



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Marcela Petrolini Capobianco

Associação de polimorfismos do receptor *TCR* e dos genes da
IL1 e *IL2* com a infecção por *Plasmodium vivax* no município de
Goianésia do Pará, Estado do Pará

São José do Rio Preto
2017

Marcela Petrolini Capobianco

Associação de polimorfismos do receptor *TCR* e dos genes da *IL1* e *IL2* com a infecção por *Plasmodium vivax* no município de Goianésia do Pará, Estado do Pará

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia R. Bonini-Domingos.

São José do Rio Preto
2017

Capobianco, Marcela Petrolini.

Associação de polimorfismos do receptor TCR e dos genes da IL1 e IL2 com a infecção por *Plasmodium vivax* no município de Goianésia do Pará, Estado do Pará / Marcela Petrolini Capobianco. -- São José do Rio Preto, 2017

166 : il., tabs.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Coorientador: Claudia R. Bonini-Domingos

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular humana. 2. Malária – Pará. 3. *Plasmodium vivax*. 4. Polimorfismo (Genética) 5. Receptores de antígenos de linfócitos T. 6. Interleucinas. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

II. Título.

CDU – 575.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Marcela Petrolini Capobianco

Associação de polimorfismos do receptor *TCR* e dos genes da *IL1* e *IL2* com a infecção por *Plasmodium vivax* no município de Goianésia do Pará, Estado do Pará

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ricardo L. D. Machado
IEC/SVS/MS – Ananindeua - Pará
Orientador

Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini
FAMERP – São José do Rio Preto-SP

Profa. Dra. Maria Tercilia Vilela
UNESP – São José do Rio Preto – SP

Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino
FAMERP – São José do Rio Preto-SP

Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi
UNESP – São José do Rio Preto – SP

São José do Rio Preto
12 de abril de 2017

RESUMO

No Brasil o *Plasmodium vivax* é a espécie mais prevalente, responsável por aproximadamente 85% dos casos de malária. Ademais as variantes da proteína circumesporozoíta (CSP - VK210, VK247 e *P. vivax-like*) já foram identificadas em várias áreas endêmicas no país. Diversos estudos analisando a influência da variabilidade genética de receptores celulares e moléculas envolvidas na resposta imune, com diferentes peptídeos do *Plasmodium*, têm obtido resultados variáveis de acordo com o antígeno utilizado e a população analisada. Este trabalho apresenta resultados sobre o estudo de polimorfismos genéticos no TCR (T cell Receptor) e nas Interleucinas 1 e 2 em pacientes infectados por *P. vivax* provenientes do município de Goianésia do Pará, no Estado do Pará. Avaliou-se estes polimorfismos com a parasitemia do indivíduo, com os genótipos da CSP e com a resposta sorológica contra os peptídeos da CSP. Foram relacionados também estes polimorfismos com os níveis de citocinas. Os polimorfismos foram analisados por técnicas de PCR-RFLP e PCR alelo específico. As análises sorológicas da CSP foram realizadas por ELISA. Foram comparadas as frequências genotípicas observadas segundo o teorema de *Hardy-Weinberg* (HW). Os níveis de IL1 e IL2 foram avaliados por citometria de fluxo, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Associação dos polimorfismos com os níveis de interleucinas foi avaliada por Análise de variância. As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas no programa R v 2.11.1. A parasitemia variou de 15 a 70.000, com mediana de 1.500 parasitos/mm³. Os SNPS investigados mostraram frequências variadas na amostra estudada. Todo o polimorfismo avaliado encontra-se em Equilíbrio

de Hard Wenberg. Não houve diferença significativa da parasitemia em relação aos SNPs investigados. Infecções contendo apenas a variante VK247 foram as mais comuns e também não foi observado diferença significativa na resposta de anticorpos de acordo com a variante da CSP presente no momento da infecção. Correlações significativas entre os níveis destas interleucinas com a parasitemia e os níveis de anticorpos contra as variantes da CSP não foram observadas. Além disso, as variantes da CSP não influenciaram os níveis plasmáticos das citocinas e não houve associações positivas entre os SNPs das *IL1* e *IL2* e seus níveis plasmáticos. Os resultados poderão contribuir na identificação e participação efetiva de genes humanos na modulação da resposta imune, essenciais no estabelecimento de estratégias de imunização contra a doença, em área de transmissão ativa no Estado do Pará.

Palavras-chaves: Malária, Amazônia brasileira, *Plasmodium vivax*, TCR, IL-1, IL-2, Polimorfismos.

ABSTRACT

In Brazil, Plasmodium vivax is the most prevalent species responsible for approximately 85% of malaria cases. In addition, variants of the circumsporozoite protein (CSP - VK210, VK247 and P. vivax - like) have already been identified in several endemic areas in the country. Several studies analyzing the influence of the genetic variability of cellular receptors and molecules involved in the immune response with different Plasmodium peptides have obtained variable results according to the antigen used and the analyzed population. This work presents results on the study of genetic polymorphisms in TCR (T cell Receptor) and in Interleukins 1 and 2 in patients infected by P. vivax from the city of Goianésia do Pará, in the State of Pará. These polymorphisms were evaluated with Parasitemia, CSP genotypes and serological response to CSP peptides. These polymorphisms were also related to cytokine levels. Polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP and allele-specific PCR techniques. Serological tests of CSP were performed by ELISA. The genotypic frequencies observed according to the Hardy-Weinberg (HW) theorem were compared. Levels of IL1 and IL2 were evaluated by flow cytometry following the protocol described by the manufacturer. Association of polymorphisms with interleukin levels was evaluated by analysis of variance. The genotypic and allelic frequencies were obtained in program R v 2.11.1. The parasitemia ranged from 15 to 70,000, with a median of 1,500 parasites / mm³. The SNPS investigated showed varied frequencies in the sample studied. All polymorphism evaluated is in Hardy-Weinberg Equilibrium. There was no significant difference in parasitemia in relation to the investigated SNPs. Infections containing only the VK247 variant were the most common and also no significant difference in antibody response was observed according to the CSP variant present at the time of infection. Significant correlations between the levels of these interleukins with parasitemia and levels of antibodies against variants of

CSP were not observed. In addition, the CSP variants did not influence plasma cytokine levels and there were no positive associations between IL1 and IL2 SNPs and their plasma levels. The results may contribute to the identification and effective participation of human genes in the modulation of the immune response, essential in the establishment of immunization strategies against the disease, in an active transmission area in the State of Pará.

Keywords: Malaria, Brazilian Amazon, Plasmodium vivax, TCR, IL-1, IL-2, Polymorphisms.

Dedico esta tese aos meus pais, minha irmã e cunhado e ao meu marido, por todo o apoio, amor e confiança que depositaram em mim.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**, minha eterna gratidão por ter me acolhido em seu laboratório desde o mestrado. Obrigada pelos ensinamentos, confiança, amizade e companheirismo que contribuíram para o meu crescimento profissional e acadêmico.

A minha co-orientadora **Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos** pela amizade, ensinamentos e apoio que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini**, pela amizade, apoio e confiança na realização deste trabalho.

Às técnicas **Valéria Fraga e Luciana Moran**, a quem gostaria de agradecer especialmente, pela amizade e por terem me ajudado em todos os momentos.

Aos grandes amigos do laboratório Centro de Investigação de Microrganismos/FAMERP, **Adriana Furini, Maira Tomaz, Pâmella Trindade e em especial ao Gustavo Capatti Cassiano** que não mediram esforços para me ajudar.

A todos os colegas do bloco U6 da **FAMERP**, pela disposição em ajudar, especialmente as incontáveis vezes que precisei visualizar os géis de eletroforese.

Às técnicas do Instituto Evandro Chagas **Rafaele Procópio, Tamirys Simão e Daniele Barbosa**, a quem gostaria de agradecer por terem me ajudado nas análises de citocinas e com variantes do *Plasmodium vivax*.

A **Prof. Dra. Joseli Oliveira-Ferreira e a todos os alunos e técnicos** do Laboratório de Imunoparasitologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro que não mediram esforços com a realização das análises sorológicas da Proteína Circunsporozoíta.

Aos organizadores do seminário Laveran/Deane sobre malária, **Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro e Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz**, pela oportunidade de participar deste evento e pelas sugestões que enriqueceram o meu trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética.

A todos meus professores, pela competência e generosidade intelectual com que me orientaram.

A Capes, pela bolsa e auxílio financeiro.

A todos os pacientes com malária.

A meu marido **Evandro Soares da Silva**, por todo o companheirismo, amizade, paciência, incentivo nas horas mais difíceis e compreensão. Amo você.

Aos meus pais, **Mauro Capobianco e Maria de Fátima Petrolini Capobianco**, pelo enorme apoio. Vocês moram no meu coração. Amo vocês.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 Malária - abordagem geral	19
1.2 Aspectos da Malária vivax.....	19
1.3 Resposta Imune e Malária vivax	20
1.4 Proteína Circunsporozoíta (CSP) e as variantes do <i>P. vivax</i>	26
1.5 Genes Humanos modeladores da Resposta Imunológica.....	31
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3. METODOLOGIA.....	40
3.1 Área de Estudo.....	40
3.2 Amostra.....	41
3.3 Extração de DNA.....	41
3.4 Genotipagem do TCR.....	42
3.5 Avaliação do Polimorfismo Genético no gene da <i>IL-1B</i> (-511 C>T).....	43
3.6 Genotipagem do SNP -330 T/G e +114 T/G no gene da <i>IL-2</i>	44
3.7 Ensaio de Citocinas.....	45
3.8 Amplificação do Fragmento do gene da CSP de <i>Plasmodium vivax</i> pelo método de PCR-RFLP.....	46
3.9 Avaliação da resposta sorológica de <i>P. vivax</i>	46
3.10 Análise estatística dos dados.....	47
4. RESULTADOS.....	50
4.1 População de Estudo.....	50

4.2	Frequências alélicas e genotípicas de variantes nos genes <i>TCR</i> , <i>IL-1</i> e <i>IL-2</i> em amostras de pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	50
4.2.1	Frequência alélica e genotípica dos segmentos gênicos do <i>TCRBV3S1</i> e do <i>TCRBV20S1</i>	50
4.2.2	Frequência alélica e genotípica do gene da <i>IL-1B</i>	52
4.2.3	Frequência alélica e genotípica do gene da <i>IL2</i>	52
4.3	Associações entre os polimorfismos do gene <i>TCR</i> , <i>IL-1beta</i> e <i>IL-2</i> e a densidade parasitária de pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	52
4.4	Níveis plasmáticos de IL-1alfa, IL1- beta e IL-2 em indivíduos naturalmente infectados pelo <i>P. vivax</i>	54
4.5	Genotipagem da CSP.....	54
4.6	Reconhecimento de anticorpos de variantes de PvCSP.....	56
4.7	Influência dos genótipos da CSP na produção de anticorpos.....	56
4.8	Perfil de Citocinas.....	58
4.9	Correlação entre os níveis de Interleucinas com parasitemia e anticorpos contra as variantes da CSP.....	59
4.10	Influência das variantes da CSP nos níveis de citocinas.....	60
4.11	Associação dos polimorfismos nos genes <i>IL1B</i> e <i>IL2</i> com seus produtos.....	61
5.	DISCUSSÃO.....	63
6.	CONCLUSÃO.....	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8.	ANEXO.....	103
9.	ANEXO I.....	105
10.	ANEXO II.....	109

11.CAPÍTULOS.....	114
12.ARTIGO I.....	115
13.ARTIGO II.....	120
14.ARTIGOS III.....	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp</i>	20
Figura 2. Ativação do Linfócito T e diferenciação do Linfócito B em Plasmócito com posterior secreção de anticorpos.....	25
Figura 3. Estrutura do Gene CS de <i>Plasmodium vivax</i>	27
Figura 4. Esquema Representativo das cadeias peptídicas alfa e beta do TCR bem como suas regiões constantes e variáveis.....	32
Figura 5. Esquema Representativo de Goianésia do Pará: área de estudo.....	40
Figura 6. Anticorpos IgG adquiridos naturalmente contra variantes de PvCSP.....	55
Figura7. Níveis de anticorpos anti-CSP em relação a presença das variantes na infecção.....	56
Figura 8. Perfil de citocinas no soro de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> versus controles endêmicos.....	59
Figura 9. Correlação entre os níveis de IL1 α e IL1 β	59
Figura 10. Perfil de citocinas entre infecções contendo as variantes VK210 e VK247.....	60
Figura 11. Associação entre os SNPs <i>IL1B</i> rs16944 (A), <i>IL2</i> rs2069762 (B) e <i>IL2</i> rs2069763 (C) com seus produtos gênicos.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência dos polimorfismos em <i>TCRBV3S1</i> e <i>TCRBV20S1</i> e associação com a parasitemia.....	51
Tabela 2. Frequência dos polimorfismos e associação com níveis de anticorpos contra as variantes da CSP.....	58
Tabela 3. Correlação entre os níveis de citocina com parasitemia e anticorpos contra a CSP.....	61

