderência nas células do endotélio capilar cerebral (Hommel, 1993). A variedade de propriedades dos diferentes isolados do parasito, de diferentes "bagagens" genéticas do hospedeiro e de graus de imunidade antimalárica modularia este fenômeno. Diferentes mecanismos estão implicados na patogênese da malária cerebral, alguns dos quais incluem a produção de mediadores antiinflamatórios pelo hospedeiro em resposta a infecção (Engwerda e Good, 2005).

1.3.3 Malária Assintomática

Um dos fatores que pode estar relacionado à manifestação clínica da malária é a habilidade do organismo em limitar a parasitemia, reduzindo o risco de morbidade e mortalidade. Em áreas de alta taxa de transmissão, os indivíduos que sobrevivem aos inúmeros ataques e chegam à idade adulta, atingem o estágio de imunidade clínica conhecido como "premunição", onde embora infectados, apresentam geralmente uma baixa parasitemia e escassa ou nenhuma sintomatologia (Neves, 2002).

A malária assintomática é ocorre lentamente e requer estímulos antigênicos constantes através das sucessivas picadas, é lábil na medida em que desaparece se cessarem estes estímulos, parcial devido à persistência de parasitemia e sintomatologia e vulnerável a mudanças na resposta imune do hospedeiro (Veronesi, 1996).

A descrição infecção de indivíduos assintomáticos, nas Américas, é relativamente recente. No Brasil, De Andrade e cols. (1995) demonstraram que 70% dos casos entre mineradores no Mato Grosso eram assintomáticos. Roshanravan e cols, em 2003, estudando as populações na parte peruana da bacia do Amazonas, acharam um predomínio de 17,6% de indivíduos assintomáticos e Suárez-Mutis e cols. (2000) encontraram um índice de 21,6% entre populações nativas na parte colombiana da bacia de Amazonas.

Alves e cols. (2002), estudando uma comunidade ribeirinha das margens do Rio Madeira (Portochuelo) e seis comunidades ao longo do Rio Ji-Paraná, em Rondônia, detectaram a infecção por *Plasmodium* através da técnica de *reação de polimerase em cadeia* (PCR), 6 a 7 vezes mais eficientemente que o diagnóstico por microscopia. As infecções assintomáticas eram 4 a 5 vezes maiores que infecção sintomática e foi encontrada mais freqüentemente entre pessoas que tinham vivido por mais tempo na área. Em 2004, Suárez-Mutis e cols. demonstraram que 20,4% dos casos entre a população envolvida em atividades extrativas próximas ao rio Negro eram assintomáticos.

Alves e cols., em 2005, descreveram a existência de portadores assintomáticos infectados por *P. vivax* e *P. falciparum* em populações nativas de Amazônia. A maioria delas teve baixa parasitemia, detectada só por PCR. Através de estudo experimental, *A. darlingi*, o vetor mais importante do

Plasmodium na região amazônica, pôde ser infectado por pacientes sintomáticos e assintomáticos. Baixos índices de infecção foram encontrados no mosquito, 1,2%, após alimentação em indivíduos assintomáticos, demonstrando experimentalmente que indivíduos assintomáticos são reservatórios por longo tempo.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na infecção e expressão de diferentes quadros clínicos da malária ainda não foram elucidados.

1.4 Imunologia da malária

Na malária, a resposta imune protetora não é particularmente efetiva. Várias parecem ser as causas: a estrutura dos antígenos parasitários e sua considerável diversidade dificulta a resposta imune, influenciando a sobrevivência do parasita e a sua transmissão ao vetor. A liberação de exo-antígenos e/ou de mediadores celulares produzidos em resposta ao parasito modula a resposta imune tornando-a menos eficiente (imunodepressão, ativação policlonal, produção de auto e heteroanticorpos, hipergamaglobulinemia). Além disso, a localização intracelular do parasito e ausência de moléculas de MHC no eritrócito concorrem para que estes proporcionem um meio relativamente favorável ao crescimento do plasmódio (Veronesi, 1996).

A imunidade à malária é complexa e essencialmente espécie e estágio específicos. Mecanismos efetores imunes inatos e adaptativos podem limitar o pico da parasitemia, prevenir lesão grave e reduzir os níveis circulantes de células infectadas (Good e Doolan, 1999). Porém, esses mecanismos podem

não ser efetivos na eliminação da infecção por completo levando, assim, à persistência da infecção através do baixo grau parasitêmico. Dessa maneira, o parasito pode não ser descoberto por análise microscópica e persiste durante meses ou anos (Frank et al, 2001).

1.4.1 Imunidade Inata

A resistência inata é uma propriedade inerente ao hospedeiro e independe de contato prévio com o parasito. Fatores do hospedeiro, geneticamente determinados, podem influenciar a sua suscetibilidade a malária.

As células dendríticas (DCs) e macrófagos são células apresentadoras de antígenos (APCs) que têm um papel importante no sistema imune inato e adaptativo (Guermonprez et al, 2002). A ativação de DCs e de macrófagos talvez seja um dos eventos mais iniciais na resposta imune inata contra a malária. Estudos utilizando macrófagos provenientes do homem ou camundongos sugerem um papel importante para essas células na imunidade inata à malária devido a sua capacidade para fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos citofílicos ou anticorpos opsonizantes malária-específicos. Experimentos realizados por Kain e cols, indicaram um papel para receptores “scavenger”, incluindo CD36, na fagocitose de eritrócitos infectados por *P. falciparum* por monócitos de indivíduos não-imunes (Kain et al, 2000). Esta interação provavelmente envolve ligação de CD36 a proteína de membrana de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (PfEMP1) em células infectadas e não contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias por

monócitos/macrófagos. Essa adesão pode modular a resposta imune adaptativa, assim como a gravidade da doença.

No entanto, os macrófagos talvez sejam mais importantes durante a imunidade adaptativa como células efetoras que podem mediar a inibição celular dependente de anticorpos ou a produção de moléculas contra o parasito, tal como óxido nítrico, após ativação por IFN- γ produzido por células T CD4+ (Good, 2001).

Células dendríticas também são APCs que têm um papel central nas respostas imunes inata e adaptativa, especialmente em resposta a infecções microbianas, devido a sua capacidade de estar em locais de entrada de patógenos, respondendo a sinais microbianos, no processamento de antígeno e ativação de células T naive e de memória (Guernonprez et al, 2002; Sher et al, 2003). Dados sugerem que funções típicas e importantes de DCs como maturação e produção de citocinas (ex. IL-12) podem ser moduladas por hemácias infectadas por *Plasmodium* (Seixas et al, 2001; Luyendyk et al, 2002).

Outro tipo celular da imunidade inata são as células NK. Em muitas infecções, a ativação da célula NK parece ocorrer principalmente em resposta à produção de citocinas tal como IL-12 e IL-18 por monócitos/macrófagos e DCs (Biron, 1999). Células NK de indivíduos expostos à malária podem lisar eritrócitos infectados por *P. falciparum*, indicando reconhecimento específico de eritrócitos parasitados (Orago e Facer, 1991). O contato direto entre célula NK e eritrócitos parasitados parece ser um requisito para a ativação de célula NK (Artavanis-Tsakonas et al, 2003).

Os resultados descritos acima sugerem que as DCs, células NK e macrófagos desempenham papéis importantes como células efetoras na imunidade inata à malária.

1.4.2 Imunidade adquirida

Imunidade naturalmente adquirida é provavelmente induzida por múltiplas exposições ao parasito e pode levar anos para se desenvolver, embora em algumas populações este período seja curto (Baird, 1998). A história natural da malária em regiões de alta transmissão, como na África e em algumas regiões da Ásia, mostra bem a complexidade da resposta imunológica naturalmente adquirida pelo homem contra o plasmódio e a relação parasito-hospedeiro que se desenvolve nos indivíduos cronicamente expostos a doença (Bruce-Chwatt, 1985).

A imunidade naturalmente adquirida é espécie-específica e também estágio – específica.

1.4.3 Imunidade específica estágio pré-eritrocítico

Vários estudos têm mostrado que anticorpos contra diversas proteínas de superfície do esporozoíto podem mobilizar esporozoítos e neutralizar sua infectividade, bloqueando o parasito nos hepatócitos (Stewart et al, 1986; Giha et al, 2000; Hisaeda et al, 2005;). Apesar da rápida permanência na corrente sanguínea, os esporozoítos induzem uma resposta imune que resulta na

produção de anticorpos dirigidos contra antígenos de sua superfície, em particular contra a proteína circunsporozoíto (CSP).

A expressão de proteínas como CSP e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), estão implicadas no reconhecimento de esporozoítos e na entrada em hepatócitos, podendo explicar o desenvolvimento da infectividade (Robson et al, 1995). Acredita-se que os anticorpos bloqueiam a motilidade necessária a invasão do parasito na célula hospedeira (Stewart e Vanderberg, 1991). Durante a fase de desenvolvimento intra-hepático, o parasito também é capaz de funcionar como alvo da resposta imune. Durante esta fase do desenvolvimento intracelular do parasito, os mecanismos celulares parecem atuar diretamente através da citotoxicidade de linfócitos ou indiretamente através de citocinas (Good e Doolan, 1999; Good, 2001).

Células T CD8⁺ específicas para antígenos do estágio pré-eritrocítico, quando ativadas têm ação citotóxica destruindo o hepatócito infectado e secretando citocinas que atuam sobre os parasitas intracelulares (Hoffman e Franke, 1994).

Células T CD4⁺ específicas exercem um papel importante na imunidade anti-esporozoíta com secreção de citocinas como IFN- γ , potente ativador de monócitos e macrófagos, induzindo fagocitose, morte dos parasitas e secreção de interleucinas como IL-1 e IL-6 que inibem o desenvolvimento intra-hepático do parasita no homem e em camundongos (Stewart et al, 1986).

1.4.4 Imunidade específica estágio eritrocítico

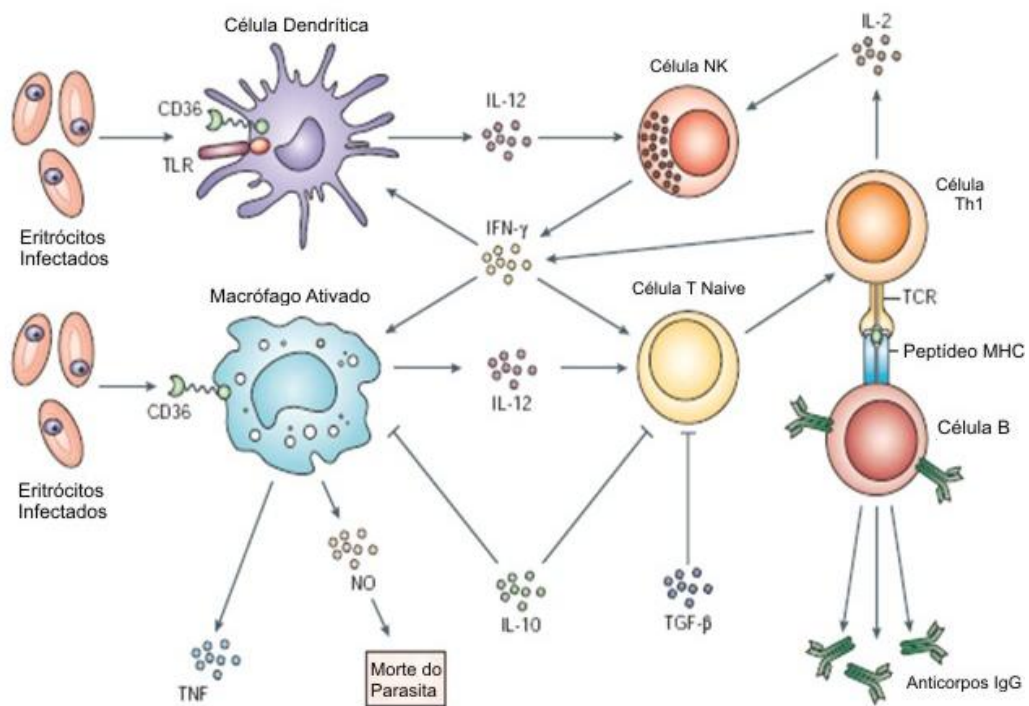
A imunidade contra os estágios eritrocíticos sexuados pode diminuir a infectividade dos gametas aos mosquitos e bloquear assim a transmissão da

malária ao hospedeiro (Carter e Chen, 1976). Após a picada no indivíduo infectado, anticorpos contra antígenos de superfície dos gametas entram em contato com os gametas quando estes são liberados das hemácias do hospedeiro no intestino do mosquito. Os principais mecanismos efetores são mediados por anticorpos anti-gametócitos que bloqueiam a fertilização (Read, 1994) ou medeiam a lise dos gametas por complemento (Carter et al, 1989; Shahabudin et al, 1993).

Na imunidade específica estágio eritrocítico assexuado, a resposta imune envolve mecanismos dependentes e independentes de anticorpos e as células T CD4+ têm um papel importante, agindo no controle e remoção do parasito (Taylor-Robinson e Philips, 1993). O envolvimento de subpopulações de células T CD4+ Th-1 e Th-2 foram estudados na infecção humana (figura 3). Experimentos in vitro com células de doadores residentes em áreas endêmicas, revelaram que ambos os tipos celulares são ativados, com produção tanto de IFN- γ como de IL- 4 para o controle da infecção plasmodial (Aubouy et al, 2002).

Fig. 3 Resposta imune inata e adaptativa.

Possível regulação da imunidade adaptativa à fase eritrocítica por citocinas produzidas por células da resposta imune inata.



Adaptado de Mary M. Stevenson e Eleanor M. Riley, 2004.

1.5 Papel das citocinas na patogênese da malária

Durante a fase aguda da malária, ocorrem ativação e a mobilização das células imunocompetentes que produzem citocinas que agirão direta ou indiretamente sobre o parasito, porém estas podem ser nocivas para o hospedeiro (Langhorne et al, 2002; Dodo et al, 2002).

A imunidade clínica a malária é caracterizada pelo controle da replicação do parasita de tal forma que a parasitemia periférica permaneça capaz de modular os efeitos da produção de pirógenos endógenos (IL-1, IL-6 e TNF- α) associada com a infecção malarial (Clark e Schofield, 2000). As citocinas são também cruciais para a indução de mecanismos imunes efetores através do equilíbrio entre esses mediadores inflamatórios (Omer et al, 2000).