LISTA DE ABREVIACÕES

P. vivax – *Plasmodium vivax*

PvDBP – *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein

DARC - Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC; receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for chemokines*)

DBP - Proteína de ligação ao eritrócito (Duffy binding protein)

AMA-1 – Antígeno 1 de Membrana Apical

RONs – do inglês *Rhoptry Neck Protein*

IgG1 - Imunoglobulina G de classe 1

IgG3 – Imunoglobulina G de classe 3

Fc – *Cristal Fraction* – primeira fração do anticorpo que teve sua conformação determinada

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

INF γ – Interferon Gama

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

LT – Linfócito T

IL – Interleucinas

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

NK – linfócitos *Natural Killer*

TCR – Receptor de Célula T

CTLA-4 – *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*

cDNA – DNA complementar

CSP – Proteína Circunsporozoíta

VK210 – Variante do *Plasmodium vivax*

VK247 – Variante do *Plasmodium vivax*

P.vivax-like – Variante do *Plasmodium vivax*

P. simiovale – *Plasmodium simiovale*

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

IL1A – gene da Interleucina 1 alfa

IL1B – gene da Interleucina 1 beta

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

PCR-RFLP – do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*

PCR-CTPP – PCR Alelo Específico

ELISA – Ensaio Imunoenzimático, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Malária – abordagem geral

A malária é uma infecção de manifestação principalmente aguda, caracterizada principalmente pela tríade de calafrios, febre e sudorese excessiva (HENRY et al., 1999; JAIN et al., 2010). Apesar dos progressos nas estratégias de controle da malária, a doença ainda é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais (MAIGA et al., 2013; WHO, 2016). Cento e quatro países são endêmicos com 207 milhões de casos clínicos por ano e, aproximadamente, 627.000 mil mortes (WHO, 2016). Nas Américas, três países concentram 76% dos casos de malária, sendo o Brasil responsável por 52% dos casos (WHO, 2012).

Os parasitos dessa nosologia são protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium* e, atualmente, cinco espécies reconhecidas infectam o homem, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e o *Plasmodium knowlesi* (BROCK et al., 2016; WHO, 2016). O *P. falciparum* está associado aos maiores índices de mortalidade e virulência, enquanto que o *P. vivax* é amplamente disseminado pelo mundo (ANDRADE et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; WHO, 2016). Atualmente, no Brasil, o *P. vivax* tem sido responsável por aproximadamente 85% dos casos (WHO, 2016). Historicamente casos clínicos graves por *P. vivax* são raros (ANDRADE et al., 2010), no entanto, estudos reforçam a associação dessa espécie com complicações clínicas e casos fatais, sendo este um motivo de preocupação para a saúde pública (ALECRIM et al., 2006; LACERDA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010).

Os perfis de transmissão da doença no Brasil são diferentes e observados em três ambientes distintos; na Amazônia e na Mata Atlântica, ambos com uma predominância de casos autóctones, e em outras regiões, com casos importados de recentes viagens a áreas endêmicas de malária no país, ou em outros da América Central e do Sul, países africanos ou asiáticos (PINA-COSTA et al., 2014; LORENZ et al., 2015).

1.2 Aspectos da Malária vivax

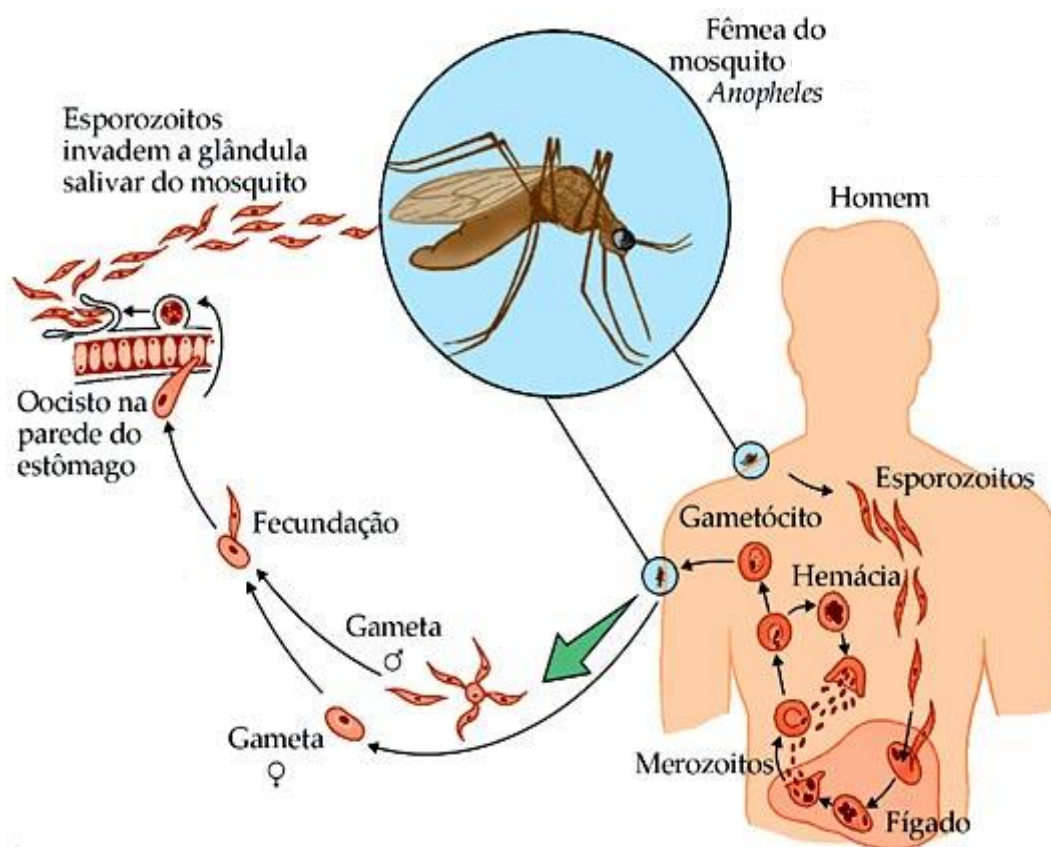
O ciclo de vida do *Plasmodium* spp. é muito complexo e necessita da expressão de proteínas especializadas para garantir sua sobrevivência tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado. É constituído por duas fases, uma sexuada exógena e a outra assexuada endógena. Na fase sexuada ocorre à multiplicação dos parasitos nos mosquitos do gênero *Anopheles*, hospedeiro definitivo, e a fase assexuada é caracterizada pela multiplicação no humano, hospedeiro intermediário, ocorrendo em células parenquimatosas do fígado ou nos eritrócitos (MUELLER et al., 2009; GAZZINELLI et al., 2014).

A infecção tem início durante o repasto sanguíneo do mosquito fêmea infectado, o qual inocula, juntamente com a saliva, os esporozoítos que invadem os hepatócitos, crescem e se multiplicam, diferenciando-se em esquizontes hepáticos. Esta fase é denominada de esquizogonia hepática (LORENZ et al., 2015; WHO, 2016). No ciclo de vida do *P. vivax* os esporozoítos podem originar os hipnozoítos, que permanecem no hepatócito em um estado dormente, desenvolvendo-se meses ou anos mais tarde, sendo responsável pelas recaídas da doença (GAZZINELLI, 2014). O ciclo tem início com a maturação dos esquizontes hepáticos, os quais darão origem aos merozoítos hepáticos que serão liberados na corrente sanguínea por meio da lise dos hepatócitos e, que, posteriormente, invadirão os eritrócitos. Após a invasão, inicia-se a esquizogonia eritrocitária e os merozoítos se diferenciarão em trofozoítos que, por sucessivas divisões, resultarão nos esquizontes eritrocitários (TUTEJA, 2007).

Com a lise do eritrócito parasitado, são liberados novos merozoítos na corrente sanguínea, os quais farão a invasão de novos eritrócitos, além da sintomatologia febril associada à lise celular (MUELLER et al., 2009). Alguns merozoítos, após a invasão nos eritrócitos, podem não evoluir para a forma de esquizontes e sim, se diferenciarem nas formas sexuadas do parasito, os gametócitos feminino e masculino que, quando ingeridos pela fêmea do mosquito durante o repasto sanguíneo, se desenvolvem no seu estômago, originando os macro e microgametas. Após a fertilização, inicia-se o ciclo esporogônico (TUTEJA, 2007). O zigoto formado evolui para oocineto móvel, invadindo as células epiteliais do estômago do mosquito onde se fixa e da

origem ao oocisto, que após sucessivas mitoses, originarão os esporozoítos. Estes rompem o oocisto e invadem a cavidade corporal do mosquito e migram, através da hemolinfa, para as glândulas salivares onde se acumulam no ducto salivar e tornam-se infectantes. Assim, quando o mosquito infectado faz o repasto sanguíneo, os esporozoítos são inoculados, podendo então, iniciar uma nova infecção no hospedeiro vertebrado (COLLINS; JEFFERY, 2007; SCOTTO, 2010).

Figura 1- Ciclo de vida do *Plasmodium* sp.



Fonte: Disponível em <<http://pt.slideshare.net/lipamufca/malaria-20151>>. Acesso em jun. 2016.

O *P. vivax* é capaz de invadir somente reticulócitos, eritrócitos jovens que expressam em sua superfície o determinante antigênico do grupo sanguíneo Duffy (também conhecido como receptor DARC), um antígeno receptor de quimiocinas, o qual é o receptor da molécula ligante ao *P. vivax* *Duffy Binding Protein* (PvDBP) que está localizada nos micronemas e, apenas momentos antes da invasão, é liberada na superfície do merozoíto (HORUK et

al., 1993). Esta interação parece ser fundamental na formação de uma junção irreversível entre as membranas do merozoíto e da célula hospedeira, tornando-se uma etapa chave no processo de invasão aos eritrócitos. A importância desta ligação remonta à década de 1970, quando Miller e colaboradores (1976) postularam que indivíduos completamente refratários à infecção por *P. vivax* não possuíam o receptor sanguíneo Duffy. Entretanto, apesar da reconhecida resistência conferida pela ausência do antígeno Duffy nos eritrócitos, recentemente vários estudos relataram casos de indivíduos Duffy negativos infectados com *P. vivax*, sugerindo que estes indivíduos poderiam se infectar pelo protozoário, provavelmente por meio de outros receptores envolvidos no reconhecimento eritrocitário (CAVASINI et al., 2007; MÉNARD et al., 2010; WOLDEAREGAI et al., 2013). O processo de invasão do eritrócito pelo *Plasmodium* é complexo e envolve várias etapas, a saber: (1) reconhecimento e aderência reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; (2) reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; (3) desenvolvimento de uma junção irreversível no ponto de contato entre a porção apical do parasito e a membrana celular do eritrócito; (4) movimentação da junção ao redor do merozoíto com invaginação da membrana do eritrócito para que o parasito ocupe a porção interior da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo. Os dois eventos iniciais, envolvendo o reconhecimento e adesão do parasito, são aparentemente de baixa afinidade e reversíveis (COWMAN; CRABB, 2006). Ambas as etapas permitem ao parasito diferenciar um eritrócito competente para invasão de outro tipo celular. Além disso, a terceira e quarta etapa abrangem interações do tipo ligante-receptor de alta afinidade e, a partir deste ponto, o processo de invasão se torna irreversível (MUELLER et al., 2009).

A formação das junções irreversíveis, e posterior invasão da célula são mediadas pela interação da DBP com seu receptor DARC (do inglês *Duffy antigen receptor for chemokines*) presente na superfície do reticulócito (revisto por NTUMNGIA et al., 2012). A proteína AMA-1, juntamente com as proteínas RONS (do inglês *rho-trypanin protein*) participam da formação da junção de movimento que permite a invasão do merozoíto. As RONS- 2, 4 e 5 são inseridas na membrana do eritrócito, e após a ligação de AMA-1 com a RON-2, tem-se uma estrutura em forma de anel que circunda o merozoíto, permitindo

assim, a entrada do parasito na célula hospedeira (GAUR e CHITNIS, 2011). A infecção de hemácias imaturas por *P. vivax* produz invaginações que contém antígenos altamente polimórficos codificados pelo parasito. Todas estas proteínas que participam do processo de invasão e desenvolvimento do *P. vivax* são potenciais alvos do sistema imune do hospedeiro.

1.3 Resposta Imune e Malária vivax

Mecanismos inatos, humorais e celulares são envolvidos na resposta imune a malária, com a participação de células, citocinas, receptores e anticorpos, que podem eliminar o agente etiológico ou acarretar em complicações imunopatológicas (MEDINA et al., 2011; GAZZINELLI et al., 2014). Os mecanismos mediadores da proteção conferida pelos anticorpos incluem: 1) inibição da invasão dos merozoítos aos eritrócitos. Anticorpos ligados a proteínas envolvidas no processo de invasão impedem a ligação destas proteínas com seus receptores localizados no eritrócito, prevenindo assim, a invasão aos merozoítos (BLACKMAN et al., 1990); 2) inibição do crescimento do parasito intraeritrocítico em associação com monócitos (mecanismo conhecido como ADCI, do inglês antibody dependent cellular inhibition). Após a ruptura do esquizonte, os eritrócitos infectados são opsonizados por IgG1 e IgG3, que ligam-se por meio da porção Fc a receptores Fcγ expressos na superfície de macrófagos, induzindo-os a produzir TNF- α , que inibe o desenvolvimento das formas intraeritrocíticas (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995) e; 3) clareamento dos eritrócitos infectados. Além disso, sugere-se que eritrócitos infectados pelo *P. vivax* apresentam deformabilidade aumentada, o que os possibilita a atravessarem o baço sem que sejam destruídos (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2009). Assim, anticorpos ligados aos eritrócitos infectados poderiam diminuir esta deformabilidade, facilitando o clareamento pelo baço.

A resposta imune contra o *Plasmodium* pode ser gerada especificamente contra cada um dos estágios do parasito. No estágio pré-eritrocítico, que envolve esporozoítos e esquizontes hepáticos, a resposta imune é mediada por mecanismos humoral e celular. Apesar de sua rápida permanência na corrente sanguínea, os esporozoítos são capazes de estimular a produção de anticorpos. O papel protetor dos anticorpos durante este estágio

envolve uma gama de mecanismos, incluindo o bloqueio da invasão dos esporozoítos aos hepatócitos (CHAPPEL et al., 2004), opsonização dos esporozoítos (SCHWENK et al., 2003) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (MAZIER et al., 1990). Os mecanismos mediados por células também parecem ser importantes e envolvem tanto macrófagos e células dendríticas, que possuem a capacidade de fagocitar os esporozoítos (HAFALLA et al., 2011), como a atividade citolítica de células T CD8⁺ e CD4⁺ sobretudo devido a produção de IFN- γ (GOOD e DOOLAN, 1999). Além disso, a resposta imune também pode ser dirigida contra os estágios sexuais do parasito. Esta resposta, também conhecida como imunidade bloqueadora de transmissão, foi primeiramente demonstrada utilizando modelos animais cujos anticorpos, ingeridos juntamente com as formas sexuais do parasito durante o repasto sanguíneo do mosquito, eram capazes de impedir a fertilização e formação dos oocinetos no estômago dos mosquitos (TSUBOI et al., 2003). Demonstrou-se que indivíduos expostos a sucessivas infecções adquirem anticorpos contra os estágios sexuais do parasito, uma vez que o soro destes indivíduos é capaz de bloquear a transmissão (AREVALO-HERRERA et al., 2005). A produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias é capaz de inativar os gametócitos ainda dentro do hospedeiro vertebrado (LONG et al., 2008).

Sendo assim, pode-se observar que o *P. vivax* induz resposta imune específica no hospedeiro por meio de mecanismos humorais (Linfócito - Th2) e celulares (Linfócito - Th1). Os mecanismos humorais são caracterizados pela participação de anticorpos que conferem proteção por opsonizarem merozoítos e assim impedirem a invasão nas hemácias (RUMMEL et al., 2004). Participam também desta resposta os Linfócitos T, que após o reconhecimento de agentes processados pelas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), liberam interleucinas (IL) que regulam os macrófagos, células dendríticas, ou até mesmo, os Linfócitos B para execução da resposta imune ao agente etiológico (ELIAS et al., 2005).

Os Linfócitos B são ativados por meio da liberação das IL-2, IL-4 e IL-5, que determinam a classe de anticorpos a ser produzida, assim como a mudança de isotipos de imunoglobulinas. Na resposta celular, as ILs liberadas pelos Linfócitos T, aumentam a atividade fagocítica de macrófagos, neutrófilos,

células dendríticas, monócitos e linfócitos *natural killer* (NK), com a finalidade de combater a infecção (RUMMEL et al., 2004; JAIN et al., 2010; WIPASA et al., 2011; MEDINA et al., 2011).

Os linfócitos T são ativados quando os receptores de células T (TCR) e os co-receptores CD4 ou CD8 são capazes de reconhecer o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), expresso nas APCs, ligados com antígenos peptídicos processados por mecanismos lisossômicos ou proteossômicos (RUMMEL et al., 2004; ELIAS et al., 2005). Entretanto, essa ligação não determina a expansão clonal, a qual necessita ainda de um segundo sinal co-estimulatório, que é emitido pela mesma APC, através de glicoproteínas denominadas de B7.1 ou CD80 e B7.2 ou CD86, que se ligam ao seu receptor correspondente nas células T, a molécula CD28 (ELIAS et al., 2005).

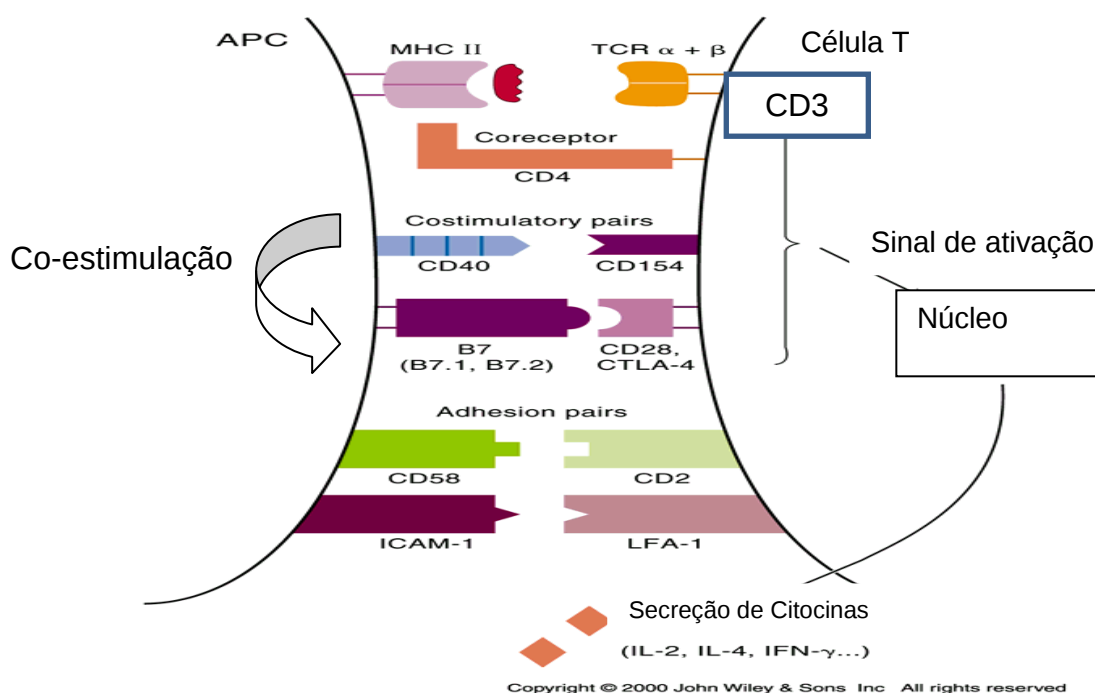
CD28 foi a primeira molécula coestimulatória descoberta após o conceito de que o processo para a ativação de células T requer sinais adicionais além do antígeno específico reconhecido pelo TCR. Em humanos, CD28 é expressa constitutivamente tanto em células T virgens quanto em células T ativadas, embora uma pequena parcela de células T CD4⁺ não expressam CD28 (GROSS et al., 1990; AMYES et al., 2005). A coestimulação de CD28 aumenta a produção de diferentes citocinas, especialmente a da IL-2, (FRASER et al., 1991). Além disso, a sobrevivência das células T é aumentada, em parte, pela indução da expressão de proteínas antiapoptóticas, incluindo Bcl-XL (SPERLING et al., 1996). Assim, devido a esta variedade de mecanismos, a coestimulação mediada por CD28 aumenta a resposta efetora de células T ao antígeno.

Após a identificação de CD28, uma molécula relacionada, denominada de CTLA-4 foi descoberta em uma biblioteca de cDNA de células T CD8⁺ (BRUNET et al., 1987). Experimentos utilizando anticorpos contra CTLA-4 sugeriram que esta molécula estava envolvida com a inibição da ativação de células T (KRUMMEL e ALLISON, 1995). Funcionalmente, foi demonstrado o papel inibidor de CTLA-4 na proliferação de células T, progressão do ciclo celular e na produção de IL-2 (WALUNAS et al., 1996). Mais recentemente, foi demonstrado que CTLA-4 influencia a resposta imune do tipo Th17, uma vez que o bloqueio de CTLA-4 por anticorpos monoclonais resultou em um

aumento da diferenciação de células Th17 e da produção de IL-17 tanto in vivo como in vitro (YING et al., 2010).

Os ligantes CD80 e CD86 são provavelmente as moléculas coestimulatórias mais bem caracterizadas e são expressas predominantemente na superfície das APCs, tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B ativados (FREEMAN et al., 1993). O importante papel desta via de coestimulação na ativação das células T é evidenciado por uma série de experimentos. Em diversos modelos animais de doenças cuja ativação de células T é crítica, o bloqueio de CD80 e CD86 inibiu o desenvolvimento das doenças (YAO et al., 2012). Na figura 2, tem-se um esquema representativo do processo de ativação do Linfócito T e diferenciação do Linfócito B.

Figura 2 - Ativação do Linfócito T e diferenciação do Linfócito B em Plasmócito com posterior secreção de anticorpos.



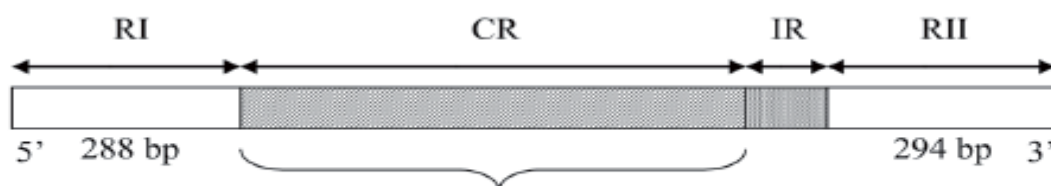
Fonte: Elias et al., 2005 e Rummel et al., 2004, com modificações.

1.4 Proteína Circunsporozoíta (CSP) e as variantes do *P. vivax*

O esporozoítio é a forma infectante do *Plasmodium* que é inoculado a partir da glândula salivar do vetor em seu repasto hematofágico. Por ser a primeira forma a entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro houve interesse dos cientistas em se tentar desenvolver vacinas antimaláricas. Estes

esporozoítos de *P. vivax* estão cobertos por uma proteína denominada circunsporozoita (CSP), que é altamente imunogênica (COPPI et al., 2011). A estrutura desta proteína foi caracterizada em 1985 (ARNOT et al., 1985) e recebeu o nome de proteína circunsporozoítica, de forma abreviada, CSP. O gene CS (Figura 3) possui um domínio central constituído por nucleotídeos repetidos “in tandem” que são flanqueados por duas regiões não repetitivas nas extremidades 3’ e 5’ do gene. Estes dois segmentos se mantêm altamente conservados nas diferentes espécies de plasmódios e são denominados região I (RI) que segue na direção amino-terminal e a região II (RII) a 54 aminoácidos da direção carboxi-terminal da proteína (DE LA CRUZ et al., 1988). A proteína contém 373 aminoácidos e apresenta uma região central de 19 seqüências repetidas constituídas pelo nonapeptídeo Asp-Arg-AlaAsp/Ala-Gly-Gln-Pro-Ala-Gly (DRAD/AGQPAG) (ARNOT et al., 1985).

Figura 3: Estrutura do gene CS de *P. vivax*



Estrutura do gene CS de *P. vivax*, com duas regiões terminais não repetidas altamente conservadas (RI e RII); um domínio central repetido (CR), com um número variável de repetições seqüenciais e, uma região curta de inserção (IR).

Fonte: Qari et al. (1993a).

No gene da CSP há variantes genéticas do domínio de repetição central que são caracterizadas pelos genótipos VK 210, VK 247 e *P-vivax like* (ARNOT et al., 1985). Por meio do diagnóstico molecular do gene CS de *P. vivax*, estudos demonstraram a presença das três variantes em nosso país a partir de amostras dos Estados de Rondônia, Amapá e do Pará, evidenciando que a

variante VK210 pode ser encontrada em infecções simples e em concomitância com as outras duas variantes, enquanto a VK247 e a *P. vivax-like* foram detectadas apenas em infecções mistas (MACHADO e PÓVOA, 2000; MACHADO et al., 2003).