As citocinas têm sido descritas por sua associação com sintomatologia. A febre, por exemplo, que envolve monócitos e macrófagos ativados por produtos do parasito, é induzida pela ação de pirogênicos endógenos (Dinarello, 1999). A hemozoína, produto do parasito é capaz de induzir a liberação de citocinas por monócitos, macrófagos e, possivelmente, células endoteliais (Engwerda e Good, 2005).

Estudos com a análise das citocinas e mediadores inflamatórios secretados em indivíduos expostos ao *Plasmodium* e que desenvolvem diferentes formas clínicas da doença são importantes para a elucidação de fatores determinantes da doença/infecção e fornecem dados para um melhor entendimento da patogênese da malária. Poucos foram os trabalhos nas populações de áreas endêmicas para malária.

As citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ apresentam importante papel na indução da resistência do hospedeiro contra parasitas intracelulares (Shevach et al, 1999; Diefenbach et al, 1998; Sher et al, 2003). Em modelo experimental murino, a malária é caracterizada por indução na produção de TNF- α , IL-12 e IFN- γ no início da infecção (Omer et al, 1998; Li et al, 1999; Tsutsui e Kamiyama, 1999).

A resposta inflamatória inicial efetiva, mediada por IFN- γ e dependente de IL-12 e IL-18, é de suma importância para o controle da parasitemia e resolução da infecção por malária através de mecanismos de indução de TNF- α e aumento da liberação de NO e radicais oxigênio (Malaguarnera et al, 2002; Artavanis-Tsakonas et al, 2003).

IFN- γ e TNF- α , derivadas de células pertencentes ao sistema imune inato e adaptativo, são liberadas na circulação logo após a infecção, e altos níveis dessas citocinas foram associados com sintomas clínicos tais como febre e mal-estar e em alguns casos, o desenvolvimento de malária cerebral e anemia grave em indivíduos suscetíveis (Grau et al, 1989; Harpaz et al, 1992; Day et al, 1999). Estas citocinas, IFN- γ e TNF- α , são também componentes de imunidade protetora e foi mostrado em modelos murinos (Langhorne et al, 1989; Jacobs et al, 1996) e estudos em seres humanos (Mordmüller et al, 1997) que a capacidade celular para produzir estas citocinas durante fase inicial da infecção é essencial para o controle da parasitemia.

A malária grave tem sido associada com altos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6 (Richards, 1997; Malaguarnera, et al, 2002). A produção excessiva de citocinas pode afetar o resultado da doença através do efeito sistêmico direto e aumentar

citoadesão ao endotélio de eritrócitos parasitados, através da modulação de moléculas de adesão na infecção por *P falciparum* (Day et al, 1997).

A citocina IL-12 tem sido descrita por seu importante papel na imunidade protetora à etapa eritrocítica da malária (Su e Stevenson, 2002) e por sua capacidade de induzir produção de IFN- γ por células NK e células T (Trinchieri, 1998). IL-12 também aumenta citotoxicidade de célula NK, induz proliferação de célula T e é um estímulo potente, ambos *in vitro* e *in vivo*, para desenvolvimento de célula Th1 (Gately et al, 1998).

Apesar de alguns estudos com malária humana indicarem que a forma clínica (leve vs grave) está associada a um aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias, os mecanismos de regulação desses mediadores não são bem entendidos. O controle da resposta inflamatória gerada durante a infecção é crucial para prevenir danos ao hospedeiro. Citocinas antiinflamatórias como IL-10 tem sido implicada como mediador chave na prevenção e regulação de resposta inflamatória exacerbada (Fiorentino et al, 1991). Níveis de IL-10 estão elevados em pacientes com quadro clínico típico para malária (Wenish et al, 1995). Paralelamente, produção de IL-10 poderia estar envolvida no controle de danos inflamatórios gerados pelo parasito (Ho et al, 1995).

Ainda não foi determinado se outros mediadores antiinflamatórios induzidos durante a infecção estão envolvidos com o controle de uma resposta exacerbada ou ainda, desenvolvimento de diferentes quadros clínicos da malária.

Uma nova classe de compostos antiinflamatórios induzidos durante infecções experimentais bacterianas ou parasitárias tem sido descrita, as lipoxinas.

1.6 As lipoxinas

As lipoxinas são potentes mediadores lipídicos, formados localmente após interação célula a célula, podendo ocorrer durante a inflamação promovendo a resolução de uma grande variedade de processos inflamatórios (Serhan et al, 1994). Esses compostos foram descritos como a primeira família de mediadores, gerados pelo ácido aracdônico, reconhecida por propriedades antiinflamatórias e de pró-resolução em uma variedade de processos inflamatórios. Um esquema simplificado da biossíntese destes derivados eicosanóides da lipoxigenase (LO) está demonstrado na figura 4.

As lipoxinas, produto da ação das lipoxigenases, são geradas no sítio de lesão ou inflamação através de uma via biossintética ativada durante interação de células. Atuam inibindo a aderência de PMN, migração, degranulação e geração de superóxido, também na migração de eosinófilos e ativação de linfócitos, e têm potente atuação na formação e liberação de citocinas (Ramstedt et al,1985; Serhan,1994; Bandeira-Melo et al, 2000; Ariel et al, 2003).

As lipoxigenases têm sido detectadas em plantas, animais, organismos marinhos e em alguns microorganismos (Hawkins et al, 1987; Grechkin et al, 1998; Kuhn e Thiele, 1999;). São enzimas que atuam na peroxidação de lipídios através da introdução de oxigênio na cadeia de hidrocarboneto dos ácidos graxos poliinsaturados (Brash, 1999). Três lipoxigenases têm sido descritas em tecidos de mamíferos. Estas incluem a 5-LO, 12-LO e 15-LO, transformando o

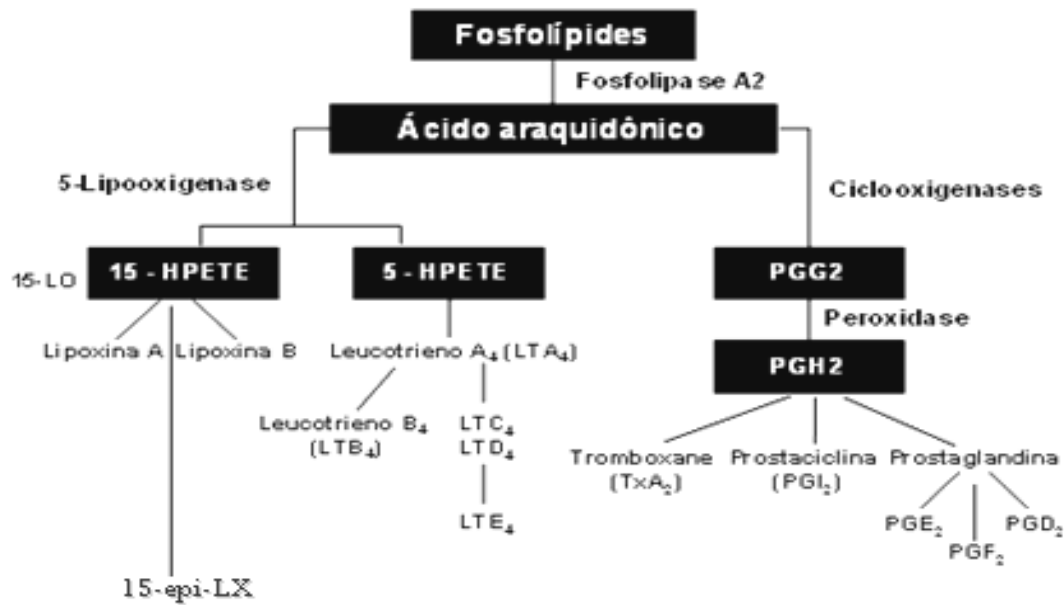
ácido aracdônico em derivados biologicamente ativos (Hamberg M e Samuelsson, 1974; Borgeat et al, 1976; Borgeat e Samuelsson, 1979).

A biossíntese desses derivados eicosanóides da lipoxigenase ocorre através de três grandes vias transcelulares. A primeira via envolve a interação neutrófilo polimorfonuclear-plaqueta, promovendo a formação de lipoxina por ação de 5 – lipoxigenase (LO). Esta via tem sido descrita como a principal para a formação da lipoxina (LX) envolvendo a 5-LO, presente em células da linhagem mielóide e a 12-LO presente em plaquetas. A 5-LO também gera leucotrieno A4 (LTA4) a partir do ácido aracdônico que é rapidamente absorvido pelas plaquetas, onde convertem o LTA4 em lipoxina (LX)A4, através da 12-LO. Esta tem atividade de oxigenase na formação da lipoxina pelo substrato LTA4 (Serhan e Sheppard, 1990).

A segunda via ocorre através da ação da enzima 15-LO, em células epiteliais e monócitos, por conversão do leucotrieno A4 em lipoxina (LX)A4.

Uma via adicional de biossíntese da lipoxina ocorre através da 15-epi-LX desencadeada pela aspirina. A aspirina induz acetilação da cicloxigenase (COX)-2 e muda sua atividade, promovendo a conversão do aracdonato a 15-HETE, onde através da ação da 5-LO é transformada em 15-epi-LX, com função mais potente e eficaz que lipoxinas nativas.

Fig. 4 Cascata do Ácido Araquidônico.



Após o início de um evento inflamatório, como lesão ou invasão microbiana, a resolução da inflamação e o retorno à homeostasia tecidual são essenciais. A resolução da inflamação é constituída por uma série de eventos bem orquestrados com a participação de mediadores endógenos do hospedeiro que atuam ativamente para extinguir as respostas prolongadas e excessivas do hospedeiro (Serhan, 2002; Nathan, 2002).

Pelo seu papel na resolução da inflamação, as lipoxinas têm uma importante função na imunorregulação de doenças associadas à inflamação (Golding et al, 2003).

Alguns trabalhos recentes, em modelos animais, têm demonstrado a importância da lipoxina como mediador imuno-modulatório em doenças infecciosas e o uso potencial de seus efeitos inibitórios na inflamação, favorecendo a sobrevivência, replicação e transmissão do patógeno (Aliberti et al, 2002; Aliberti e Bafica, 2005).

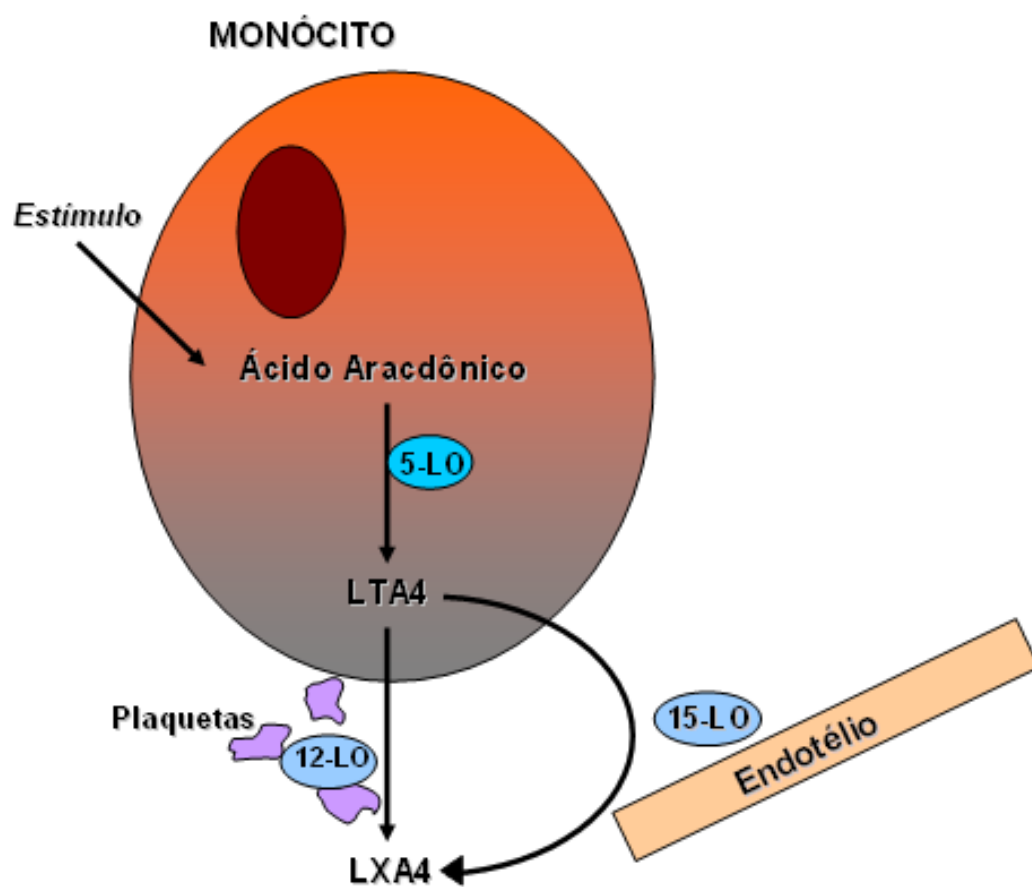
A geração de lipoxinas tem sido descrita como um possível mecanismo de escape do sistema imune pelo patógeno. Durante infecção por *Toxoplasma gondii*, mediadores pró-inflamatórios como IL-12, IFN- γ e TNF- α são essenciais no controle do crescimento do parasita. Esses fatores, no entanto, podem ser prejudiciais ao hospedeiro se produzidos em excesso, e seus efeitos necessitam ser contrabalançados pela indução de mediadores regulatórios incluindo a lipoxina (Machado e Aliberti, 2006). Por exemplo, camundongos infectados com *T. gondii* apresentam uma alta produção de lipoxina (LX) A4 e esta inibe a produção de IL-12, que por sua vez modula a resposta inflamatória (Aliberti et al, 2002). Durante infecção por *T. gondii*, in vivo, a LXA4, derivada da 5-LO, atua como um regulador negativo da produção de IL-12 por células dendríticas (Aliberti et al, 2002). Durante infecção micobacteriana, baixos níveis de LXA4 foram detectados no soro de camundongos deficientes de 5-LO em comparação com animais controles. Esta redução está associada a uma alta produção de mediadores pró-inflamatórios incluindo IL-12, IFN- γ e NOS2 (Bafica et al, 2005). As lipoxinas parecem ser importantes fatores de escape utilizados por agentes infecciosos como *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Em modelo murino, tem sido demonstrado papel da LXA4 exógena em células epiteliais expostas a *Salmonella typhimurium*, através da inibição da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (Gewirtz et al, 2002). Esses dados sugerem que a LXA4, induzida por estímulos microbianos, apresenta efeitos amplos na resposta do hospedeiro à infecção (figura 5).