Vários outros estudos foram realizados com o objetivo de avaliar a distribuição global das variantes do *Plasmodium vivax*. O genótipo VK247 foi encontrado em áreas endêmicas na Tailândia (KAIN et al., 1992, 1993a, 1993b), na América do Sul, África (GONZALEZ et al., 2001), México e Afeganistão (RODRIGUEZ et al., 2000). Qari et al. (1993b) mostraram a ampla distribuição da variante *P. vivaxlike* analisando amostras de sangue oriundas de regiões geográficas distantes como Papua Nova Guiné, Brasil, Indonésia e Madagascar. Estudos sorológicos e moleculares têm demonstrado que estes genótipos circulam por todo o país, principalmente na Amazônia brasileira. O genótipo VK210 é o mais comum e o VK247 e *P. vivax-like* tinham sido encontrados apenas em infecções mistas (MACHADO e PÓVOA, 2000; MACHADO et al., 2003). No entanto, uma década após o primeiro estudo genotípico realizado em cinco diferentes estados da Amazônia brasileira, observou-se que o perfil de distribuição mudou pois o genótipo VK247 e *P. vivax-like* também foram detectados em infecções únicas em uma área do Estado do Pará (STORTI-MELO et al., 2009). Além disso, observa-se que, embora o genótipo VK210 seja o mais prevalente no Brasil, evidências revelam uma forte adaptação da variante VK247 no sudeste do Pará, bem como a associação desse genótipo a uma alta parasitemia dos indivíduos infectados, podendo representar um problema de saúde pública, visto o aumento da possibilidade de ressurgimento de epidemias de malária vivax em comunidades susceptíveis (SANTOS et al., 2016).

A diversidade genética que o gene da CSP apresenta tem sido útil em estudos epidemiológicos, pois permite compreender a dinâmica de transmissão da doença, bem como a relação parasito- hospedeiro (SOUZA-NEIRAS, et al., 2010). A avaliação do padrão de distribuição das variantes do gene da CS na fronteira entre o Brasil e a Guiana Francesa mostrou que os mesmos genótipos que circulam na Guiana Francesa são encontrados no município do Oiapoque (Brasil), sugerindo que pode ocorrer dispersão de populações de parasitos entre os dois países (GOMES et al., 2016).

Em pacientes provenientes de área Pré-Amazônica no Estado do Maranhão, Ribeiro e colaboradores (2016) mostraram que polimorfismos no gene da CSP podem influenciar o perfil de citocinas plasmáticas, pois indivíduos infectados pela variante VK247 apresentaram elevada parasitemia e altas concentrações de IL-6, mas não se observou o efeito antiinflamatório da IL-10. Nos indivíduos infectados com o genótipo VK210 estas duas Interleucinas (IL- 6 e IL-10) apresentaram uma correlação positiva e associação com a diminuição na parasitemia. Assim, sugere-se que a variante VK210 induz a produção de citocinas regulatórias, o que aparenta ser um mecanismo de escape do sistema imunológico. Nos pacientes infectados pelo genótipo VK247 observa-se que há um predomínio de citocinas inflamatórias, além de elevada parasitemia, o que resulta em infecções mais graves; de tal modo que os polimorfismos no gene da CSP podem influenciar no desfecho clínico da malária vivax, incluindo a carga parasitária e o equilíbrio de citocinas.

A região repetitiva da CSP também tem sido utilizada para identificar espécies de plasmódios em anofelinos (BRANQUINHO et al., 1993; CURADO et al., 1997). Branquinho e colaboradores (1997) identificaram a presença de anofelinos infectados utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra a CSP de *P. vivax* VK210 e VK247 em áreas remanescentes de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, região não endêmica de malária. Em área endêmica, Marrelli e colaboradores (1998) observaram uma prevalência de 15% de anofelinos infectados testados com anticorpos para *P. vivax-like* e *P. simiovale*, no Estado do Acre. No Pará, Silva e colaboradores (2012) notaram que os *A. Aquasalis* e *A. darlingi* são suscetíveis as variantes VK210 e VK247.

Recentemente, abordagens moleculares e filogenéticas foram integradas para analisar a diversidade da CSP do *P. vivax* e as relações genéticas destes parasitos na Costa do Oceano Pacífico da América Latina, com outros isolados de diferentes áreas endêmicas ao redor do mundo (GONZÁLES-CERON., 2013). Os autores somente investigaram a presença dos genótipos VK210 e VK247, visto o *P. vivax-like* não ser encontrado nestes países, e desta forma mostraram que estes dois genótipos apresentaram uma distribuição geográfica não homogênea entre as áreas investigadas. No sul do México, ambos os genótipos estavam presentes, enquanto que na Nicarágua e no Peru os genótipos VK210 e VK247 foram detectados isolados, respectivamente.

Amostras de parasitos provenientes de cinco vilas na Nicarágua mostram uma menor prevalência, ou não existência, de VK247. Além disso, amostras de *P. vivax* coletadas em diferentes regiões da Guatemala e nos municípios de Honduras apresentaram o genótipo VK210. Da mesma forma, a predominância de infecções simples com o genótipo VK247 numa região da Colômbia, foi similar ao observado em um município da fronteira peruana. Os resultados ainda constataram que nenhuma variação genética foi detectada nas sequências de VK247, por outro lado, observou-se variação genética nos genótipos VK210 em isolados no sul do México e na Nicarágua.

Estes resultados fornecem informações suficientes para permitir uma classificação diferencial de parasitos VK210. Seis diferentes sequências no gene da porção central da CSP do VK210 foram identificadas; quatro no México (VK210 a, b, c e d) e três na Nicarágua (VK210 a, e e f). O Subtipo VK210a foi observado em ambos os países e foi o mais frequente; os subtipos E e F da Nicarágua foram menos frequentes, e poderiam ser variações locais do subtipo VK210a. A melhor resolução foi dada pela sequência de nucleotídeos VK210aI e aII (detectados apenas no México) e subtipo aIII (detectado apenas na Nicarágua). Com a enzima de restrição *Alu I* digeriu-se toda a região repetitiva do gene codificador da CSP, sugerindo a presença de outros genótipos prováveis na região repetitiva de VK210a (SOUZA-NEIRAS et al.,2010).

Além disso, os autores estudaram a filogenia destes parasitos a partir sequências de nucleotídeos de diferentes regiões do gene da CSP em isolados destas mesmas áreas endêmicas. Observou-se uma diversidade genética do gene que se restringe, principalmente, à porção repetitiva da região central e porção terminal 3'. Ressaltou-se que esta variação pode ocorrer devido a mudanças no tipo de nucleotídeos e no número de repetições da porção repetitiva. Mostraram ainda, que estes dados estão em acordo com as informações de Hughes (2004), em que se sugere que o VK247 é provavelmente mais ancestral do que VK210. Além disso, o genótipo VK247 exibe alta identidade na extremidade carboxi terminal com a sequência relatada para com a CSP do *Plasmodium cynomolgi* (Gen Bank AB524342.1). Os autores ressaltam que a possibilidade da porção repetitiva do VK247 ser mais estável do que a do VK210 não pode ser excluída e que a introdução dos

parasitos com genótipos VK247, VK210 b, c e d pode ter ocorrido em momentos diferentes.

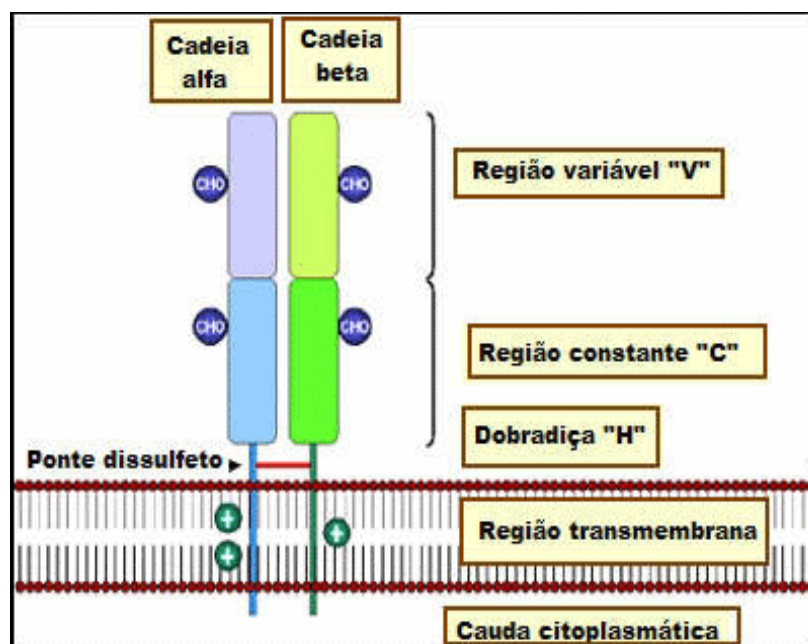
A disponibilidade das sequências do genoma de muitos isolados de *P. vivax* e a análise de haplótipos da estrutura podem auxiliar na distribuição complexa do parasito no Brasil, bem como na relação com a diversidade genética ao redor do mundo. Além disso, Taylor e colaboradores (2013) analisando o DNA mitocondrial de amostras sanguíneas infectadas com o *P. vivax*, propuseram que, ao contrário do que se observa em isolados provenientes da Ásia, onde a migração humana aumenta a diversidade genética local, os efeitos combinados da estrutura geográfica e à baixa incidência de malária vivax nas Américas resultou em padrões de baixa diversidade genética local, mas de proporções elevadas desta diversidade genética em nível regional. Isso poderia explicar as opiniões anteriores que o *P. vivax* nas Américas tem baixa diversidade genética, pois estas informações foram baseadas em estudos realizados em áreas limitadas. Deve-se ressaltar que no Brasil, além da VK210 e a VK247, circula a *P. vivax-like* e que o nível de endemidade do *P. vivax* varia de acordo com a área endêmica. A elucidação do padrão geográfico do complexo *P. vivax* é importante tanto para as avaliações de diversidade de genes que codificam antígenos candidatos a vacinas, bem como na formulação e estruturação de medidas de vigilância que visem o controle da malária.

1.5 Genes Humanos moduladores da Resposta Imunológica

O Receptor de Células T (TCR) é um heterodímero formado por duas cadeias polipeptídicas unidas entre si por pontes dissulfídicas, que na superfície dos linfócitos T, estão ligados a uma molécula sinalizadora, denominada CD3. O TCR é formado por duas cadeias peptídicas (α e β) ou pelas cadeias (γ e σ). Estas cadeias apresentam regiões constantes e variáveis, que atribuem especificidade ao antígeno e se diferenciam entre os clones celulares (LAROCQUE et al., 1996). A especificidade dos TCRs é fornecida, principalmente, pela seleção e rearranjo de segmentos gênicos não contíguos nas regiões variáveis das cadeias alfa e beta ou gama e delta. Os segmentos gênicos das cadeias beta e delta são classificados como variável (V), diversidade (D), junção (J) e constante (C) (WILSON et al., 1988;

WESTWOOD et al., 1998), enquanto que nas cadeias alfa e gama são originadas pela recombinação dos segmentos V, J e C (WESTWOOD et al., 1998). Na figura 4, tem-se um esquema representativo das cadeias peptídicas alfa e beta do TCR bem como suas regiões constantes e variáveis.

Figura 4: Esquema representativo das cadeias peptídicas alfa e beta do TCR bem como suas regiões constantes e variáveis.



Fonte: Disponível em <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter10.htm>. Acesso: Ago. 2016.

Primeiramente, polimorfismos nos genes que codificam as cadeias variáveis podem expressar diferentes números de segmentos gênicos ou mudar a sequência de aminoácidos do produto do gene. Em segundo lugar, as células T podem ser selecionadas ou deletadas no timo dependendo do tipo de TCR que apresentam (MALHOTRA et al., 1992). Além disso, os genes do MHC tem como função atuar na seleção tímica dos linfócitos, induzindo a expressão preferencial de algumas cadeias alfa e beta, fator mais importante na definição do repertório de cadeias variáveis do TCR (LIAO et al., 1989; DAVEY et al., 1991). Por último, a exposição de células T maduras a antígenos externos pode estimular a proliferação de células T que apresentam TCRs utilizando

cadeias alfa ou beta (MALHOTRA et al., 1992). A expressão de cadeias β do TCR tem sido amplamente investigada em diversas doenças em que a atividade imunológica parece exercer um papel importante (CHARMLEY et al., 1993; POSNETT et al., 1994; DE INOCENCIO et al., 1995).

Alguns dos polimorfismos identificados no gene do TCR são observados na cadeia beta. Dentre os polimorfismos encontrados nesta região, os TCRBV20S1 (C/T) e TCRBV3S1 (C/T) têm sido amplamente investigados. Estes parecem afetar significativamente o repertório dos receptores de células T, por modificar a capacidade de desenvolvimento de uma resposta imunológica. (CHARMLEY et al., 1993; POSNETT et al., 1994). Estudos avaliando estes polimorfismos demonstraram que a presença do alelo nulo no segmento gênico do TCRBV20S1 pode estar associada a um aumento de susceptibilidade a Esclerose Sistêmica (BREDEMEIER et al., 2008). Em relação a malária, Carpenter e colaboradores (2009) encontraram uma fraca evidência de associação da região TCRBV3S1 com densidade parasitária em relação a infecções por espécies de *P. falciparum*.

Na malária vivax as citocinas são liberadas depois da ruptura do esquizonte no ciclo eritrocítico (MEDINA et al., 2011). O equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias é necessário para garantir o controle das alterações imunopatológicas, além de determinar os níveis de anemia, carga parasitária, grau de pirexia, gravidade clínica, a evolução da doença e até mesmo, a sobrevida (SOHAIL et al., 2008; JAIN et al., 2010; MEDINA et al., 2011).

A família gênica da Interleucina-1 (IL-1) é composta por 11 membros, sendo as mais estudadas a IL-1 α (IL-1F1), IL-1 β (IL-1F2), IL-1ra (IL-1F3) e IL-18 (IL-1F4) que estão localizados no braço longo do cromossomo 2 humano (DINARELLO, 2009). A principal função da IL-1 é participar de reações pró-inflamatórias em resposta a injúrias teciduais desencadeadas por PAMPS (padrões moleculares associados à patógenos), e por DAMPS (padrões moleculares associados a dano tecidual) (WEBER et al., 2010). As IL-1 α e IL-1 β são produzidas em diferentes condições inflamatórias, tais como infecções, artrite reumatoide, doenças inflamatórias gastrointestinais e patologias cardiovasculares (AREND, 2002; BUJAK; FRANGOGIANNIS, 2009).

As IL-1 (α e β) são produzidas especialmente por monócitos e macrófagos (WEBER et al., 2010) além de células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, neutrófilos, linfócitos, células dendríticas, hepatócitos e células musculares. Suas células-alvo principais são macrófagos, linfócitos, granulócitos e células dendríticas (VICENOVÁ et al., 2009). A IL-1 α é encontrada no interior das células como molécula precursora ativa e exerce um papel importante nos processos inflamatórios, pois estimula a atividade do IFN- γ . Na maioria das vezes, não é observada na circulação ou fluidos corporais. Além do mais, pode estar fixada na superfície de monócitos e linfócitos B, sendo denominada IL-1 α de membrana (DINARELLO, 2009). A IL-1 β é sintetizada primariamente por monócitos, macrófagos teciduais e células dendríticas, bem como por linfócitos B e células NK, sendo considerada a forma predominante da IL-1. Diferentemente da IL-1 α , esta interleucina é sintetizada na forma precursora inativa, ativada e secretada por via não convencional, atuando de forma parácrina ou sistêmica (WEBER et al., 2010). Em síntese, a IL-1 α e IL-1 β induzem a expressão gênica em diversos tipos celulares, agindo como citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2009; WEBER et al., 2010).

Os polimorfismos nos genes *IL1A* (-889 C/T) e *IL1B* (-511 C/T) (rs16944), ambos localizados no braço longo do cromossomo 2, demonstraram associação com o desenvolvimento de periodontite, retinocoroidite toxoplásmica, colite ulcerativa e Lúpus Eritematoso Sistêmico (CARTER et al., 2001; MOREIRA et al. 2005; 2007; KOMATSU et al., 2008; CORDEIRO et al., 2008). Além disso, as variantes alélicas têm sido associadas a uma maior produção destas citocinas (POCIOT et al., 1992; DANIS et al., 1995; HURME; SANTILLA, 1998; CARTER et al., 2001; SMITH; HUMPHRIES, 2009). Um estudo com malária falciparum para o polimorfismo no gene da *IL1B* (-511 C/T) no grupo étnico Fulani, descendentes de africanos, sugeriu que a presença do alelo polimórfico pode influenciar na susceptibilidade a doença (ISRAELSSON et al., 2011). O mesmo SNP também foi associado com anemia em pacientes com malária grave (OUMA et al., 2008).

A interleucina-2 (IL-2) é uma glicoproteína monomérica com aproximadamente 15 KDa de peso molecular. Caracteriza-se como uma citocina pró-inflamatória secretada por células do tipo Th1. Desempenham um

papel central na ativação da célula T e pode também aumentar a atividade citolítica das células *natural killer* (NK) (LENARDO, 1991; SAKAGUCHI et al., 2008). Além disso, a IL-2 contribui para o desenvolvimento de células T reguladoras, regulando a expansão e a apoptose entre as células T ativadas (LENARDO, 1991; D'SOUZA; LEFRANCOIS, 2003). A IL-2 também tem influência nos fenômenos de sobrevivência, de diferenciação (GAFFEN; LIU, 2004), de formação de células de memória imunológica (MALEK; BAYER, 2004) e também atua como regulador negativo da ativação imune (GAFFEN, 2001). Sendo assim, pode-se dizer que esta molécula exerce um papel multifacetário na função imunológica.

Dois polimorfismos, -330 T/G e + 114 T/G, (rs2069762 e rs2069763, respectivamente) foram identificados no gene da *IL2*. O polimorfismo -330 T/G (rs2069762), localizado na região promotora do gene, está relacionado com um aumento da susceptibilidade a doenças inflamatórias e cânceres, incluindo artrite reumatoide e leucemia mieloide (AMIRZARGAR et al., 2005; SHIN et al., 2008; WU et al., 2009), alterando também os níveis da IL-2 (TOGAWA et al., 2005; SHIN et al., 2008; WU et al., 2009), fato este confirmado, visto que a presença do alelo G na posição - 330 do gene esteve correlacionada com uma redução na produção de IL-2 *in vivo* (MATESANZ et al., 2004).

Diversos estudos têm evidenciado a associação entre polimorfismos de genes humanos envolvidos na entrada do parasito no eritrócito e na susceptibilidade a malária vivax. Além disso, associações entre variabilidade em genes codificadores de moléculas envolvidas na resposta imune têm caracterizado alterações no padrão da parasitemia, aspectos clínicos, e também em relação à susceptibilidade a doença (SOHAIL et al., 2008; DRISS et al., 2011).

No Brasil, com relação aos receptores e ligantes do *P. vivax* na invasão eritrocitária tem se observado que indivíduos heterozigotos (FyA/FyB) para o grupo sanguíneo Duffy são mais suscetíveis à malária vivax (CAVASINI et al., 2007; CERAVALO et al., 2010). Além disso, indivíduos Duffy negativos podem se infectar com este protozoário, provavelmente por meio de outros receptores envolvidos no reconhecimento eritrocitário (CAVASINI et al., 2007; MÉNARD et al., 2010). O papel do sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) na resposta imune aos antígenos do *Plasmodium* tem sido amplamente investigado e

diferenças alélicas nestes genes mostraram resultados contraditórios nas diversas áreas endêmicas estudadas, inclusive no Brasil, e parece pouco provável que estes sejam os únicos responsáveis por desvios da resposta imune (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; STORTI-MELO et al., 2012).

A susceptibilidade e resistência para malária podem estar relacionadas à seleção natural, fatores genéticos do hospedeiro e do agente, idade, etnia, e esses por sua vez, envolvidos na resposta imunológica, sintomas e níveis de parasitemia (SILVA-SANTOS et al., 2012; LOKOSSOU et al., 2013).

Em decorrência dos dados obtidos pelo sequenciamento do genoma humano, o conhecimento dos genes envolvidos na resposta imune e a verificação das implicações de sua variabilidade com relação à causa de doenças é uma etapa de interesse, atualmente. Além de genes e alelos envolvidos na patogênese de nosologias, os trabalhos de associação também permitem que sejam determinadas as frequências populacionais destes alelos. Uma vez que polimorfismos genéticos variam entre grupos populacionais, a heterogeneidade de populações brasileiras acrescentará informações relevantes para a compreensão das causas de doenças complexas, como a malária. Esses estudos também contribuem para o conhecimento da evolução e das implicações funcionais do polimorfismo genético. Dessa forma, os resultados desta investigação poderão contribuir na identificação e participação efetiva de genes humanos na modulação da resposta imune com o objetivo de produzir informações para melhor compreender o novo cenário relacionado à malária vivax.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Apronfundar a investigação de polimorfismos genéticos, tanto no parasito como no hospedeiro, que possam influenciar na resposta imune contra o *P. vivax*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas de variantes nos genes *TCR*, *IL1* e *IL2* em amostras de pacientes infectados por *P. vivax*.
- Associar os polimorfismos do gene *TCR*, *IL1* e *IL2* com a densidade parasitária de pacientes infectados por *P. vivax*.
- Detectar os níveis plasmáticos de IL-1 e IL-2 e avaliar se estão relacionados com os polimorfismos investigados e à densidade parasitária na população estudada.
- Avaliar a resposta imunológica de anticorpos contra os peptídeos da CSP e sua relação com as infecções causadas pelas variantes genéticas da CSP de *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*).
- Avaliar se os anticorpos contra a CSP estão associados com os polimorfismos investigados

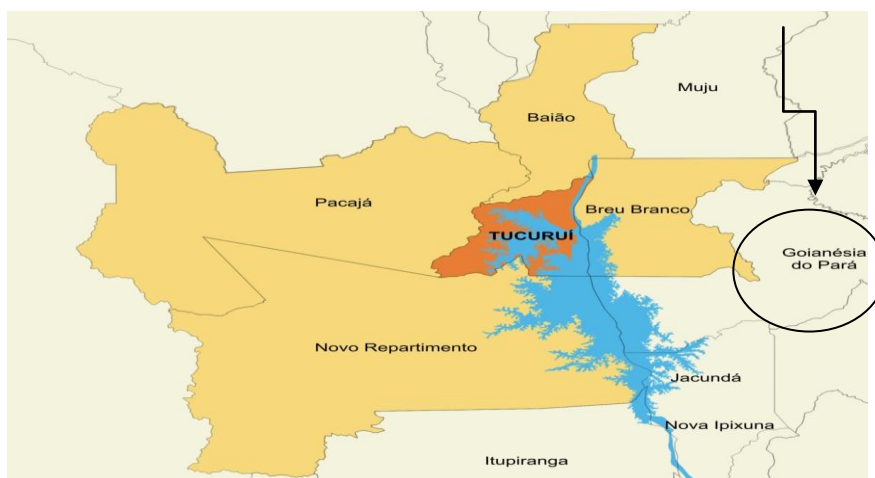
3. METODOLOGIA

3.1 Área de estudo

Foram investigados indivíduos infectados por *P. vivax* provenientes do município de Goianésia do Pará (03°50'33" S; 49°05'49" W), localizado na mesorregião do sudeste paraense e microrregião Paragominas, limitando-se com os municípios de Breu Branco, Novo Repartimento, Dom Eliseu, Ipixuna do Pará, Jacundá e Rondon do Pará (Figura 5). A extensão territorial é de 7.021 Km² e população estimada é de 29.161 habitantes. Sua densidade demográfica é de 4,5 habitantes/Km², e dista da Capital cerca de 350 Km.

Em 2011 e 2012, o número de casos de malária foi de 2.856 e 1.136, respectivamente, sendo a maior parte ocasionada pelo *P. vivax* (79,0%). Em 2011, ocorreram mais de cem casos de malária em todos os meses ao longo do ano, e os maiores números foram registrados em janeiro e agosto (355 e 339, respectivamente). Em 2012 os casos de malária ocorreram de maneira constante ao longo do ano, exceto no primeiro trimestre, em que foram registrados 261, 207 e 137 casos nos meses de janeiro, fevereiro e março, respectivamente. Assim, a escolha da região foi pelo fato deste município estar entre os cinco municípios que concentravam 50% dos casos de malária do Estado do Pará no ano de 2012, período de coleta das amostras sanguíneas.

Figura 5: Esquema Representativo de Goianésia do Pará: área de estudo.



Fonte: SIVEP, 2012. Disponível em: <http://www.goianesiapa.org/planodiretor/plano01.htm>, com modificações. Acesso: Ago. 2016.

3.2 Amostra

Um grupo de 138 amostras previamente avaliadas por Cassiano et. al (2015) coletadas no município de Goianésia do Pará, foram analisados. Destes, foi observado maior frequência de homens e idade média de 29.8 ± 14.1 . Dos 122 indivíduos que souberam relatar já terem contraído malária no passado, apenas 8 indivíduos relataram nunca ter tido episódio prévio de malária. Com os dados de parasitemia disponíveis para 94 amostras, a média geométrica da parasitemia foi 769.3 parasitas/mm³. Estes indivíduos foram entrevistados e registraram-se dados sobre idade, tempo de residência na área endêmica e aquisição prévia de malária (quantidade e tempo decorrido desde a última infecção). As amostras foram coletadas no principal posto de diagnóstico de malária do município de Goianésia do Pará após a confirmação de infecção por *P. vivax*, diagnosticada pela gota espessa e técnicas moleculares, antes dos pacientes iniciarem o tratamento. A papa de hemácias e o soro estavam armazenados em tubos Eppendorf a -70°C. A reutilização destas amostras neste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNESP de número 331.162 em 10 de julho de 2013.