Apesar de uma clara evidência do papel das lipoxinas em modelos experimentais, o envolvimento desses eicosanóides não foi explorado em infecções humanas.

Fig. 5 Formação da Lipoxina A4.

Via biossintética dependente de 5-LO e 12-LO, convertendo ácido aracdônico em LTA4 e LXA4, secretada pela célula infectada.



Adaptado de Serhan et al, 2002

Hipótese

Indivíduos com malária assintomática apresentam aumento nos níveis circulantes do mediador antiinflamatório Lipoxina (LX)A4 em comparação a pacientes com malária sintomática e controles da área endêmica.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar os níveis de LXA4 e de citocinas pró e antiinflamatórias presentes no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de LXA4 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles endêmicos.
- Dosar os níveis das citocinas IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles endêmicos.
- Correlacionar os níveis de LXA4 com os níveis plasmáticos das citocinas IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10.

2.JUSTIFICATIVA

No Brasil, mais precisamente, na região amazônica, tem sido demonstrada a alta prevalência de malária, incluindo casos assintomáticos. Em comunidades ribeirinhas, em Rondônia, a prevalência de infecções assintomáticas foi de 4 a 5 vezes maior que a infecção sintomática, com uma média de 49,5% (Alves et al, 2002). Portanto, a infecção assintomática por *Plasmodium* tem sido considerada como uma fonte de continuação da infecção malárica, por albergar o parasito e não desenvolver sintomatologia clínica.

Alguns trabalhos têm demonstrado a ação das lipoxinas como mediadores regulatórios em doenças infecciosas e seus efeitos antiinflamatórios, contribuindo com a sobrevivência e transmissão do patógeno (Aliberti e Bafica, 2005). As lipoxinas podem estar envolvidas nos mecanismos imuno-modulatórios na malária assintomática.

O fato de ainda não ter sido explorado o papel desses eicosanóides na regulação da resposta imune em doenças infecciosas humanas e a evidência da ação da LXA₄ em doenças infecciosas como toxoplasmose, tuberculose (em modelos experimentais), consideramos importante a realização desse estudo sobre a utilização dos mediadores lipídicos antiinflamatórios na regulação da resposta inflamatória da malária assintomática durante infecção pelo *Plasmodium* em área endêmica para malária, no estado de Rondônia- Brasil.

3.CASUÍSTICA

O estudo foi desenvolvido em parceria com o Instituto de Ciências Biomédicas-5, Universidade de São Paulo, localizado no município de Monte Negro, a 248 km a sudoeste de Porto Velho – RO (figura 6).

A pesquisa contou com a participação de voluntários de comunidades ribeirinhas localizadas em Rondônia. O recrutamento dos pacientes foi aleatório, não havendo restrição por idade, gênero ou etnicidade. As amostras das comunidades ribeirinhas de Rondônia foram coletadas em julho de 2005, acondicionadas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunorregulação (LIMI / CPqGM - FIOCRUZ) para realização das análises.



Fig. 6 Área de estudo em Rondônia

Este estudo caracterizou-se como estudo de corte transversal e foi realizado com pacientes com malária (n=17), malária assintomática (n=14) e controles saudáveis (n=17) de comunidades ribeirinhas de Rondônia. O diagnóstico foi realizado através de exame clínico, hemoscopia para malária e PCR.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ). Foram incluídos pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* ou *P. vivax*, com ou sem sintomas de malária, que concordaram em participar do estudo após serem informados sobre o protocolo do estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e após explicação dos objetivos e finalidades da pesquisa.

O grupo controle, de indivíduos de comunidades ribeirinhas de Rondônia, consta de indivíduos que não apresentaram parasitas na hemoscopia e foram negativos na PCR. O estudo contou com um total de 17 doadores, sendo 06 do gênero feminino e 11 do gênero masculino.

O grupo de indivíduos com malária assintomática apresentou hemoscopia negativa e PCR positivo para *P. vivax* e *P. falciparum*.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunorregulação (LIMI / CPqGM - FIOCRUZ) para realização das análises moleculares e testes imunológicos; as extrações da lipoxina A4 foram realizadas no Laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da UFBA, com a colaboração do Dr. Jailson Bittencourt de Andrade.

4.MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram obtidos 5 mL de sangue periférico dos pacientes e controles endêmicos, através do sistema de coleta a vácuo (Vacuntainer Franklin Lakes-NJ-EUA) em tubos heparinizados.

As lâminas de gota espessa, utilizadas para o diagnóstico da malária e seleção desses indivíduos do estudo, foram enviadas pelo Instituto de Ciências Biomédicas-5, Universidade de São Paulo.

5.2 SEPARAÇÃO DO PLASMA

O plasma dos pacientes foi separado por centrifugação a 3000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. As amostras foram aliquotadas e acondicionadas a -70° C para uso posterior.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico do *Plasmodium* foi extraído usando protocolo de tratamento com proteinase K e extração com Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico.

Inicialmente as lâminas de gota espessa foram descoradas com álcool acido a 1% e lavadas com salina para retirar o corante. Após isso, foram adicionados 25 μ L de Tris - EDTA – NaCl (10 mM- 10 mM- 0,15 mM) à lâmina, afim de raspar e concentrar as células. O “pellet” de células foi ressuspenso na solução de TEN 0,15, SDS 20% e proteinase K (10 mg /mL). Essa solução foi

incubada a 37°C, “overnight”. Em seguida adicionava-se nova solução de Tris - EDTA – NaCl (10 mM- 10 mM- 0,65 mM) e fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Agitava-se vigorosamente e centrifugava-se a 10.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, transferia-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionava-se Etanol Absoluto para precipitação do DNA. O tubo foi então homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O álcool foi descartado e o “pellet” lavado com Etanol 75%, que após centrifugação foi seco ao ar e ressuspensão em 40 µL de H₂O MiliQ autoclavada. As amostras de DNA foram quantificadas e acondicionadas à –20°C para posterior utilização.

5.4 Nested PCR DO GENE *DO PLASMODIUM*

Amostras de DNA foram processadas por Nested PCR para amplificar seqüências espécie-específicas dos genes da subunidade menor do ribossomo (18S SSU rRNA) de *P. falciparum* e *P. vivax*, como descrito por Snounou, 1996, com algumas modificações, descritas abaixo..

No primeiro passo, um fragmento de 1200 pb dos genes 18S do *Plasmodium sp* foi amplificado usando 10 µmoles de cada primer gênero específico, chamados PLU6 (PRIMER FORWARD) 5' TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG 3' e PLU5 (PRIMER REVERSE) 5' CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC 3'. Vinte microlitros da mistura de PCR (10 mM de DNTPs, 50mM MgCl₂, 1,25U de Taq polymerase, 250 nM de cada primer) foram adicionados a 60 ng do DNA genômico.

As reações foram amplificadas em termociclador Perkin Elmer com as seguintes condições de temperatura: 95°C por 5 minutos para desnaturação do

DNA, 57,8°C por 1 minuto, para pareamento dos primers e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão do primer pela Taq DNA Polimerase por 35 ciclos.

Foram utilizados 5µL do primeiro produto de PCR amplificado para o segundo ciclo de amplificação. O procedimento da segunda PCR foi realizado usando as seqüências dos primers (PRIMER VIV1 FORWARD) 5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC -3 e 5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT -3 (PRIMER FAL1 FORWARD) sintetizadas de acordo com dados publicados por Snounou, 1996, gerando um fragmento com 120 pb e 205 pb, respectivamente.

As condições de amplificação do DNA foram: 95°C por 5 minutos para desnaturação do DNA, 61°C por 1 minuto, para pareamento dos primers e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão do primer pela Taq DNA Polimerase por 35 ciclos.

Quadro 1. Oligonucleotídeos sintéticos (primers) utilizados nas reações de nested PCR para identificação do Plasmodium.

Espécies	Primer	Seqüência (5'-3')	Tamanho dos fragmentos gerados (pb)
<i>Plasmodium sp.</i>	rPLU6: rPLU5:	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1200
<i>P. falciparum</i>	rFAL1: rFAL2:	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	205
<i>P. vivax</i>	rVIV1: rVIV2:	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	120

5.5 GEL DE AGAROSE

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Para análise direta dos fragmentos, 10 μ L de produto amplificado foram misturados com 2 μ L de tampão de corrida TBE e aplicados ao gel de agarose a 2%. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1x, e o DNA corado com brometo de etídio foi visualizado em transiluminador. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado em comparação a um marcador de 100 pb.

5.6 EXTRAÇÃO DA LIPOXINA A4 (LXA4)

Inicialmente, 1 mL do plasma de paciente com malária, indivíduo assintomático e controle da área endêmica foi acidificada a um pH de aproximadamente 3,5 com HCl 1N e aplicada lentamente na coluna de extração (C18 Sep-Pak extraction columns, Alltech Associates Inc.) previamente lavada com 10 mL de metanol seguida de 10 mL de água. Após isso, novamente a coluna foi lavada com 10 mL de água, seguida de 10 mL de éter de petróleo. As amostras foram eluídas com 8mL de formiato de metila que foi evaporado suavemente com gás nitrogênio a 37°C. A LXA4 foi ressuspensa em 400 μ L de tampão de extração para o ELISA (Neogen), descrito no item 5.7.

5.7 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOXINA A4

Para a dosagem de Lipoxina A4 utilizamos Kit comercial da Neogen (Neogen Corporation) seguindo procedimento recomendado pelo fabricante. As amostras ou solução padrão foram primeiro adicionados à placa contendo anticorpo anti-IGg de coelho. O padrão foi diluído a partir de uma solução estoque de 1 $\mu\text{g/mL}$ para as concentrações de 0, 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 2 ng/mL e adicionados aos poços em um volume de 50 μL , em duplicata. As amostras previamente diluídas em 400 μL de tampão de extração, foram adicionadas à placa de ELISA em um volume de 50 μL . Após isso, 50 μL de enzima conjugada (LXA4-HRP) diluída foi adicionado aos poços e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Durante a incubação, ocorreu a competição pelos sítios de ligação. A placa foi então lavada 3 vezes a fim de remover todo o material não ligado. A enzima conjugada ligada foi detectada pela adição de 150 μL de substrato por poço que gerou cor após 30 min de incubação a temperatura ambiente. A extensão de cor foi inversamente proporcional à quantidade de LXA4 na amostra resultando em uma cor azul intensa, considerando que a presença de lipoxina A4 resultará em uma diminuição ou não do desenvolvimento de cor. Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão.

5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas foram mensuradas através do método do ELISA. O plasma foi utilizado para detecção de TNF- α , IL-10, IL-12 e IFN- γ (Pharmingen, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão. Para o ELISA, placas Nunc Maxisorp (Nalgene Nunc International, Denmark) foram

sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocina diluído para 4 μ g/mL na solução 0.1M Na₂HPO₄. Após isso, adicionou-se 75 μ l do anticorpo diluído por poço. A placa foi vedada e incubada 1, “overnight” a 4°C. Com a placa à temperatura ambiente, a solução de anticorpo de captura foi removida e foram adicionados 200 μ l/poço de Tampão de Bloqueio (PBS/BSA 1% ou PBS/SBF 10%). A placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas e após isso lavada 3 vezes com PBS/Tween 0,05%. Adicionaram-se padrões e amostras (100 μ l/poço). O padrão foi diluído seriadamente (1:2) com o ponto inicial para a curva de 2000 pg/ml. A placa foi vedada e incubada “overnight” a 4°C. Após lavagem com PBS/Tween 0,05% por 4 vezes, um segundo anticorpo anti-citocina marcado com biotina foi adicionado, seguido de conjugado Streptavidina- Peroxidase. A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) e interrompida com uma solução de Acido sulfúrico 8N até 30 min para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