3.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit Easy-DNA (Invitrogen, CA, EUA) com pequenas modificações das especificações do fabricante. Em 280 µL de sangue, foram adicionados 450 µL de solução de lise (Solução A), e a mistura foi homogeneizada em vórtex. Após incubação a 65°C por 6 minutos no bloco térmico, foram adicionados 650 µL de clorofórmio. Realizou-se nova homogeneização em vórtex até a mistura apresentar uma coloração achocolatada. Em seguida adicionaram-se 150 µL de solução de precipitação (Solução B) e homogeneizou-se no vórtex até a mistura ficar homogênea. Realizou-se a centrifugação da amostra a 20.000 g por 10 minutos e transferência do sobrenadante para tubo Eppendorf de 1,5 µL. Foi então adicionado 1 mL de etanol 100% gelado e a mistura foi homogeneizada por inversões suaves e deixada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 20.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi

removido por inversão e adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação a 20.000 g por 2 minutos, o sobrenadante foi removido por inversão e deixou-se o tubo secando em temperatura ambiente antes de ressuspender o DNA em 100 µL de água nuclease free (Invitrogen, CA, EUA). A quantidade e pureza do DNA foram verificadas após eletroforese em gel de Agarose 1,5% ou por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

3.4 Genotipagem do *TCR*

Foram avaliados dois polimorfismos em dois diferentes segmentos gênicos codificadores de cadeias variáveis beta (*TCRBV*) pelo método de PCR-RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*). As reações de PCR foram realizadas no termociclador DNA MasterCycler, Eppendorf, e os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen. Para análise do polimorfismo do *TCRBV20S1(C/T)* foram utilizados os seguintes iniciadores: 5' ATTCATCAATGGCCAGCGAC 3' e 5' GGAGCTTCTTAGAACTCAG 3'. Um mix de reação com volume final de 25µL contendo 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM de MgCl, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer e 1 U de Taq Platinum (Invitrogen) foi preparado. A reação foi desenvolvida em termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Alemanha) como a seguir: um ciclo inicial de 94°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final à 72°C por 10 min. O fragmento resultante foi de 235 bp e foi digerido com a endonuclease de restrição *Kpn I*. Uma substituição de Citosina por Timina leva a formação de um códon interruptor na sequência do segmento gênico *TCRBV20S1* e, simultaneamente, elimina um sítio de restrição desta enzima. (CHARMLEY et al., 1993). Para análise do polimorfismo do *TCRBV3S1(C/T)*, as amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de PCR utilizando os seguintes iniciadores específicos: 5' CCTTGATGGCCTGTTTTTCAC 3' e 5' GTGCCATCGGAGCCAGCAC 3'. Um mix de reação com volume final de 25µL contendo 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM de MgCl, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer e 1 U de Taq Platinum (Invitrogen) foi preparado. A reação foi desenvolvida em termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Alemanha) como a seguir: um ciclo inicial de 94°C

por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final à 72°C por 10 min. O tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foi de 431bp. Estes fragmentos foram digeridos com a endonuclease de restrição *PvuII*. As duas variantes alélicas do TCRBV3S1 diferem somente em um nucleotídeo (C/T) e a transição de Cytosina para Timina gera um sítio para a enzima *Pvu II* dentro do segmento gênico (POSNETT et al., 1994). Para a visualização do produto de PCR para estes SNPs, 5 µL de cada amostra foram aplicados juntamente com 1,5 µL de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol e 40% de sucrose em água destilada) em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Na eletroforese utilizou-se como marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

3.5 Avaliação do Polimorfismo Genético no gene da *IL-1B* (-511C>T)

Para análise do polimorfismo no gene da *IL-1B* (-511C>T) (rs16944), as amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de PCR-RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*). As reações de PCR foram realizadas no termociclador DNA MasterCycler, Eppendorf, e os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen. Foram utilizados iniciadores específicos descritos por Cantagrel e seus colaboradores em 1999. Um mix de reação com volume final de 25µL contendo 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM de MgCl, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer e 1 U de Taq Platinum (Invitrogen) foi preparado. A reação foi desenvolvida em termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Alemanha) como a seguir: um ciclo inicial de 94°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final à 72°C por 10 min. O tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foram de aproximadamente 305 bp, que foram digeridos com a endonuclease de restrição *Eco 881*. A visualização do produto de PCR para este SNP consistiu na aplicação de 5 µL de cada amostra juntamente com 1,5 µL de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol e 40% de sucrose em água destilada) em gel de agarose 1,5%,

corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Na eletroforese utilizou-se como marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

3.6 Genotipagem do SNP -330 T/G e + 114 T/G no gene da *IL-2*

A determinação do SNP + 114T/G (rs2069763) foi efetuada pelo método PCR-RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*). As reações foram realizadas no termociclador DNA MasterCycler, Eppendorf, e os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen, conforme descrito por Song et al. (2012). Para a genotipagem deste SNP foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 5' ATGTACAGGATGCAACTCCT 3' e 5' TGGTGAGTTTGGGATTCTTG 3'. Um mix de reação com volume final de 25 µL contendo 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM de MgCl, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer e 1 U de Taq Platinum (Invitrogen) foi preparado. A reação foi desenvolvida em termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Alemanha) como a seguir: um ciclo inicial de 94°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final à 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram digeridos por 3 h a uma temperatura de 37° C com a enzima de restrição *MwoI* (New EnglandBioLabs). Os produtos da digestão (5 µL de cada amostra juntamente com 1,5 µL de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol e 40% de sucrose em água destilada) foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Na eletroforese utilizou-se como marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

A determinação do SNP -330 T/G (rs2069762) foi realizada pelo método de PCR Alelo-específico (PCR-CTPP), segundo protocolo descrito por Togawa et al. (2005). Para a genotipagem deste SNP foram utilizados os seguintes

oligonucleotídeos iniciadores para o alelo G: F1: 5'CTG ACA TGT AAG AAG CAA TCT AT 3' e R1: 5'-CTC AGA AAA TTT TCT TTG TCC 3'. Os fragmentos resultantes para o genótipo GG foram de 215 bp. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para determinação do alelo T foram: F2: 5'TTC ACA TGT TCA GTG TAG TTT TAT 3' e R2: 5'TGT TAC ATT AGC CCA CAC TTA 3'. Os fragmentos resultantes para o genótipo TT foi de 152 bp. A visualização do produto de PCR para este SNP consistiu na aplicação de 5 µL de cada amostra juntamente com 1,5 µL de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol e 40% de sucrose em água destilada) em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Na eletroforese utilizou-se como marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

3.7 Ensaio de Citocinas

As citocinas foram dosadas no soro previamente separado, com único descongelamento. Os níveis de IL1-alfa, IL1-beta e IL-2 foram avaliados por citometria de fluxo (CBA), segundo protocolo descrito por Walther et al. (2006). Os reagentes utilizados foram provenientes do kit para citocinas humanas (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Foram analisados 50 µL da amostra por Citômetro de Fluxo do tipo FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, CA, EUA), previamente calibrado com "setup beads," incubadas com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou Ficoeritrina (PE), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma curva padrão foi realizada para cada citocina e analisadas pelo FACSDiva Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram analisados utilizando o FCAP Array 3.0 software (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para cada citocina foram quantificados os valores brutos de MFI (Media de Intensidade de Fluorescência). Os valores foram expressos em pg / mL para cada citocina em comparação com a curva padrão. As dosagens foram realizadas em duplicata, e a média aritmética dos dois valores foi utilizada para as análises. Esta análise

foi realizada em outubro de 2016 no Laboratório de Imunogenética de Malária no Instituto Evandro Chagas/SVS/MS no Pará.

3.8. Amplificação do fragmento do gene da CSP de *Plasmodium vivax* pelo método de PCR- RFLP

As variantes da CSP do *P. vivax* foram analisadas pelo o método de PCR- RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*). O DNA plasmodial foi extraído de uma alíquota de eritrócitos utilizando o Easy-DNA™ Kit (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. A amplificação foi realizada seguindo o descrito por Cassiano et al. (2011) com modificações. Um mix de reação com volume final de 25µL contendo: DNA de *P. vivax*, 1 X PCR buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM de MgCl, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer (5' AGGCAGAGGACTTGGTGAGA 3' e 5'CCACAGGTTACACTGCATGG 3') e 1 U de Taq Platinum (Invitrogen) foi preparado. A reação foi desenvolvida em termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Alemanha) como a seguir: um ciclo inicial de 94°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final à 72°C por 10 min. Como controle positivo, foram utilizados três plasmídeos contendo uma inserção do gene da porção repetitiva da CSP amplificado a partir das variantes de *P. vivax* VK210, VK247 e *P.vivax-like* (BlueScript, Stratagene, La Jolla, USA). Para controle negativo de reação foi utilizado água estéril. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo: 10 U de AluI (Invitrogen), 2µL do tampão de reação da enzima, 10 µL do produto de PCR e 7 µL de água esterilizada e livre de DNase. As reações ocorreram em banho-maria à 37°C, *overnight*.

3.9 Avaliação da resposta sorológica contra CSP de *P. vivax*

Anticorpos anti-CSP foram detectados utilizando peptídeos sintéticos correspondentes ao epítipo imunodominante das regiões repetitivas do gene da CSP de *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) como descrito por (Cochrane et al., 1990). Resumidamente, as placas ELISA foram incubadas

“over-night” a uma temperatura de 4 ° C com antígenos nas concentrações de 1 g / mL para a variante VK210 e 5 g / mL para as variantes VK247 e *P. vivax-like*. Após o período de incubação, foram saturadas com BSA (Sigma-Albrich, EUA). Os soros foram diluídos na proporção de 1/100 em PBS-T 2,5% BSA e aplicados na placa de 96 poços (Corning, Nova York, EUA) em duplicata. Após lavagem, 100 microlitros de conjugado IgG anti-humano marcado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados em cada poço da placa. As placas foram incubadas à 37°C por 1 hora. Após uma segunda lavagem, 100 microlitros de substrato [orto-fenilenodiamina e peróxido de Hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha)] foram adicionados em cada poço da placa e novamente incubados à 37°C por 1 hora. A reação foi interrompida com 100 microlitros de solução de H₂SO₄ a 1%.

Foram utilizados soros de 25 amostras controles (não maláricos) do Rio de Janeiro como controle negativo do ensaio. O valor ponto de corte (*cutoff*) foi determinado como a média da densidade ótica (DO) + três desvios padrão das amostras controles (valores do ponto de corte: VK210 = 0,073; VK247 = 0,060; *P. vivax-like* = 0,070). Para padronizar os dados DO obtidos em diferentes experimentos, foi calculado um índice DO para cada determinação de imunoglobulina como razão dos valores observados de DO / ponto de corte. As amostras com índice de DO > 1,0 foram consideradas positivas.

3.10 Análise estatística dos dados

As frequências genotípicas, alélicas e de indivíduos portadores de cada alelo foram estimadas por contagem direta. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado utilizando o programa Bioestat v.5.3. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R v 3.0.0. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPadPrism 5.01. Para as análises univariadas, diferenças nas proporções foram aferidas pelo teste do Chi quadrado e as diferenças nas medianas foram testadas por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney U-test. As medidas de correlação foram realizadas utilizando o coeficiente de Spearman. As análises de associação envolvendo os SNPs foram realizadas utilizando o SNPAssoc R package (GONZALEZ et al., 2003). Os SNPs foram

testados seguindo diferentes modelos genéticos (co-dominante, dominante ou recessivo) em modelos de regressão logística multivariada, utilizando covariáveis tais como idade, gênero e histórico de malária. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. População de Estudo

Um *subset* ($n = 138$) da amostra previamente analisada em Cassiano et al. (2015) foi empregado nesse estudo. Destes, foi observado maior frequência de homens (71%) e idade média de 29.8 ± 14.1 . Dos 122 indivíduos que souberam relatar já terem contraído malária no passado, apenas 8 indivíduos relataram nunca ter tido episódio prévio de malária. Com os dados de parasitemia disponíveis para 94 amostras, a média geométrica da parasitemia foi 769.3 parasitas/mm³ (95% CI: 494.3 – 1197.4).

4.2 Frequências alélicas e genotípicas de variantes nos genes *TCR*, *IL-1* e *IL-2* em amostras de pacientes infectados por *P. vivax*.

4.2.1 Frequência alélica e genotípica dos segmentos gênicos do *TCRBV3S1* e do *TCRBV20S1*

Foram avaliados dois polimorfismos em dois diferentes segmentos gênicos codificadores de cadeias variáveis beta (TCRBV) em 86 amostras indivíduos infectados com *Plasmodium vivax*. Para análise do polimorfismo do *TCRBV3S1*(C/T), o tamanho do fragmento resultante da amplificação foi de 431bp que foi digerido com a endonuclease de restrição *PvuII*. Indivíduos homozigotos para o alelo selvagem foram identificados pela presença de um único fragmento de 431 bp, refletindo assim, a ausência do sítio de restrição. Porém, indivíduos homozigotos para o outro mutante foram identificados pela presença de um fragmento de aproximadamente 352 bp e os heterozigotos foram identificados pela presença de dois fragmentos de 352 e 431bp, respectivamente. Para análise do polimorfismo do *TCRBV20S1*(C/T) o fragmento resultante foi de 235 bp e este, foi digerido com a endonuclease de restrição *Kpn I*. Sendo assim, indivíduos

homozigotos para o alelo mutante foram identificados pela presença de um único fragmento de 235 bp quando o produto da PCR foi digerido com esta mesma endonuclease de restrição. No entanto, o DNA dos homozigotos para o alelo selvagem foi identificado pela presença de dois fragmentos de 100 e 135 bp e os indivíduos heterozigotos apresentaram três fragmentos cujos tamanhos foram de 100, 135 e 235 bp.

Para o polimorfismo no segmento gênico do *TCRBV20S1*, o genótipo mais frequente foi o CC (53,7%) e o alelo mais frequente foi o C (88,3%). Para o polimorfismo no segmento gênico do *TCRBV3S1* o genótipo mais frequente foi o TC (46,3%) e o alelo mais frequente foi o C (82,5%). Ambos os genes se encontram em equilíbrio de Hardy e Weinberg. A parasitemia variou de 15 a 70.000, com mediana de 1.500 parasitos por microlitro de sangue. Não houve diferença na parasitemia em relação aos genótipos de *TCRBV20S1* ($p = 0,63$) e de *TCRBV3S1* ($p = 0,10$). As frequências genotípicas associadas com a parasitemia são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência dos polimorfismos em *TCRBV3S1* e *TCRBV20S1* e associação com a parasitemia.

Polimorfismo	Frequência	Parasitemia	Valor de p
<i>TCRBV3S1</i>			0.10
CC	35,4	2000	
CT	46,3	1500	
TT	18,3	1000	
<i>TCRBV20S1</i>			0.63
CC	53,7	1500	
CT	35,3	2000	
TT	11,0	3000	

4.2.2 Frequência alélica e genotípica do gene da *IL1B*

Para análise do polimorfismo no gene da *IL1B* (-511T/C) (rs16944), foram analisadas 86 amostras de DNA de indivíduos infectados por *P. vivax*. O tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foram de aproximadamente 305 bp. Estes foram digeridos com a endonuclease de restrição *Eco 881* e visualizados em gel de agarose 1,5%. A presença do alelo T foi identificado por um fragmento de 305 bp e o alelo C pela presença dos fragmentos de 115 e 190 bp. O genótipo mais frequente foi o TC (62,8%), seguido do TT (24,4%) e o menos frequente foi o CC (12,8%). O alelo mais frequente foi o T (86,0%).

4.2.3 Frequência alélica e genotípica do gene da *IL2*

A determinação do SNP + 114T/G (rs2069763) foi efetuada pelo método PCR-RFLP com 86 amostras de DNA de pacientes infectados por *P. vivax*. Os fragmentos resultantes para o genótipo GG foram de 111 e 151 bp, enquanto que para o genótipo TT foram de 262 bp e o heterozigoto apresentou os fragmentos de 111,151 e 262 pb. O genótipo mais freqüente foi o TG (54,1%), seguido do GG (41,2%). O menos frequente foi o TT (4,7%). O alelo mais frequente foi G (95,3%).

A determinação do SNP -330 T/G (rs2069762) foi realizada por PCR Alelo-específico (PCR-CTPP) com 86 amostras de DNA de pacientes infectados por *P. vivax*. Os fragmentos resultantes para o genótipo GG foram de 215 bp. Os fragmentos resultantes para o genótipo TT foram de 152 bp. O genótipo mais frequente foi TT (60,46%), seguido do TG (36,04%) e o menos frequente foi o GG (3,50%). O alelo mais frequente foi o T (96,5%).

4.3 Associações entre os polimorfismos do gene *TCR*, *IL-1beta* e *IL-2* e a densidade parasitária de pacientes infectados por *P. vivax*

A associação entre variabilidade de genes codificadores de moléculas envolvidas na resposta imune tem caracterizado alterações no padrão da parasitemia, aspectos clínicos e também em relação à susceptibilidade a doença. De acordo com quadro 1 abaixo, pode-se observar que a associação dos SNPs estudados com a densidade parasitária do indivíduo infectado pelo

P. vivax não resultou em valores significativos nos modelos genéticos avaliados.

Quadro 1: Associação dos SNPs com a Parasitemia dos indivíduos analisados infectados por *P. vivax*.

Gene	SNP	Frequência	HWE	Parasitemia	Valor de p
<i>TCRBV</i>	20S1		0.27		0.52
	CC	54.2		3,682	
	CT	34.9		2,731	
	TT	10.9		2,900	
<i>TCRBV</i>	3S1		0.65		0.19
	CC	36.1		5,332	
	CT	45.8		2,203	
	TT	18.1		1,932	
<i>IL2</i>	-330T>G		0.75		0.81
	TT	60.3		2,493	
	TG	36.1		4,651	
	GG	3.6		2,770	
<i>IL2</i>	+114G>T		0.04		0.59
	GG	41.2		2,691	

	<i>GT</i>	54.1		3,760	
	<i>TT</i>	4.7		3,275	
<i>IL1B</i>	<i>-511C>T</i>		0.04		0.70
	<i>CC</i>	14.5		2,635	
	<i>CT</i>	61.2		3,953	
	<i>TT</i>	24.2		1,792	

HWE – em português: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado utilizando o programa Bioestat v.5.3. Os SNPs foram testados seguindo diferentes modelos genéticos (co-dominante, dominante ou recessivo) em modelos de regressão logística multivariada. Valores de *p* menores do que 0,05 foram considerados significantes.

4.4 Genotipagem da CSP

Das 138 amostras do estudo, o gene da CSP do *P. vivax* foi amplificado com sucesso em 131 amostras (94.9%). Infecções contendo apenas a variante VK247 foram as mais comuns (45.8%), seguida por infecções simples com a variante VK210 (36.6%) e infecções mistas contendo as variantes VK210 e VK247 (13.7%). A variante *P. vivax-like* foi detectada isoladamente em apenas uma amostra e quatro amostras apresentaram infecções mistas com as três variantes. Não houve diferença significativa na parasitemia entre infecções contendo a variante VK210 (média geométrica = 460.2 parasitas/mm³, 95% CI: 224.3 – 903.6) e a variante VK247 (média geométrica = 965.9 parasitas/mm³, 95% CI: 562.9 – 1657.6) (*p* = 0.20, Mann-Whitney test).

4.5 Reconhecimento de anticorpos de variantes de PvCSP

Dos 133 indivíduos infectados com *P. vivax* 28.2% apresentaram anticorpos específicos para pelo menos uma das variantes de CSP. A frequência de respondedores para as variantes VK210, VK247 e *P. vivax-like* foi de 22.6%, 8.3% e 12.0%, respectivamente (Figura 6A). A prevalência e o

índice de reatividade dos anticorpos para CSP foi maior para a variante VK210 quando comparada a VK247 ($p = 0.001$). Em relação a magnitude (RI) da resposta de IgG, observa-se maiores níveis para a variante VK210 (mediana = 0.60; IQ: 0.43 – 0.87) comparado as variantes VK247 (0.39; IQ: 0.30 – 0.52) e *P. vivax*-like (0.43; IQ: 0.36 – 0.62) ($p < 0.0001$) (Figura 6B). Houve significativa correlação entre os níveis de anticorpos IgG para as três variantes (Figura 6C-6E). Nós testamos se as variáveis demográficas (gênero, idade, episódio prévio de malária e tempo de residência em Goianésia do Pará) poderiam influenciar na resposta de anticorpos contra a PvCSP, e a única associação significativa foi maior proporção de mulheres entre os indivíduos com anticorpos para a variante *P. vivax*-like ($p = 0.02$).

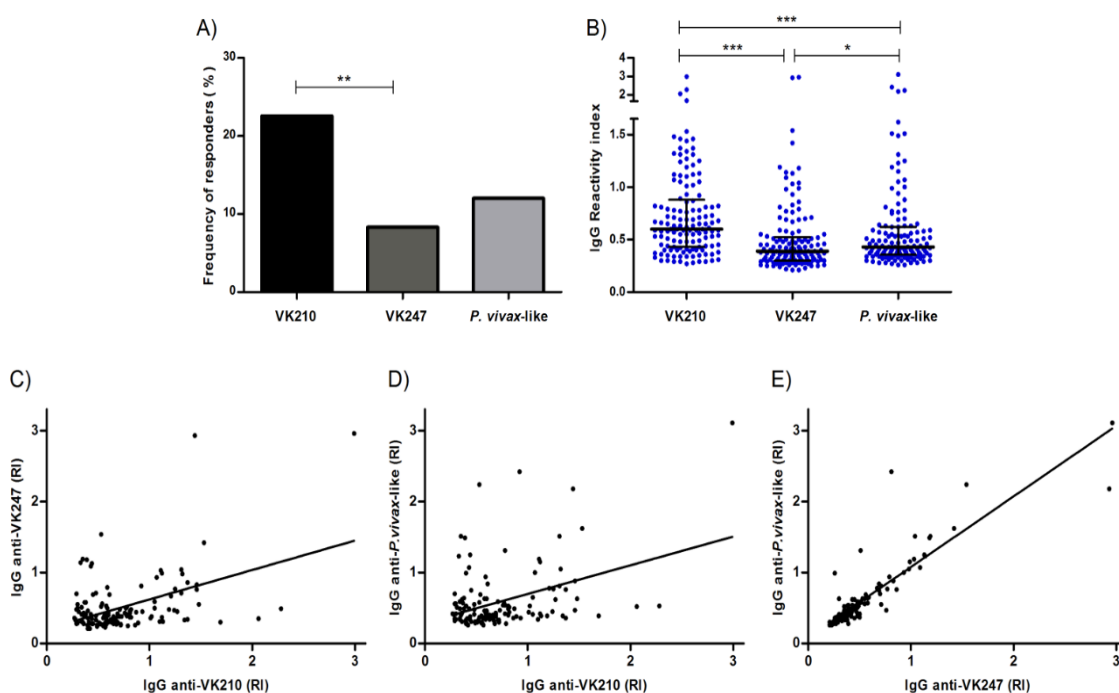


Figura 6. Anticorpos IgG adquiridos naturalmente contra variantes de PvCSP. A) Frequência de respondedores IgG contra as três variantes da PvCSP. B) Diferenças nos níveis de anticorpos (RI) IgG para as três variantes da PvCSP (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$). C) Correlação de Spearman significativa entre os níveis de anticorpos específicos contra a variante VK210 e VK247 ($r = 0.236$, $p = 0.006$); D) VK210 e *P. vivax*-like ($r = 0.221$, $p = 0.01$) e; E) VK247 e *P. vivax*-like ($r = 0.874$, $p < 0.0001$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.6 Influência dos genótipos da CSP na produção de anticorpos

Não houve diferença significativa na resposta de anticorpos de acordo com a variante da CSP presente no momento da infecção. A frequência de respondedores para a VK210 foi semelhante entre os indivíduos infectados com a variante VK210 comparado aos indivíduos que não estavam infectados com a VK210 (24.3% vs 19.7%, $p = 0.67$). A presença da variante VK247 no momento da coleta também não aumentou a frequência de respondedores para a VK247 (8.5% vs 8.2%, $p = 1.0$). Além disso, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos contra as proteínas da CSP utilizadas de acordo com a variante presente na infecção (VK210 e VK247) (Figura 7). Como apenas uma amostra apresentava infecção simples com a variante *P. vivax*-like, maiores análises não foram realizadas com esta variante.