5.9 ANÁLISES DOS DADOS

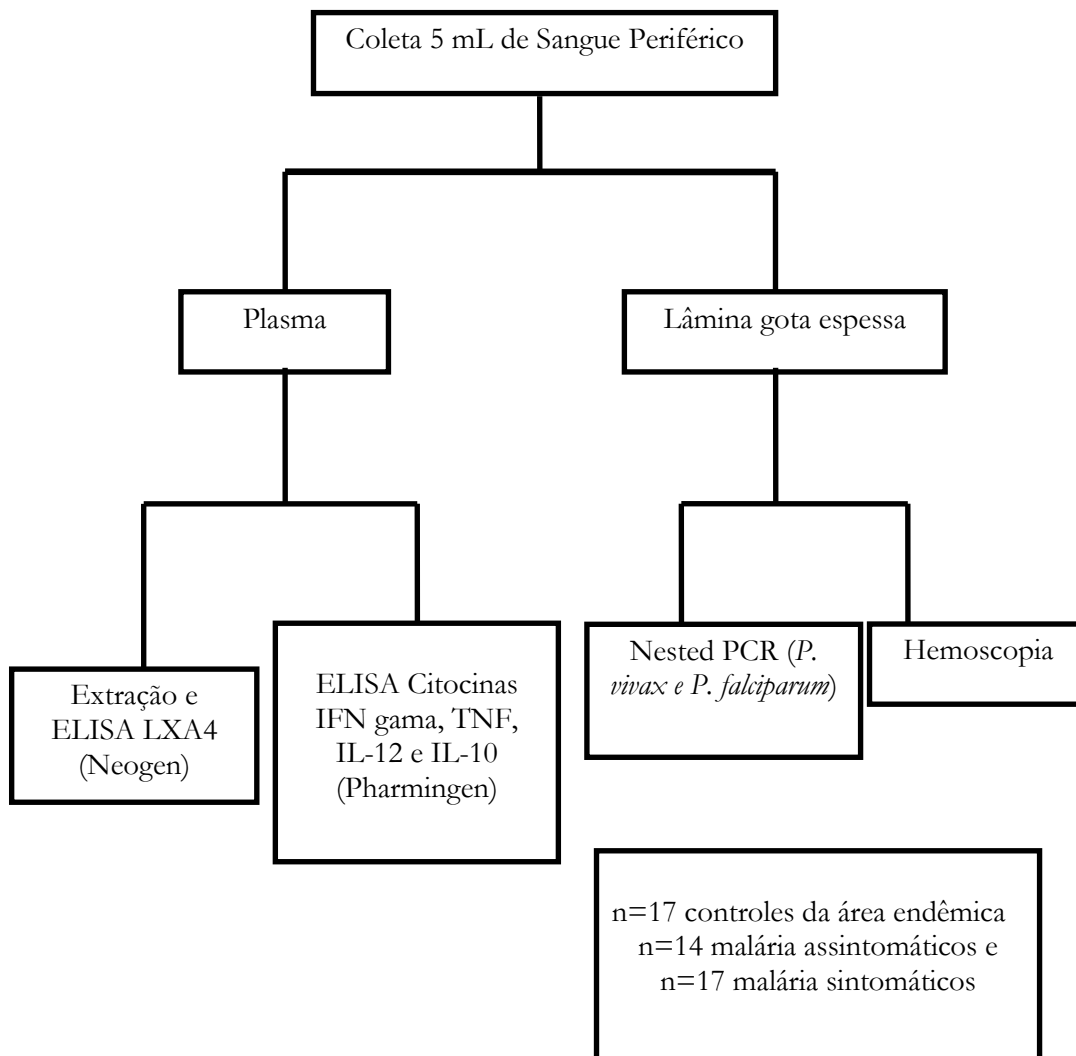
Para as análises estatísticas dos resultados obtidos nos experimentos de quantificação de LXA4 e dosagem de citocinas utilizamos o teste t não paramétrico, Mann Whitney comparando os dados provenientes dos pacientes com malária e controles da área endêmica tendo como valor estatisticamente significativo $p < 0,05$. Utilizamos o teste ANOVA, análise não pareada, comparando os dados provenientes dos indivíduos com malária assintomática, pacientes e controles da área endêmica tendo como valor estatisticamente

significante $p < 0,05$. As análises de correlação foram feitas usando o teste de correlação de Spearman.

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos deste estudo foram realizados utilizando-se o programa *GraphPad - Prism 5.0* (*GraphPad software*, San Diego, CA).

Os resultados do PCR primer específico foram visualizados através de foto do gel de agarose a 2% após corar com brometo de etídio e fotografar.

Fluxograma



6.RESULTADOS

6.1 Características dos indivíduos oriundos das comunidades ribeirinhas de Rondônia.

Esse estudo contou com a participação de 48 indivíduos cuja distribuição etária está mostrada na Tabela 1. Foram incluídos 17 pacientes com malária sintomática (média de idade de 18,6 anos, mínima de dois anos e máxima de 49 anos), dos quais nove foram do gênero masculino e oito do gênero feminino. Os indivíduos assintomáticos (n=14) apresentaram média de idade de 21, 5 anos (idade mínima de quatro e máxima de 52 anos), sendo oito do gênero masculino e seis do gênero feminino. O grupo controle apresentou média de 34,4 anos, variando de três a 92 anos, dos quais 11 foram do gênero masculino e seis do gênero feminino.

Dentre todos os indivíduos selecionados para o estudo, 18 (37,5%) tiveram uma frequência de uma a cinco malárias até julho de 2005, sete (14,6%) tiveram de seis a 10 vezes, 18 (37,5%) mais de 10 vezes e cinco (10,4%) pela primeira vez apresentavam malária (Tabela 2).

Do grupo dos assintomáticos, oito indivíduos (57,2%) foram infectados pelo *P. vivax* e seis (42,8%) pelo *P. falciparum*. Do grupo dos pacientes com malária sintomática, quatro (23,5%) foram infectados pelo *P. vivax* e 13 (76,5%) pelo *P. falciparum* (Tabela 3). Os pacientes com malária sintomática apresentaram maior taxa de infecção por *P. falciparum* e indivíduos assintomáticos, mais infecção por *P. vivax*.

TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DE HABITANTES POR GÊNERO E IDADE

IDADE (ANOS)	GÊNERO				TOTAL
	MASCULINO		FEMININO		
	N	%	N	%	
0-5	2	40	3	60	5
6-10	3	75	1	25	4
11-15	5	50	5	50	10
16-40	10	55	8	45	18
> 40	8	72,7	3	27,3	11
TOTAL	28		20		48

Dados coletados em julho de 2005 em comunidades ribeirinhas de Rondônia

TABELA 2: DISTRIBUIÇÃO DOS HABITANTES POR IDADE E NÚMERO DE INFEÇÕES POR *PLASMODIUM*

IDADE(ANOS)	NÚMERO DE MALÁRIA				TOTAL (%)
	PI	1-5	6-10	>10	
0-5	01	04	00	00	05 (10,4%)
6-10	00	03	01	00	04 (8,3%)
11-15	01	04	04	01	10 (20,8%)
16-40	01	03	02	12	18 (37,5%)
>40	02	04	00	05	11 (22,9%)
TOTAL(%):	05	18	07	18	48
	10,4%	37,5%	14,6%	37,5%	

Dados coletados em julho de 2005 em comunidades ribeirinhas de Rondônia
 PI: primo infecção

TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS HABITANTES POR GÊNERO E NÚMERO DE INFECÇÕES POR *P.VIVAX* E *P.FALCIPARUM* EM INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES SINTOMÁTICOS

GÊNERO	ASSINTOMÁTICO		SINTOMÁTICO	
	<i>P. VIVAX</i>	<i>P.FALCIPARUM</i>	<i>P. VIVAX</i>	<i>P.FALCIPARUM</i>
M	6	2	2	7
F	2	4	2	6
TOTAL (%)	8 57,2%	6 42,8%	4 23,5%	13 76,5%

Dados coletados em julho de 2005 em comunidades ribeirinhas de Rondônia

6.2 Foto de eletroforese em gel de agarose para pesquisa de *P.vivax* e *P.falciparum* em indivíduos de comunidades ribeirinhas de Rondônia.

Para a pesquisa de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* foi feito nested PCR do DNA extraído do sangue das lâminas de gota espessa dos indivíduos das comunidades ribeirinhas de Rondônia. Os indivíduos assintomáticos incluídos nesse estudo foram PCR positivo e os controles endêmicos foram PCR negativo. Abaixo (Figura 7), foto ilustrativa das bandas específicas para *P. vivax* e *P. falciparum*, no gel de agarose, de alguns entre os indivíduos estudados.

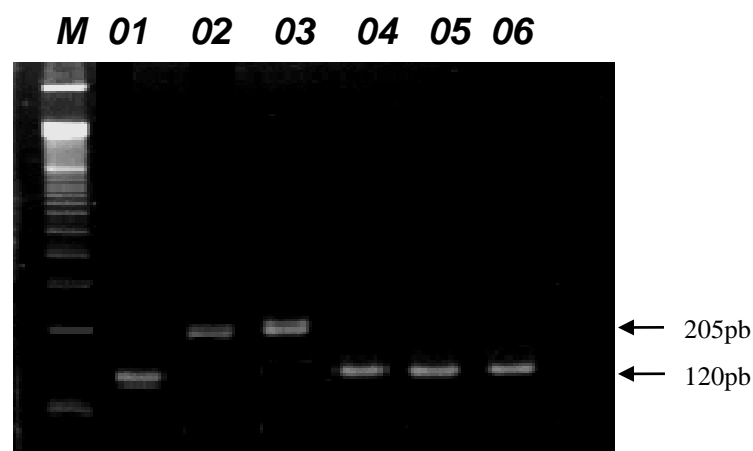


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os fragmentos obtidos no PCR para *P. vivax* e *P. falciparum*. Posições 01, 04, 05, 06 indivíduos com infecção por *P. vivax*; posição 02 - indivíduo com infecção por *P. falciparum*, posição 03 – controle para *P. falciparum* M= marcador de 100pb.

Figura 9. Níveis de IFN- γ no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

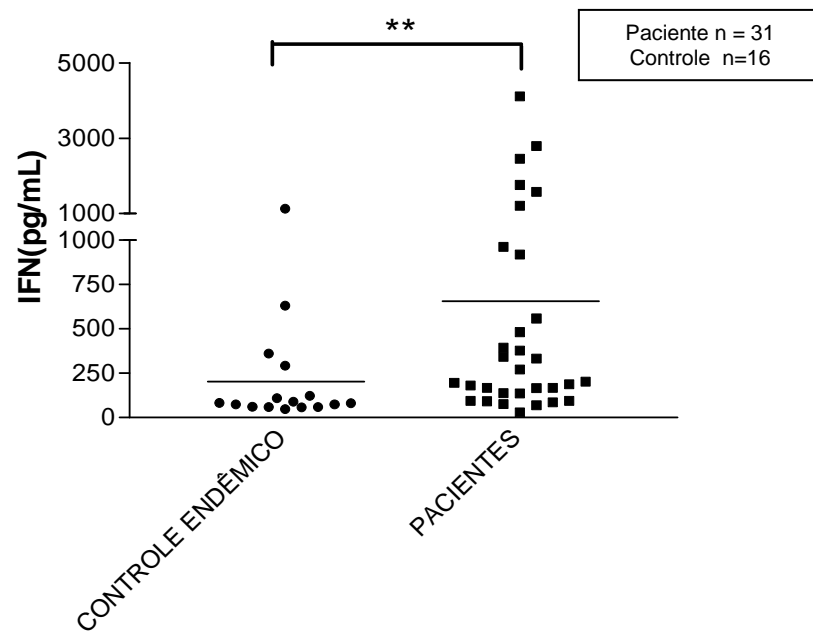


Figura 10. Níveis de IL-12/IL-23 p 40 no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

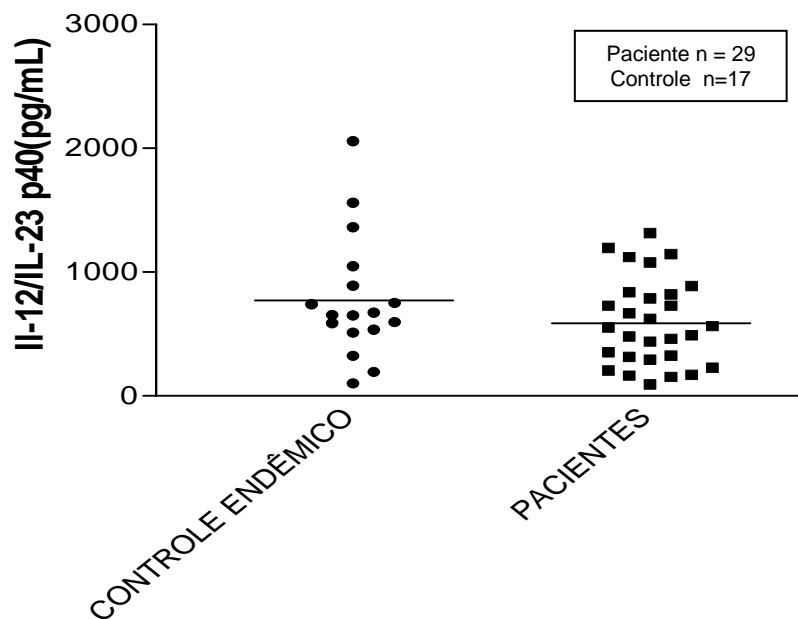


Figura 11. Níveis de TNF- α no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.

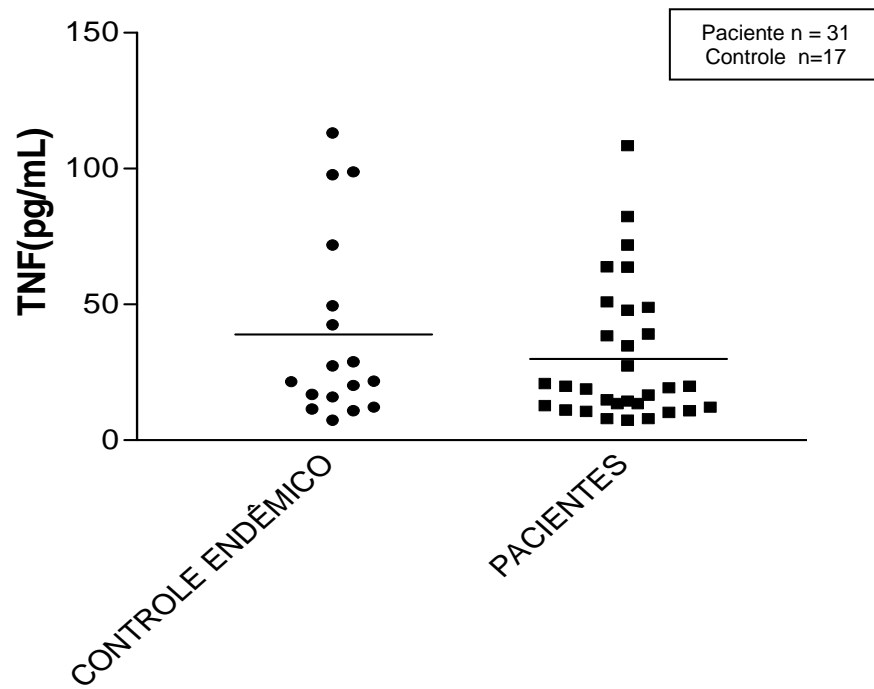
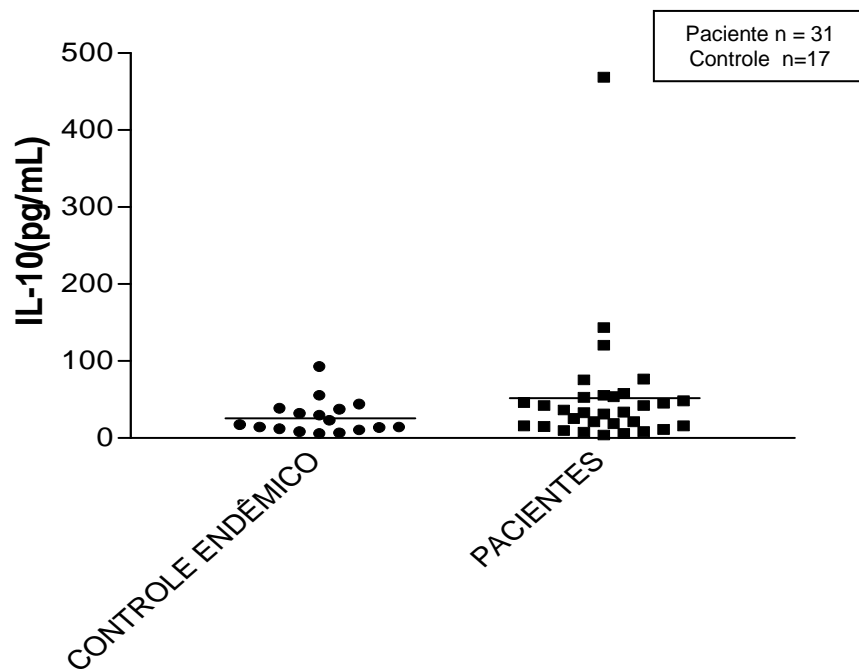


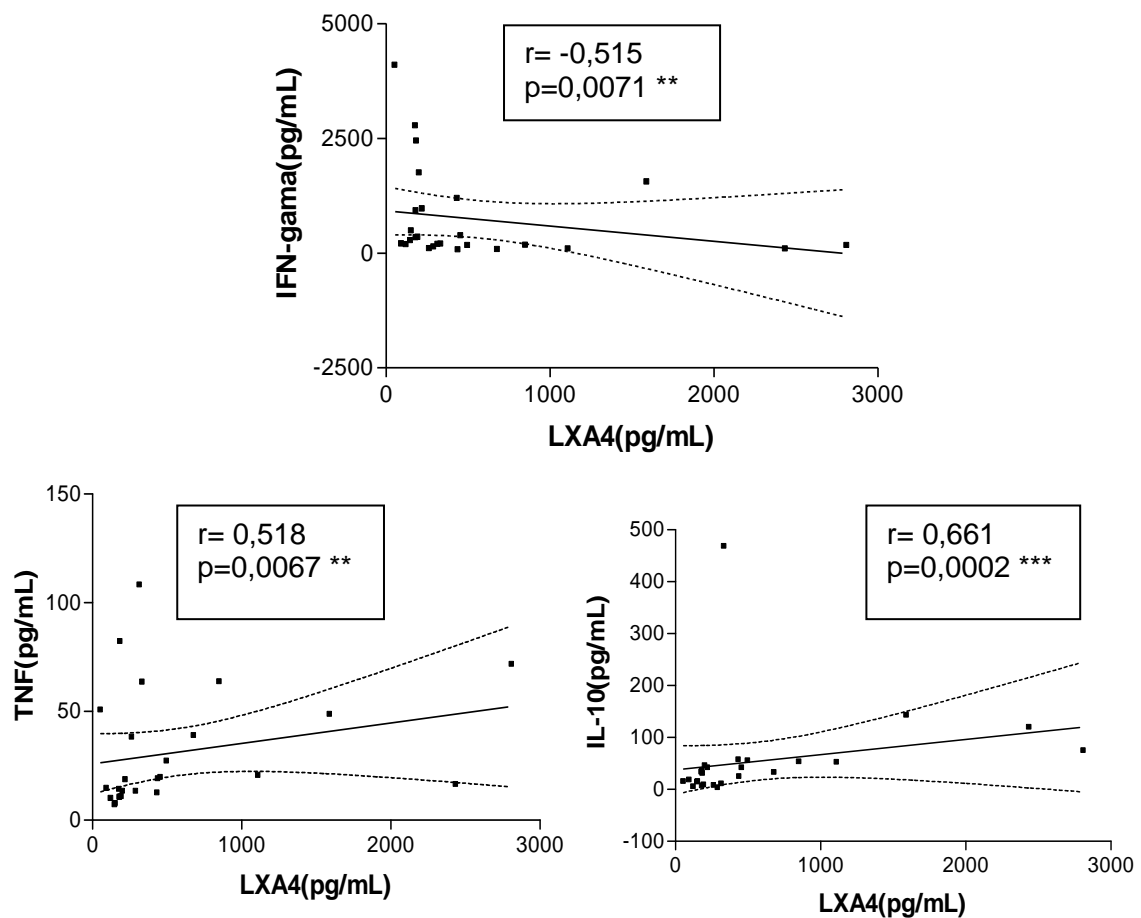
Figura 12. Níveis de IL-10 no plasma de pacientes com malária e controles da área endêmica.



6.4 Associação entre os níveis de Lipoxina A4 e citocinas no plasma de pacientes com malária.

Foram realizadas análises da regressão linear dos níveis de Lipoxina A4 e das citocinas dosadas no presente estudo no plasma de pacientes com malária. Comparando os níveis de citocinas e LXA4, em pacientes com malária, foi observada associação negativa entre IFN- γ e LXA4 e associação positiva entre TNF- α e LXA4, IL-10 e LXA4 (figura 13). Coeficiente de correlação de Spearman (r) foi usado para a análise.

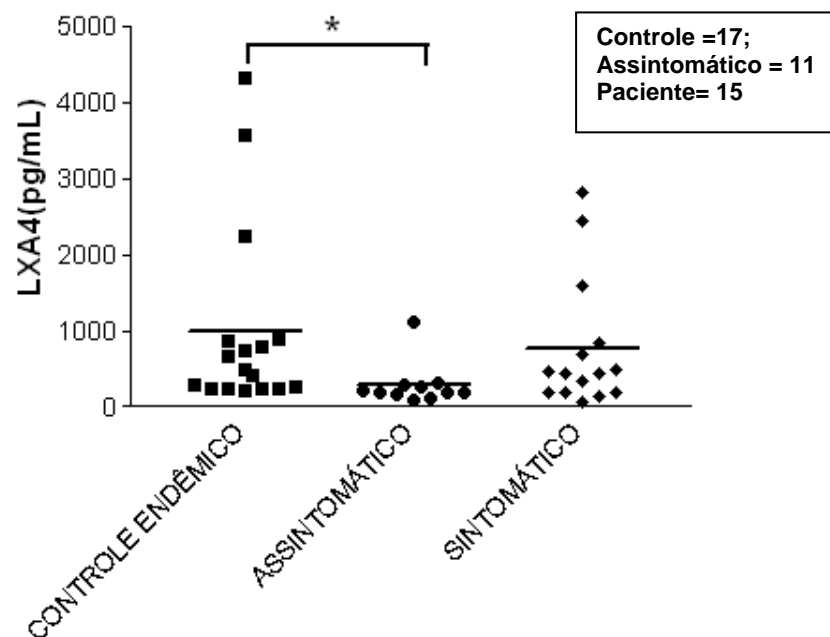
Figura 13. Correlação entre os níveis de Lipoxina A4 e IFN- γ , LXA4 e TNF- α e LXA4 e IL-10 no plasma de pacientes com malária.



6.5 Indivíduos com malária assintomática exibiram níveis plasmáticos reduzidos de LXA4 comparados aos controles endêmicos.

Para determinar se os níveis circulantes de LXA4 são diferentes durante a infecção por malária, esse composto foi dosado no plasma de indivíduos assintomáticos, pacientes com malária e controles endêmicos. O grupo de indivíduos com malária assintomática exibiu níveis mais baixos de LXA4 no plasma quando comparado aos controles endêmicos ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças nos níveis de LXA4 plasmáticos de pacientes com malária sintomática, quando comparados com controles endêmicos ou indivíduos assintomáticos (Figura 14).

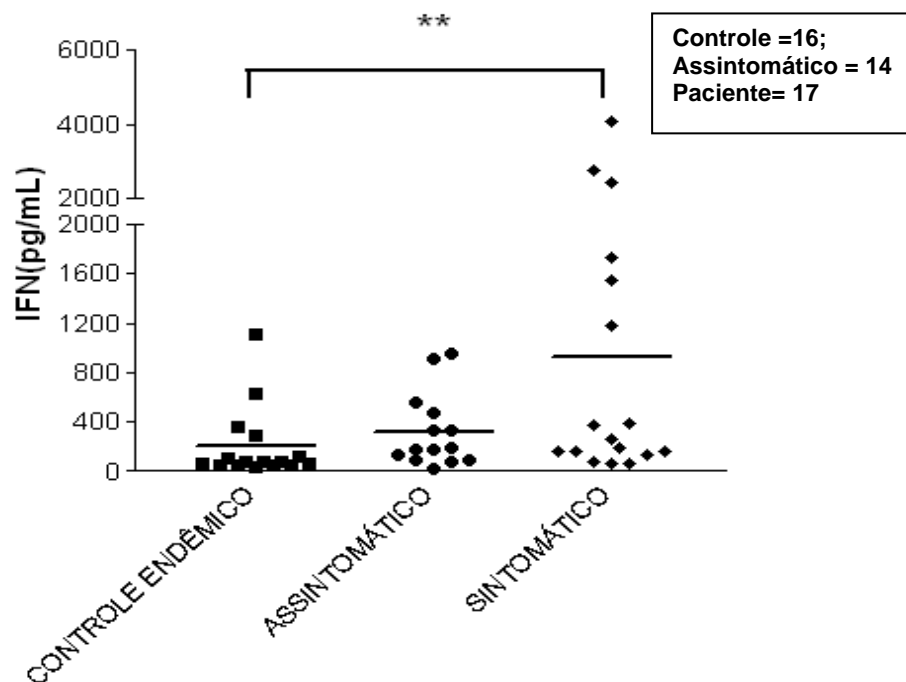
Figura 14. Níveis de LXA4 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.



6.6 Pacientes com malária sintomática exibiram níveis plasmáticos aumentados de IFN gama comparados aos controles endêmicos.

O próximo passo foi dosar IFN gama, para determinar se há diferença nos níveis circulantes durante a infecção malárica, no plasma de indivíduos assintomáticos, pacientes com malária e controles endêmicos. Comparados aos controles endêmicos, indivíduos com malária sintomática exibiram aumento significativo nos níveis de IFN- γ ($p < 0,05$) (figura 15). Entre os pacientes com malária sintomática há duas subpopulações de indivíduos, uma com produção elevada de IFN- γ ($n = 6$, média= 2293,1) e outra com produção diminuída ($n = 11$, média= 187,2).

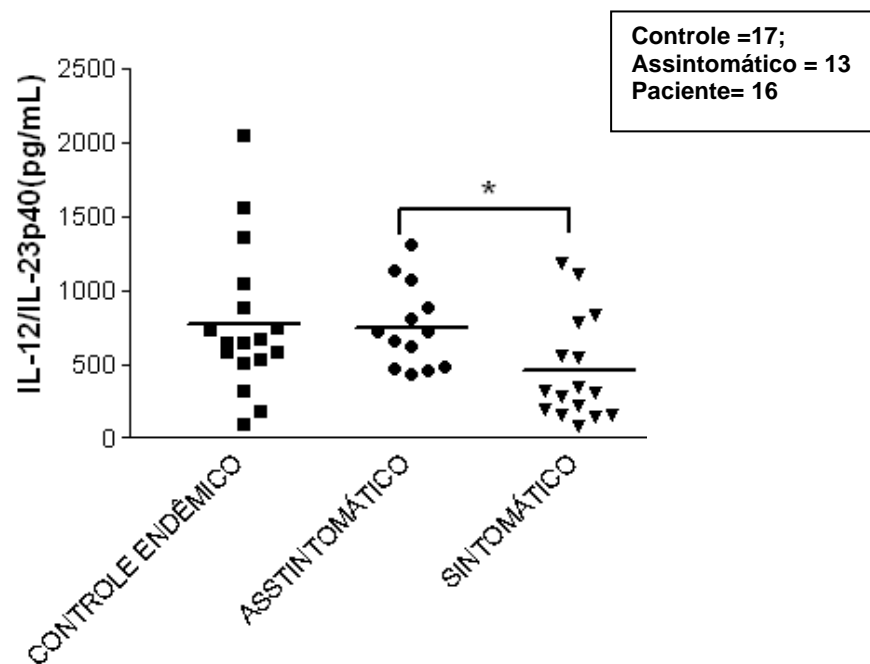
Figura 15. Níveis de IFN- γ no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.



6.7 Pacientes com malária sintomática exibiram níveis diminuídos de IL-12 comparados aos indivíduos assintomáticos.

Para determinar se os níveis circulantes de IL-12 são diferentes durante a infecção por malária, esta citocina foi dosada no plasma de indivíduos assintomáticos, pacientes com malária e controles endêmicos. O grupo de indivíduos com malária sintomática, comparados aos indivíduos assintomáticos, exibiu diminuição significativa nos níveis de IL-12/IL-23 p40 ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi achada nos níveis de IL-12/IL-23 p40 no plasma de pacientes com malária quando comparada aos controles endêmicos (figura 16).

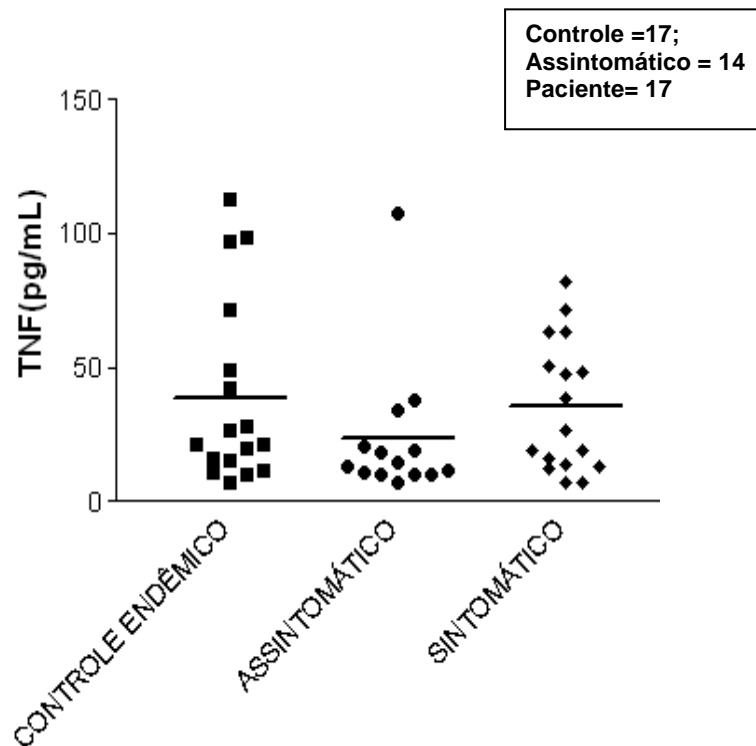
Figura 16. Níveis de IL-12/IL-23p40 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.



6.8 Pacientes com malária sintomática e indivíduos assintomáticos não apresentaram diferença nos níveis de TNF.

Próxima etapa foi determinar se há diferença nos níveis circulantes de TNF- α durante a infecção por malária, sendo dosada no plasma de indivíduos assintomáticos, pacientes com malária e controles endêmicos. Comparados aos controles endêmicos, não houve diferença estatística nos níveis de TNF no plasma de pacientes com malária sintomática e assintomática (Figura 17).

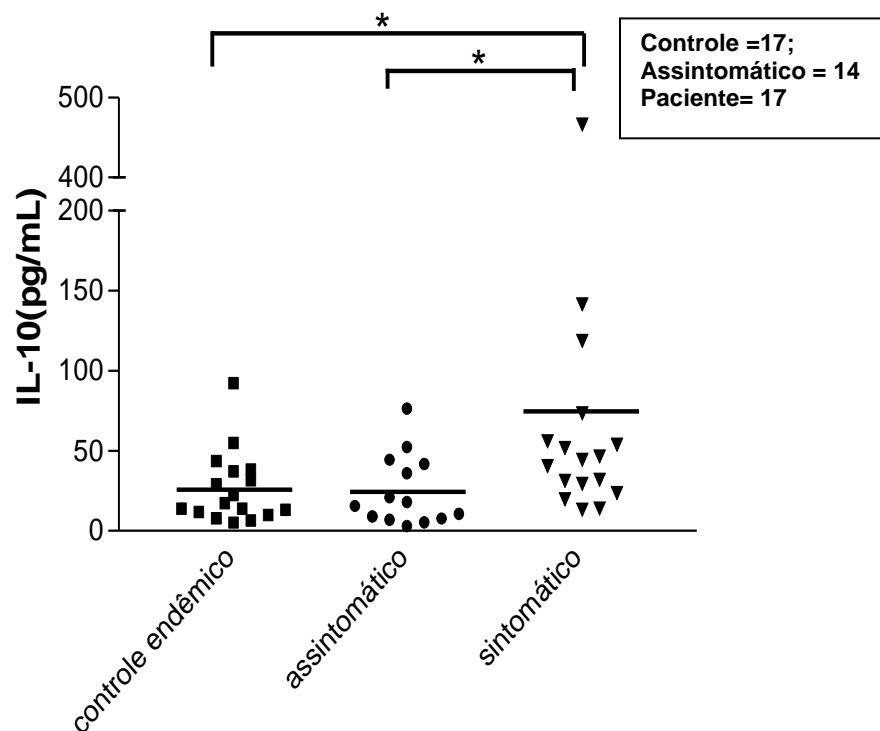
Figura 17. Níveis de TNF no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.



6.9 Pacientes com malária sintomática apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-10 comparados aos controles endêmicos e indivíduos assintomáticos.

Por fim, afim de determinar se há também diferença nos níveis circulantes de IL-10 durante a infecção por malária, esta citocina foi dosada no plasma de indivíduos assintomáticos, pacientes com malária e controles endêmicos. Comparados aos controles endêmicos e indivíduos assintomáticos, pacientes com malária sintomática exibiram aumento significativo nos níveis de IL-10 ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 18. Níveis de IL-10 no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos) e controles da área endêmica.



6.10 Associação entre os níveis de Lipoxina A4 e citocinas no plasma de pacientes com malária (sintomáticos e assintomáticos).

Foram realizadas análises da regressão linear dos níveis de Lipoxina A4 e das citocinas dosadas no presente estudo no plasma de pacientes com malária assintomática e sintomática. Não houve associação nos níveis de citocina e LXA4 em pacientes com malária assintomática.

Comparando os níveis de citocinas e LXA4, no plasma de pacientes com malária sintomática, observou-se associação negativa entre IFN- γ e LXA4 (figura 19) e associação positiva entre IL-10 e LXA4 (figura 21). O coeficiente de correlação de Spearman (r) para IFN- γ ($r = -0,66$, $p < 0,01$ **) e para IL-10 ($r = 0,64$, $p < 0,01$ **).

Figura 19. Correlação entre os níveis de Lipoxina A4 e IFN gama no plasma de pacientes com malária sintomática.

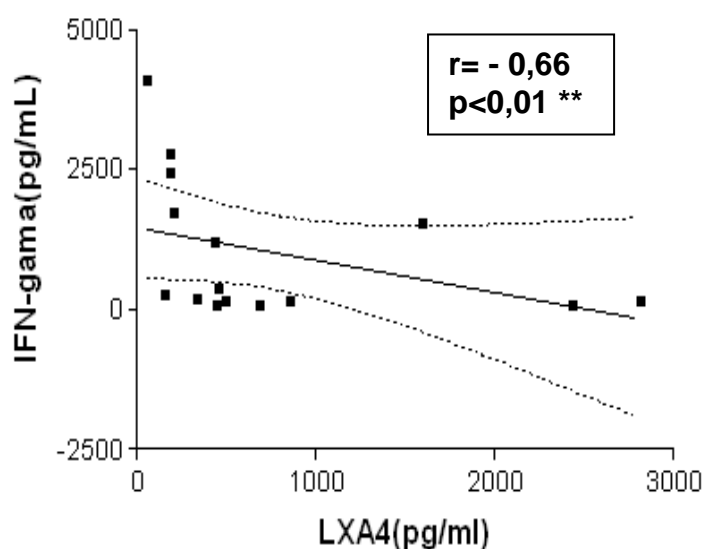
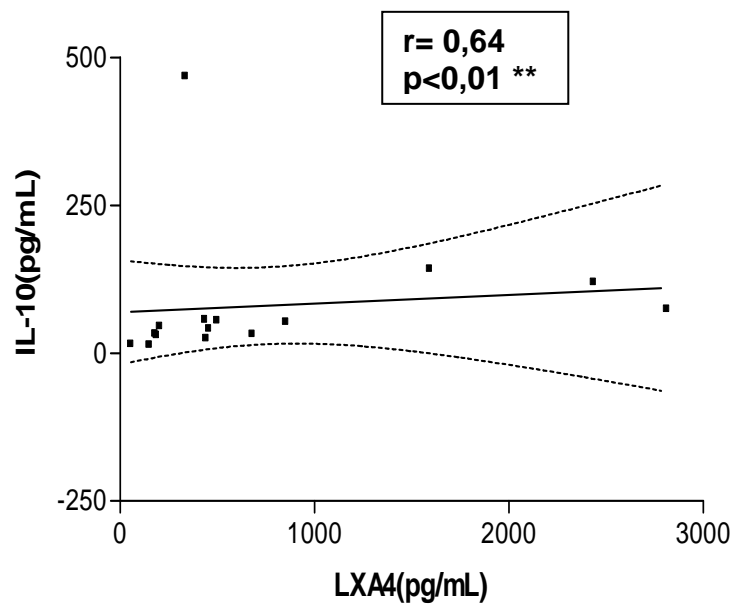


Figura 20. Correlação entre os níveis de Lipoxina A4 e IL-10 no plasma de pacientes com malária sintomática.



7.DISSCUSSÃO

Este trabalho avaliou o papel do mediador lipídico antiinflamatório lipoxina A4 na regulação da resposta inflamatória da malária assintomática e sintomática durante infecção pelo *Plasmodium*. No presente estudo foi avaliado se a lipoxina estaria implicada na imunorregulação da inflamação e na ausência dos sintomas dos indivíduos com malária assintomática, através da análise dos níveis de lipoxina (A4) e citocinas (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias), respectivamente. Foi realizada uma associação entre os níveis no plasma de LXA4 e citocinas, afim de identificar o papel desse mediador na imunopatogênese da malária assintomática. Os indivíduos com malária assintomática exibiram níveis diminuídos de LXA4. Os pacientes com malária sintomática exibiram aumento significativo nos níveis de IFN- γ e de IL-10.

Alguns estudos têm relatado a importância do papel das citocinas no controle da sintomatologia e indução de mecanismos efetores (Omer FM, 2000). Várias citocinas, incluindo o TNF- α e o IFN- γ , têm sido envolvidas na proteção e patologia na infecção por malária. Estudos prévios demonstraram efeitos das citocinas na indução da morte do *Plasmodium*, "in vitro" e "in vivo" (Ferreira et al, 1986; Schofield et al, 1987; Mellouk et al, 1987; Maheshawari K et al, 1986; Clark et al, 1986). Rockett e cols mostraram que estas citocinas atuam sinergisticamente afim de aumentar a produção de NO, que é um fator implicado na destruição do parasito (Rockett et al, 1991).

Inicialmente, analisou-se o grupo de pacientes com malária e observaram-se níveis circulantes reduzidos de LXA4 e aumentados de IFN- γ . Não foram encontradas diferenças nos níveis de IL-12/IL-23 p40, TNF- α e IL-10 de pacientes com malária quando comparados aos controles endêmicos. Em

pacientes com malária, foi observada associação negativa entre IFN- γ e LXA4, e associação positiva entre TNF- α e LXA4 e também entre IL-10 e LXA4. Esses dados mostram que há diferença nos níveis circulantes de IFN- γ e de LXA4 durante a infecção por malária. Os dados também sugerem que LXA4 aumentada atuaria juntamente com IL-10 no controle da resposta pró-inflamatória.

Após avaliar separadamente pacientes com malária sintomática, indivíduos sem sintomatologia e controles endêmicos, pôde-se observar que houve diferença nos níveis de LXA4 e citocinas nestes três grupos. Comparados aos controles endêmicos, não houve diferença estatística nos níveis plasmáticos de TNF- α em pacientes com malária sintomática ou assintomática. Foi mostrado ainda que, indivíduos assintomáticos, apresentam níveis diminuídos de LXA4 em comparação aos controles. Possivelmente, baixa parasitemia nos indivíduos assintomáticos não causaria danos inflamatórios gerados pelo parasito com produção de TNF- α .

Nossos dados mostram que indivíduos assintomáticos apresentam baixos níveis de LXA4, talvez devido aos baixos níveis de parasitemia. Possivelmente, nem Lipoxina A4 e nem as citocinas estudadas aqui sejam secretadas na circulação em indivíduos assintomáticos, corroborando com os dados de Jackobsen e cols, que não observaram resposta pró-inflamatória e antiinflamatória em crianças de área endêmica sem sintomatologia (Jackobsen et al, 1996). Não foram encontradas diferenças nos níveis de IFN- γ e IL-10 em nosso estudo, em indivíduos assintomáticos quando comparados aos controles endêmicos. Esses dados sugerem uma complexa rede de indução de citocinas

e lipoxina durante o curso da malária humana. Nós especulamos que a carga parasitária regula produção de lipoxina A4.

Em malária murina, estudos sugerem que os mecanismos imunes inatos, mediados por IFN- γ derivados de células NK e/ou células T γ δ delta, limitam a fase inicial da replicação (Fell et al, 1998) e a resposta adaptativa (mediada por células T α β e células B) são requisitadas para eliminação do parasita (Langhorne et al, 1998). IFN- γ é essencial para resolução da infecção primária. A produção inicial de IFN- γ que pode depender de uma adequada indução de IL-12 ou IL-18 produzidas por células dendríticas e/ou macrófagos (Stevenson et al, 1995; Doolan et al, 1999; Torre et al, 2001) aparece por ser um elemento fundamental da resposta pró-inflamatória, mas leva à modulação positiva do TNF, um dos principais mediadores da patologia da malária (Kwiatkowski et al, 1990). Nossos dados demonstraram que pacientes com malária sintomática comparados aos controles endêmicos exibiram aumento significativo nos níveis de IFN- γ . Entre os pacientes com malária, demonstraram-se duas subpopulações de indivíduos, uma com produção elevada (n= 6, média=2293,1) e outra com produção diminuída (n= 11, média= 187,2) de IFN- γ . Possivelmente, esta população apresenta diferenças genéticas para a produção de FN- γ . Esses dados também estão consistentes com os achados de Mshana e cols, onde concentrações de IFN- γ no plasma são mais altas em indivíduos com infecção sintomática que em infecções assintomáticas (Mshana et al, 1991).

A citocina IL-12 tem sido descrita por seu importante papel na imunidade protetora à etapa eritrocítica da malária (Su e Stevenson, 2002) e por sua capacidade de induzir produção de IFN- γ por células NK e células T (Trinchieri,

1998). Luty e cols recentemente mostraram um estudo dos níveis de IL-12 e outras citocinas em crianças africanas residindo em Gabon, que apresentaram malária não complicada e grave por *P. falciparum*. Pacientes com malária grave apresentam baixos níveis de IL-12 e altos níveis de TNF- α e IL-10 (Luty, 2000). Em nosso trabalho, o grupo de pacientes com malária sintomática, comparados aos indivíduos assintomáticos, exibiu diminuição significativa nos níveis de IL-12/IL-23 p40 e nenhuma diferença foi achada quando comparada aos controles endêmicos. Urban e cols demonstraram, *in vitro*, que eritrócitos infectados por *P. falciparum* aumentam a secreção de IL-10 e reduzem a secreção de IL-12 durante maturação de células dendríticas (Urban et al, 1999; Urban et al, 2001).

Paralelamente à produção de citocinas pró-inflamatórias, acredita-se que produção de IL-10 em pacientes com malária controla os danos inflamatórios gerados pelo parasito (Ho et al, 1995). Estudos anteriores mostraram que a produção de IL-10 foi associada à suscetibilidade à infecção (Kobayashi et al, 1992), através de efeito antiinflamatório, limitando de alguma maneira o dano tecidual causado por uma excessiva resposta Th1. Outros estudos mostraram que neutralização, *in vivo*, de IL-10 em camundongos resistentes, promoveu patogênese e doença fatal e a administração de IL-10 recombinante preveniu a morte em animais suscetíveis (Kossodo et al, 1997). Camundongos IL-10^{-/-} mostraram patologia aumentada em consequência de infecção por *P. chabaudi* (Li et al, 1999), e isto foi mostrado por ser mediado por excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α (Li et al, 2003).

No presente estudo, pacientes com malária sintomática exibiram aumento significativo nos níveis circulantes de IL-10, como observado no

plasma de crianças da Tanzânia com malária por *P. falciparum*, não complicada (Hugosson et al, 2004). Em um modelo para malária “in vitro”, IL-10 foi mostrado por diminuir a produção de TNF- α (Ho et al, 1998). Anti-IL-10, produziu efeito oposto. Esses dados mostram que a produção de IL-10 é importante para o controle de uma resposta imune exacerbada. Qual a fonte celular de IL-10 durante a malária humana? Talvez células T regulatórias duplo-positivas para IFN- γ /IL-10, como demonstrado em modelos experimentais com outros parasitos, estejam envolvidas na produção dessas citocinas (Jankovic e Trinchieri, 2007).

Em nosso estudo, observou-se, em pacientes sintomáticos, uma associação negativa entre IFN- γ e LXA4 e associação positiva entre IL-10 e LXA4. Nossos dados sugerem que, em pacientes com malária sintomática, lipoxina A4 atua inicialmente na regulação de IFN- γ , juntamente com a citocina IL-10. No decorrer da infecção, com aumento da parasitemia, os níveis de IFN- γ aumentariam afim de eliminar o parasito, IL-10 seria induzido para o controle da patologia. Em modelo murino de infecção com *T. gondii*, tem sido mostrado uma ação mais inicial para IL-10, sendo que Lipoxina A4 atuaria mais tardiamente no controle da infecção (Aliberti et al, 2002). Estes mediadores antiinflamatórios podem envolver distintos mecanismos, regulando citocinas e mortalidade do hospedeiro.

Neste estudo, não foi encontrada uma correlação entre IL-12p40 e lipoxina A4, em contraste com o que foi observado em modelos experimentais com *T. gondii* (Aliberti et al, 2002). Entretanto, foi demonstrado que lipoxina A4 regula a produção de IL-12 através de um mecanismo dependente de SOCS-2, uma molécula de sinalização intracelular. Como o *Plasmodium* induz a

produção de lipoxina em células humanas, ainda não foi determinado. As vias de indução de lipoxina A4 e as interações com IL-10 e outras citocinas durante o curso da infecção por *Plasmodium* será importante no sentido de obtenção de novos agentes terapêuticos e alvos imunomoduladores contra malária.

8.CONCLUSÃO

- Indivíduos assintomáticos apresentaram baixos níveis de LXA4 quando comparados aos controles endêmicos.
- Não foram encontradas diferenças nos níveis das citocinas em nosso estudo, quando comparadas aos controles endêmicos.
- Comparados aos controles endêmicos, indivíduos com malária sintomática exibiram aumento significativo nos níveis de IFN- γ e de IL-10, associação negativa entre IFN- γ e LXA4 e associação positiva entre IL-10 e LXA4.

9. BIBLIOGRAFIA

1. ALIBERTI, J.; BAFICA, A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 73(3-4):283-8. 2005 .Review.
2. ALIBERTI, J.; HIENY, S.; REIS E SOUSA, C.; SERHAN, C.N.; SHER, A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. **Nat. Immunol.** 3:76–82. 2002.
3. ALVES, F.P.; DURLACHER, R.R.; MENEZES, M.J.; KRIEGER, H.; SILVA, L.H.; CAMARGO, E.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **Am J Trop Med Hyg.** 66(6):641-8. 2002.
4. ALVES, F.P.; GIL, L.H.; MARRELLI, M.T.; RIBOLLA, P.E.; CAMARGO, E.P.; DA SILVA, L.H. Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. **J Med Entomol.** 42(5):777-9. 2005.
5. ARIEL, A.; CHIANG, N.; ARITA, M.; PETASIS, N.A.; SERHAN C.N. Aspirin-triggered lipoxin A4 and B4 analogs block extracellular signal-related kinase-dependent TNF-secretion from human T-cells. **J. Immunol.** 170:6266–6272.2003.
6. ARTAVANIS-TSAKONAS K, ELEME, K., MCQUEEN, K.L., CHENG, N.W, PARHAM, P., DAVIS, D.M., RILEY, E.M. Activation of a subset of human natural killer cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J. Immunol.** 171, 5396–5405. 2003.
7. AUBOUY, A.; DELORON, P.; MIGOT-NABIAS, F. Plasma and in vitro levels of cytokines during and after a *Plasmodium falciparum* malaria attack in Gabon. CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHES MEDICALES DE FRANCEVILLE, Unite de Parasitologie Medicale, Gabon.2002.
8. BAFICA, A., SCANGA, C.A., SERHAN, C., MACHADO, F., WHITE, S., SHER, A., ALIBERTI, J. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase–dependent lipoxin production. **J. Clin. Invest.** 115:1601–1606.2005.
9. BAIRD, J. K. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to Plasmodium falciparum. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 92, 367–390. 1998.

10. BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P.T.; DIAZ, B.L.; CORDEIRO, R.S.; JOSE, P.J.; MARTINS, M.A.; SERHAN C.N. Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. **J. Immunol.**164:2267–2271. 2000.
11. BIRON CA. Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease.**Curr Opin Microbiol.** 2(4):374-81. 1999. Review.
12. BONNANS, C.; VACHIER, I.; CHAVIS,C.; GODARD, P.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P. Lipoxins are potential endogenous antiinflammatory mediators in asthma. **Am J Respir Crit Care Med** 165(11):1531-5. 2002.
13. BRASH, AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **J Biol Chem.** 274(34):23679-82.1999. Review.
14. BRUCE-CHWATT, L.J. **Essential malariology**, 2 edição, William heiseman medical books, London. 1985.
15. CARTER, R.; CHEN D.H. Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. **Nature.** 1976 Sep 2;263(5572):57-60.
16. CARTER, R.; GRAVES, P.M.; QUAKYI, I.A.; GOOD, M.F. Restricted or absent immune responses in human populations to Plasmodium falciparum gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. **J Exp Med.** 1989 Jan 1;169(1):135-47.
17. CLARK, I.; SCHOFIELD, L. Pathogenesis of malaria. **Parasitol Today** 2000;16: 451–4.
18. CLARK, I.A.; HUNT, N.H.; BUTCHER, G.A.; COWDEN, W.B. Inhibition of murine malaria (*P. Chabaudi*) in vivo by recombinant interferon gamma or tumour necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole. **J. Immunol.** 139:3493. 1987.
19. COGSWELL, F.B.; KROTOSKI, W.A.; HOLLINGDALE, M.R.; GWADZ, R.W. Identification of hypnozoites and tissue schizonts of Plasmodium vivax and P. cynomolgi by the immunoperoxidase method. **Am J Trop Med Hyg.** 1983 Nov;32(6):1454-5.
20. CRUZ-CUBAS, A.B.; BALLEST, J.J.; GENTILINI, M.; MONJOUR, L. Cell-mediated immunity and protection against blood stages of *Plasmodium falciparum*. **Presse Med.**,22(39):1967-73, 1993.

21. DAY, N.P.; HIEN, T.T.; SCHOLLAARDT, T.; LOC, P.P.; CHUONG, L.V.; CHAU, T.T.; MAI, N.T.; PHU, N.H.; SINH, D.X.; WHITE, N.J.; HO, M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. **J Infect Dis.** 1999 Oct;180(4):1288-97.
22. DAY, N.P.; NGUYEN, H.P.; PHAM, P.L. Renal disease. II. Malaria and acute renal failure. **J R Coll Physicians Lond.** 31(2):146-8. 1997 Review.
23. DE ANDRADE, A.L.; MARTELLI, C.M.; OLIVEIRA, R.M.; ARIAS, J.R.; ZICKER, F.; PANG, L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. **Clin Infect Dis.** 1995 Feb;20(2):475.
24. DINARELLO, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. **J Infect Dis.** 1999 Mar;179 Suppl 2:S294-304. Review.
25. DODOO, D.; OMER, F.M.; TODD, J.; AKANMORI, B.D.; KORAM, K.A.; RILEY, E.M. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **J Infect Dis.** 2002 Apr 1;185(7):971-9.
26. DOOLAN, D.L.; HOFFMAN, S.L. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. **J Immunol.** 2000 Aug 1;165(3):1453-62.
27. DRUILHE, P.; PÉRIGNON, J.L. A hypothesis about the chronicity of malaria infection. **Parasitol Today.** 1997 Sep;13(9):353-7.
28. ENGWERDA, C.R.; GOOD, M.F. Interactions between malaria parasites and the host immune system. **Curr Opin Immunol.** 2005 Aug;17(4):381-7. Review.
29. FERREIRA, A.; SCHOFIELD, L.; ENEA, V.; SCHELLEKENS, H.; VAN DER MEIDE, P.; COLLINS, W.E.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by interferon-gamma. **Science** (Wash. DC). 232:881. 1986.
30. FERREIRA, M. S. Malária. **Tratado de Infectologia.** São Paulo: Atheneu, 1996, p. 1260-1281.
31. FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol.** 1991 Dec 1;147(11):3815-22.

32. FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J Immunol.** 1991 May 15;146(10):3444-51.
33. FRANKS, S., KORAM, K.A., WAGNER, G.E., TETTEH, K., MCGUINNESS, D., WHEELER, J.G., NKRUMAH, F., RANFORD-CARTWRIGHT, L., RILEY, E.M. Frequent and persistent asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants characterised by multilocus genotyping. **J. Infect. Dis.** 183,796–804. 2001.
34. GATELY, M.K.; RENZETTI, L.M.; MAGRAM, J.; STERN, A.S.; ADORINI, L.; GUBLER, U.; PRESKY, D.H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol.** 1998;16:495-521.
35. GEWIRTZ, A.T.; COLLIER-HYAMS, L.S.; YOUNG, A.N.; KUCHARZIK, T.; GUILFORD, W.J.; PARKINSON, J.F.; WILLIAMS, I.R.; NEISH, A.S.; MADARA, J.L. Lipoxin A4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. **J Immunol.** 168(10):5260-7. 2002.
36. GIHA, H.A.; STAALSOE, T.; DODOO, D.; ROPER, C.; SATTI, G.M.; ARNOT, D.E.; HVIID, L.; THEANDER, T.G. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. **Immunol Lett.** 2000 Feb 1;71(2):117-26.
37. GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Immune effector mechanisms in malaria. **Curr. Opin. Immunol.** 11, 412–419 . 1999.
38. GOOD, M. F. Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? **Nature Rev. Immunol.** 1, 117–125. 2001.
39. GRAU, G.E.; PIGUET, P.F.; VASSALLI, P.; LAMBERT, P.H. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. **Immunol Rev.** 1989 Dec;112:49-70. Review.
40. GRECHKIN A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. **Prog Lipid Res.**37(5):317-52. 1998.
41. GREENWOOD, B.M.; BOJANG, K.; WHITTY, C.J.; TARGETT, G.A. Malaria. **Lancet.** 2005 Apr 23-29;365(9469):1487-98. Review.

42. GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** 20, 621–667 (2002).
43. GUYATT, H.L.; SNOW, R.W. The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum* related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. **Am J Trop Med Hyg** 2001; 64 (1–2 suppl): 36–44.
44. HARPAZ, R.; EDELMAN, R.; WASSERMAN, S.S.; LEVINE, M.M.; DAVIS, J.R.; SZTEIN, M.B. Serum cytokine profiles in experimental human malaria. Relationship to protection and disease course after challenge. **J Clin Invest.** 1992 Aug;90(2):515-23.
45. HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **Int J Biochem Cell Biol.** 2005 Apr;37(4):700-6. Review.
46. HO, M.; SEXTON, M.M.; TONGTAWE, P.; LOOAREESUWAN, S.; SUNTHARASAMAI, P.; WEBSTER, K. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific proliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. **J Infect Dis** 1995;172:838–44.
47. HOFFMAN, S.L.; FRANKE, E.D. Inducing protective immune responses against the sporozoite and liver stages of *Plasmodium*. **Immunol Lett.** 1994 Jul;41(2-3):89-94. Review.
48. HOMMEL, M. Amplification of cytoadherence in cerebral malaria: towards a more rational explanation of disease pathophysiology. **Ann Trop Med Parasitol.** 1993 Dec;87(6):627-35. Review.
49. HUGOSSON, E.; MONTGOMERY, S.M.; PREMJI, Z.; TROYE-BLOMBERG, M.; BJORKMAN, A. 2004. Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. **Parasite Immunology**, 26, 111–117.
50. MCGILVRAY, I.D.; SERGHIDES, L.; KAPUS, A.; ROTSTEIN, O. D.; KAIN, K.C. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*–parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. **Blood**, 2000 volume 96, number 9.
51. JACOBS, P.; RADZIOCH, D.; STEVENSON, M.M. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. **Infect Immun.** 1996 Jan;64(1):44-9.

52. JAKOBSEN, P.H.; MCKAY, V.; N'JIE, R.; OLALEYE, B.O.; D'ALESSANDRO, U.; BENDTZEN, K.; SCHOUSBOE, I.; GREENWOOD, B.M. Soluble products of inflammatory reactions are not induced in children with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections. **Clin Exp Immunol** 105: 69–73. 1996.
53. JANKOVIC, D.; TRINCHIERI, G. IL-10 or not IL-10: that is the question. **Nat Immunol**. 2007 Dec;8(12):1281-3.
54. KARP, C. L.; FLICK, L. M.; PARK, K. W. ; SOFTIC, S.; GREER, T. M.; KELEDJIAN, R.; YANG, R.; UDDIN, J.; GUGGINO, W. B.; ATABANI, S. F.; BELKAID, Y.; XU,Y.; WHITSETT, J. A.; ACCURSO, F. J.; WILLS-KARP, M.; PETASIS, N. A. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. **Nat Immunol** 5(4):388-92. 2004.
55. KOBAYASHI, F.; MORII, T.; MATSUI, T.; FUJINO, T.; WATANABE, Y.; WEIDANZ, W. P.; TSUJI, M. 1996. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. **Parasitol. Res.** 82:385–391.
56. KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M. ;GRAU, G.E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology** 1997; 91: 536–540.
57. KREMSNER, P.G.; NEIFER, S.; CHAVES, M.F.; RUDOLPH, R.; BIENZLE, U. Interferon-gamma induced lethality in the late phase of *Plasmodium vinckei* malaria despite effective parasite clearance by chloroquine. **Eur J Immunol**. 22(11):2873-8. 1992.
58. KUHN, H.; THIELE, B.J. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. **FEBS Lett.** 449(1):7-11. 1999. Review.
59. KURTZHALS, J. A.; ADABAYERI,V. ; GOKA, B. Q. ; AKANMORI, B. D. ; OLIVER-COMMEY, J. O. ; NKRUMAH, F. K. ; BEHR, C. ; HVIID, L. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. **Lancet**. 351:1768–1772.1998.
60. LANGHORNE, J.; GILLARD, S. ; SIMON, B. ; SLADE, S.; EICHMANN, K. Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. **Int Immunol**.1(4):416-24. 1989.

61. LANGHORNE, J.; QUIN, S. J. ; SANNI, L. A. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. **Chem. Immunol.** 80, 204–228. 2002.
62. LEVY, B.D. Lipoxins and lipoxin analogs in asthma. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** 2005 Sep-Oct;73(3-4):231-7.
63. LEVY, B.D.; BONNANS,C.; SILVERMAN, E. S.; PALMER, L. J.; MARIGOWDA, G.; ISRAEL, E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. **Am J Respir Crit Care Med** 172(7):824-30.2005.
64. LI, C.; CORRALIZA, I.; LANGHORNE, J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. **Infect Immun**, 67: 4435–4442. 1999.
65. LI, C.; SANNI, L.A.; OMER, F.M.; RILEY, E.M.; LANGHORNE, J. Pathology and mortality of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in IL-10-deficient mice is ameliorated by anti-TNF- α and exacerbated by anti-TGF- β antibodies. **Infection and Immunity** 2003.
66. LUTY, A.J.F.; LELL, B.; SCHMIDT-OTT, R.; LEHMAN, L.G.; LUCKNER, D., GREVE, B., MATOUSEK, P., HERBICH, K., SCHMID, D., MIGOT-NABIAS, F., DELORON, P., NUSSENZWEIG, R.S., KREMSNER, P.G. Interferon- γ responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. **J Infect Dis**, 179:980–8. 1999.
67. LUYENDYK, J.; OLIVAS, O.R.; GINGER, L.A.; AVERY, A.C. Antigen presenting cell function during *Plasmodium yoelii* infection. **Infect Immun**, 70: 2941–2949. 2002.
68. MACHADO, F.S.; ALIBERTI, J. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. **Immunol Res.** 35(3):209-18. 2006. Review.
69. MAHESHAWARI, R.K.; CZARNIECKI, C.W.; DUTTA, G.P.; PURI, S.K.; DHAWAN, B.N.; FRIEDMAN, R.M. Recombinant human gamma interferon inhibits simian malaria. **Infect. Immun.** 53:628.1986.
70. MALAGUARNERA, L.; PIGNATELLI, S.; SIMPORÈ, J.; MALAGUARNERA, M.; MUSUMECCI, S. Plasma levels of interleukin -12 (IL-12), interleukin -18 (IL-18) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in *Plasmodium falciparum* malaria. **Eur Cytokine Netw.**13(4):425-30. 2002.

71. MELLOUK, S.; MAHESHWARI, R.K.; RHODES-FEUILLETTE, A.; BEAUDOIN, R.L.; BERBIGUIER, N.; MATILE, H.; MILTGEN, F.; LANDAU, I.; PIED, S.; CHIGOT, J.P.; FRIEDMAN, R.M.; MAZIER, D. Inhibitory activity of interferons and interleukin-1 on the development of *Plasmodium falciparum* in human hepatocyte cultures. **J. Immunol.** 139:4192. 1987.
72. MORDMULLER, B.G.; METZGER, W.G.; JUILLARD, P.; BRINKMAN, B.M.; VERWEIJ, C.L.; GRAU, G.E.; KREMSNER, P.G. Tumor necrosis factor in *Plasmodium falciparum* malaria: high plasma level is associated with fever, but high production capacity is associated with rapid fever clearance. **Eur Cytokine Netw.** 8(1):29-35.1997.
73. NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature.** 420:846–852. 2002.
74. NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 11 edição. Livraria Atheneu Editora, São Paulo, 2002.
75. OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A.L.; RILEY, E. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF b. **Parasitol Today** .16: 18–23. 2000.
76. OMER, F.M.; RILEY, E.M. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. **Exp Med.** 1998 Jul 6;188(1):39-48.
77. ORAGO, A.; FACER, C. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. **Clin. Exp. Immunol.** 86, 22–29 (1991).
78. PÉRIGNON, J.L.; DRUILHE, P. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**89 Suppl 2:51-3. 1994.Review.
79. RAMSTEDT, U.; NG, J.; WIGZELL, H.; SERHAN, C.N., SAMUELSSON, B. Action of novel eicosanoids lipoxin A and B on human natural killer cell cytotoxicity: effects on intracellular cAMP and target cell binding. **J. Immunol.** 135:3434–3438. 1985.
80. READ, A.F. The evolution of virulence. **Trends Microbiol.**, 2: 73–76. 1994.
81. RICHARDS, A.L. Tumour necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. **Int J Parasitol.** 27(10):1251-63.1997.Review.

82. RILEY, E.M.; JAKOBSEN, P.H.; ALLEN, S.J.; WHEELER, J.G.; BENNETT, S.; GREENWOOD, B.M. Immune responses to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune African children. **Eur J Immunol** 1991;21:1019–25.
83. ROCKETT, K.A.; AWBURN, M.M.; COWDEN, W.B.; CLARK, I.A. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. **Infect Immun.** 59(9):3280-3. 1991.
84. ROSHANRAVAN, B.; KARI, E.; GILMAN, R.H.; CABRERA, L.; LEE, E.; METCALFE, J.; CALDERON, M.; LESCANO, A.G.; MONTENEGRO, S.H.; CALAMPA, C.; VINETZ, J.M. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. **Am J Trop Med Hyg.** 2003 Jul;69(1):45-52.
85. SANAK, M.; LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; CHIANG, N.; GRONERT, K.; MASTALERZ, L.; SERHAN, C. N.; SZCZEKLIK, A. Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. **Eur Respir J** 16(1):44-9. 2000.
86. SCHOFIELD, L.; GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat Rev Immunol.** 2005 Sep;5(9):722-35. Review.
87. SCHOFIELD, L.; FERRERIA, A.; ATSZULER, R. ; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R.S. Interferon-gamma inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites in vitro. **J. Immunol.** 139:2020. 1987.
88. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE-Ministério da Saúde. Disponível <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=2765>. Acesso em: 01 ago, 2007.
89. SEIXAS, E.; CROSS, C.; QUIN, S.; LANGHORNE J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Eur J Immunol.** 31: 2970–2978. 2001.
90. SERGHIDES, I.; SMITH, T. G.; PATEL, S. N.; KAIN, K. C. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends Parasitol.** 19, 461–469. 2003.
91. SERHAN, C.N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution [review]. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 68–69:433–455. 2002.
92. SERHAN, C.N.; SHEPPARD, K.A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. **J. Clin. Invest.** 85:772–780. 1990.

93. SHAHABUDDIN, M.; TOYOSHIMA, T.; AIKAWA, M.; KASLOW, D.C. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1993 May 1;90(9):4266-70.
94. SHER, A.; COLLAZZO, C.; SCANGA, C.; JANKOVIC, D.; YAP, G.; ALIBERTI, J. Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol Res**. 2003;27(2-3):521-8. Review.
95. SHER, A.; PEARCE, E.; KAYE, P. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. **Curr. Opin. Immunol**. 15, 421–429. 2003.
96. SHEVACH, E.M.; CHANG, J.T.; SEGAL, B.M. The critical role of IL-12 and the IL-12R beta 2 subunit in the generation of pathogenic autoreactive Th1 cells. **Springer Semin Immunopathol**. 1999;21(3):249-62. Review.
97. Snounou, G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. **Meth. molec. Biol.**, 50: 263-291, 1996.
98. STEKETEE, R.W.; NAHLEN, B.L.; PARISE, M.E.; MENENDEZ, C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. **Am J Trop Med Hyg**. 64 (1–2 suppl): 28–35. 2001.
99. STEWART, M.J.; NAWROT, R.J.; SCHULMAN, S.; VANDERBERG, J.P. *Plasmodium berghei* sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. **Infect Immun**. 1986 Mar;51(3):859-64.
100. STEWART, M.J.; VANDERBERG, J.P. Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. **J Protozool**. 1991 Jul-Aug;38(4):411-21.
101. SU, Z.; STEVENSON, M.M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. **J Immunol**. 2002 Feb 1;168(3):1348-55.
102. SUÁREZ-MUTIS, M.C.; BONILLA, M.P.; BLANDÓN, M.E. Diagnosis of the health situation of the Yujup-Maku, a seminomadic indigenous group of the Colombian Amazonas. Abstracts 2 XVTH INTERNATIONAL CONGRESS FOR TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE AND MALARIA, Cartagena, p. 192. 2000a.

103. SUÁREZ-MUTIS, M.C.; BONILLA, M.P.; BLANDÓN, M.E. Prevention and control of malaria among the Yujup-Maku, of la Libertad: an ethnic group on the brink of extinction. XVTH INTERNATIONAL CONGRESS FOR TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE AND MALARIA, Cartagena, p. 113. 2000b.
104. SUÁREZ-MUTIS, M.C.; CUERVO, P.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Evidência da presença de infecção assintomática por *Plasmodium* no médio rio Negro, Estado do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop** 37(Supl. I): 268-269. 2004.
105. SUÁREZ-MUTIS, M.C.; CUERVO, P.; LEORATTI, F.M.; MORAES-AVILA, S.L.; FERREIRA, A.W.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2007 May-Jun;49(3):159-64.
106. TAYLOR-ROBINSON, A.W.; PHILLIPS, R.S. Protective CD4+ T-cell lines raised against *Plasmodium chabaudi* show characteristics of either Th1 or Th2 cells. **Parasite Immunol**. 1993 Jun;15(6):301-10.
107. TRINCHIERI, G. INTERLEUKIN-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv Immunol**. 70:83-243. 1998. Review.
108. TSUTSUI, N.; KAMIYAMA, T. Transforming growth factor beta-induced failure of resistance to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* in mice. **Infect Immun**. 1999 May;67(5):2306-11.
109. URBAN, B.C.; FERGUSON, D.J.; PAIN, A. *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature** 400:73–77. 1999.
110. URBAN, B.C.; WILLCOX, N.; ROBERTS, D.J. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. **Proc Natl Acad Sci USA**; 98: 8750–8755. 2001.
111. WAKI, S.; UEHARA, S.; KANBE, K.; ONO, K.; SUZUKI, M.; NARIUCHI, H. The role of T cells in pathogenesis and protective immunity to murine malaria. **Immunology**.75(4):646-51. 1992.
112. WENISCH, C.; PARSCHALK, B.; NARZT, E.; LOOAREESUWAN, S.; GRANINGER, W. Elevated serum levels of IL-10 and IFN-g in patients with acute *Plasmodium* malaria. **Clin Immunol Immunopathol**;74:115–7,1995.
113. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infectious Disease Malaria. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>> Acesso em: 15 ago. 2007.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS 5
Núcleo Avançado de Pesquisa/MN

Posto de Correios de Monte Negro
CEP : 78965-000 - Monte Negro, Rondônia
Fone: -Fax : 55-69-5302053
e-mail: spider@ronet.com.br

Imunoregulação na malária assintomática: Avaliação dos níveis de Lipoxina A4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade de São Paulo está empenhada em investigar aspectos relacionados à ocorrência de malária assintomática em Rondônia, visando conhecer melhor os agentes causadores para eventualmente ter um maior controle sobre os mesmos.

Para se participar do estudo o paciente deverá passar em consulta pelo médico e colher inicialmente 10 mL de sangue de 6 em 6 meses para exames laboratoriais que ajudarão no diagnóstico e a fornecer informações mais detalhadas sobre a doença.

Caso você venha a se tornar um caso de malária sintomática, será coletada, nesta ocasião, 10ml de sangue para exame diagnóstico de malária e você receberá tratamento conforme protocolo da FUNASA (Fundação Nacional de Saúde).

Caso você seja diagnosticado como um caso de malária assintomática, você será acompanhado a cada 10 dias por uma médica e os Postos de Notificação de Malária serão avisados de sua condição sorológica, sendo que se você desenvolver os sintomas da malária, será tratado conforme o protocolo

da FUNASA. Quando a médica sair da região, você será tratado para malária conforme protocolo da FUNASA, independente de ter sintomas.

Será realizado um estudo de anemia e nutrição na região, para isto faremos coleta de sangue em tubo capilar para exame de hematócrito, pesaremos e mediremos toda a população. Também serão coletados exames de fezes para diagnóstico e tratamento de parasitas intestinais da população.

Nas crianças menores de 4 anos, coletaremos sangue apenas por papel filtro.

O material utilizado na coleta é estéril e descartável e os riscos da coleta do material são mínimos. Todos os resultados serão fornecidos ao paciente e seus resultados serão mantidos sob sigilo médico. Não serão testados medicamentos ou substâncias de qualquer natureza. A participação no estudo não é obrigatória e caso não deseje participar ou se quiser abandonar o estudo, receberá a mesma atenção da equipe de saúde. No caso de você ser um paciente com malária assintomática, poderá receber o tratamento protocolado da FUNASA quando desejar.

EU,.....,

DECLARO QUE FUI INFORMADO A RESPEITO DOS PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS CASO PARTICIPE DO MENCIONADO PROJETO DE PESQUISA, FUI ORIENTADO EM RELAÇÃO AOS EVENTUAIS RISCOS (AUTORIZO O MENOR DE IDADE SOB MINHA RESPONSABILIDADE) E ME PROPONHO A PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE DO ESTUDO.

.....de de 2005.

.....

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)