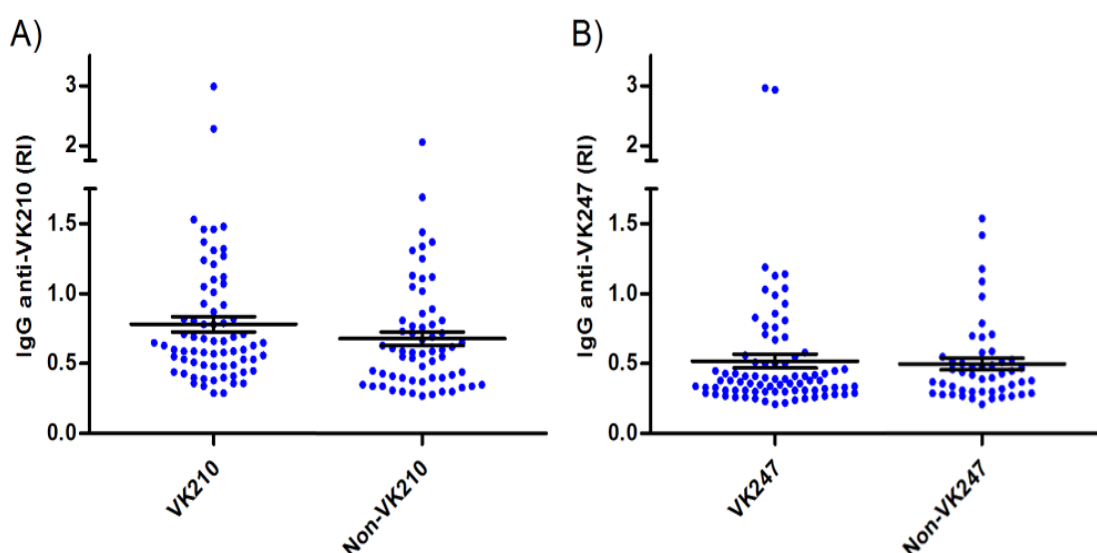


Figura 7. Níveis de anticorpos anti-CSP em relação a presença das variantes na infecção. A) Níveis de anticorpos anti-VK210 de acordo com a presença ou não da variante VK210 na infecção ($p = 0.1$). B) Níveis de anticorpos anti-VK247 de acordo com a presença ou não da variante VK247 na infecção ($p = 0.57$).

4.7 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e suas associações com a resposta de anticorpos

SNPs nos genes *IL2* (rs2069762 e rs2069763), *IL1B* (rs16944) e em dois diferentes segmentos gênicos codificadores de cadeias variáveis beta

(TCRBV3S1 e TCRBV20S1) foram genotipados em 77 amostras. As frequências genótípicas estão apresentadas na Tabela 1. HWE não foi observado apenas para o SNP rs16944 ($p = 0.02$). Os SNPs foram avaliados em relação aos níveis de anticorpos contra a CSP (Tabela 2). Diferenças significativas foram observadas entre o SNP no gene *IL1B* rs16944 com níveis de anticorpos contra as variantes VK247 e *P. vivax*-like. Indivíduos carregando o genótipo CC apresentaram maiores níveis de anticorpos contra a VK247 comparado aos indivíduos CT + TT (0.77 vs 0.47, $p = 0.003$). Além disso, foi observado que indivíduos com o genótipo CC também possuíam mais anticorpos contra a *P. vivax*-like (0.94 vs 0.55, $p = 0.001$).

Tabela 2. Frequência dos polimorfismos e associação com níveis de anticorpos contra as variantes da CSP

Gene	SNP	n (%)	VK210		VK247		<i>P. vivax</i> -like	
				p^a	Negativo	p^a	Negativo	p^a
<i>IL1B</i>	rs16944			0.14		0.005		0.005
	C/C	12 (15.6)	0.66 ± 0.71		0.77 ± 0.76		0.95 ± 0.86	
	C/T	49 (63.6)	0.59 ± 0.29		0.44 ± 0.21		0.53 ± 0.36	
	T/T	16 (20.8)	0.94 ± 0.53		0.56 ± 0.29		0.64 ± 0.34	
<i>IL2</i>	rs2069762			0.54		0.25		0.07
	G/G	3 (3.9)	0.62 ± 0.36		0.37 ± 0.01		0.44 ± 0.03	
	G/T	27 (35.1)	0.81 ± 0.64		0.59 ± 0.53		0.74 ± 0.68	
	T/T	47 (61.0)	0.60 ± 0.30		0.48 ± 0.27		0.55 ± 0.34	
<i>IL2</i>	rs2069763			0.31		0.93		0.99
	G/G	32 (42.1)	0.63 ± 0.52		0.51 ± 0.47		0.61 ± 0.58	
	G/T	40 (52.6)	0.69 ± 0.40		0.52 ± 0.31		0.60 ± 0.41	
	T/T	4 (5.3)	0.84 ± 0.52		0.58 ± 0.33		0.83 ± 0.44	

<i>TCRBV</i>	<i>TCRBV3S1</i>		0.20	0.46	0.45
	<i>C/C</i>	29 (37.7)	0.78 ± 0.57	0.56 ± 0.51	0.64 ± 0.54
	<i>C/T</i>	34 (44.1)	0.66 ± 0.42	0.52 ± 0.31	0.65 ± 0.52
	<i>T/T</i>	14 (18.2)	0.50 ± 0.12	0.41 ± 0.16	0.47 ± 0.20
<i>TCRBV</i>	<i>TCRBV20S1</i>		0.11	0.45	0.49
	<i>C/C</i>	42 (54.5)	0.58 ± 0.31	0.53 ± 0.30	0.67 ± 0.49
	<i>C/T</i>	26 (33.8)	0.79 ± 0.62	0.54 ± 0.52	0.58 ± 0.54
	<i>T/T</i>	9 (11.7)	0.77 ± 0.42	0.40 ± 0.21	0.47 ± 0.22

^ap – Valores baseados em modelos de regressão logística ajustados em relação ao sexo, à idade e à infecção prévia de malária.

4.8 Perfil de Citocinas

Os níveis plasmáticos das citocinas IL1 α , IL1 β e IL2 foram mensurados em 79 pacientes infectados com *P. vivax* e 21 indivíduos saudáveis residentes em Goianésia do Pará. Os níveis de IL1 β foram significativamente maiores nos pacientes com malária vivax comparado aos indivíduos saudáveis ($p < 0.001$). Esta citocina não foi detectada em nenhum indivíduo saudável, enquanto que 24 pacientes alcançaram ou excederam o limite de detecção (mediana de 10.73 pg/mL; IQR: 4.41 – 28.32). Por outro lado, os níveis de IL2 foram significativamente maiores nos indivíduos saudáveis comparado aos pacientes ($p = 0.004$). Não houve diferença significativa entre os níveis de IL1 α entre os pacientes e indivíduos saudáveis (Figura 8).

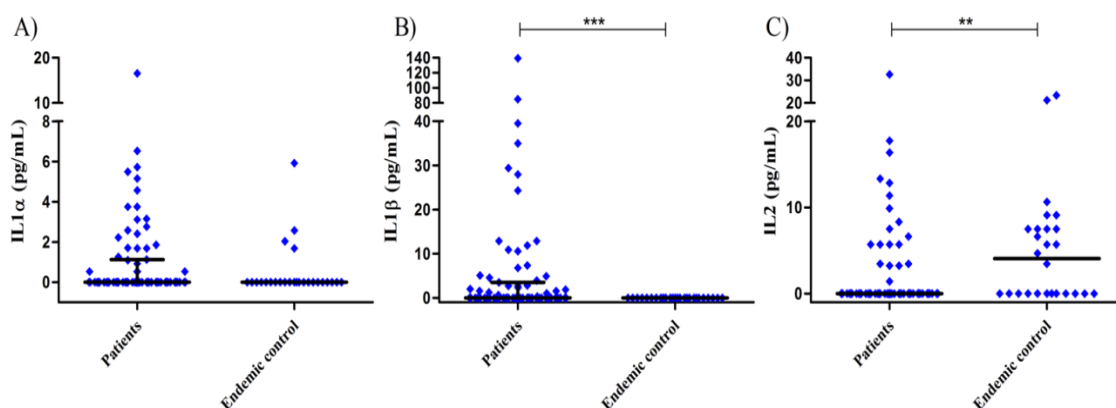


Figura 8. Perfil de citocinas no soro de pacientes infectados com *P. vivax* versus controles endêmicos. A análise inclui IL1α (A), IL1β (B) e IL2 (C). As citocinas foram dosadas por CBA. As barras representam a mediana do grupo e intervalo interquartil. Os valores de P foram determinados por testes não paramétricos de Mann-Whitney U (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.9 Correlação entre os níveis de Interleucinas com parasitemia e anticorpos contra as variantes da CSP

Houve uma fraca correlação positiva entre os níveis de IL1α e IL1β (Spearman's rho = 0.236, $p = 0.03$). Não houve correlação significativa entre os níveis de IL1α e IL2 (Spearman's rho = 0.149, $p = 0.19$) e entre IL1β e IL2 (Spearman's rho = 0.128, $p = 0.26$) (Figura 9). Também não foram observadas correlações significativas entre os níveis das interleucinas com a parasitemia e os níveis de anticorpos contra as variantes da CSP (Tabela 3).

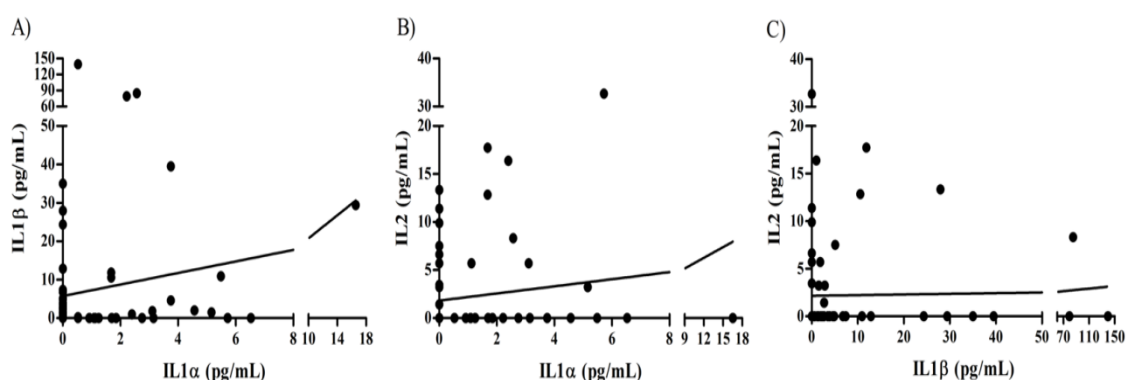


Figura 9. Correlação entre os níveis de IL1α e IL1β (A); IL1α e IL2 (B) e; IL1β e IL2 (C).

Tabela 3. Correlação entre os níveis de citocina com parasitemia e anticorpos contra a CSP

Variável	Parasitemia	VK210	VK247	<i>P. vivax</i> -like
IL1α	0,058; (0,61)*	0,177; (0,13)*	-0,009; (0,93)*	0,025; (0,83)*
IL1β	0,039; (0,73)*	0,034; (0,77)*	-0,143; (0,22)*	-0,156; (0,18)*
IL2	0,068; (0,55)*	-0,171; (0,14)*	0,067; (0,57)*	0,091; (0,44)*

Spearman's rho, valor de p()*

4.10 Influência das variantes da CSP nos níveis de citocinas

As variantes da CSP não influenciaram os níveis plasmáticos das citocinas. Conforme demonstrado na Figura 10, não houve diferença significativa nos níveis de IL1 α ($p = 0.48$), IL1 β ($p = 0.89$) e IL2 ($p = 0.07$) entre infecções contendo a variante VK210 ou a variante VK247.

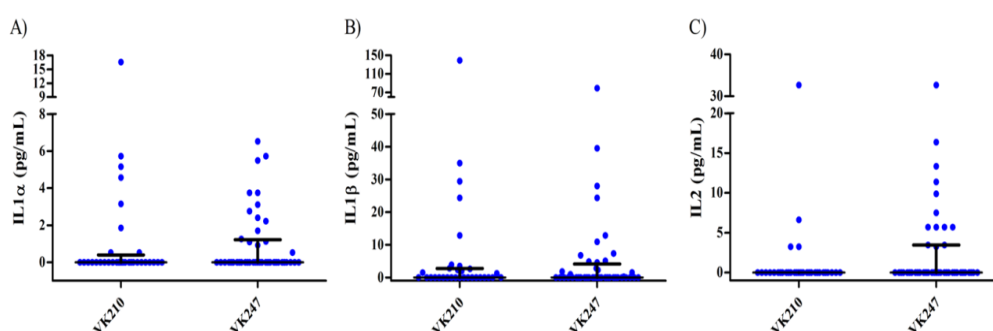


Figura 10. Perfil de citocinas entre infecções contendo as variantes VK210 e VK247. As citocinas foram medidas por CBA. As barras representam uma mediana do grupo e intervalo interquartil. Os valores de P foram determinados por testes não paramétricos de Mann-Whitney U (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.11 Associação dos polimorfismos nos genes *IL1B* e *IL2* com seus produtos

Independente do modelo genético testado (co-dominante, recessivo ou dominante), não foram observadas associações significativas entre o SNP rs16944 no gene *IL1B* com os níveis de IL1 β , e entre os SNPs rs2069762 e rs2069763 no gene *IL2* com os níveis de IL2 (Figura 11).

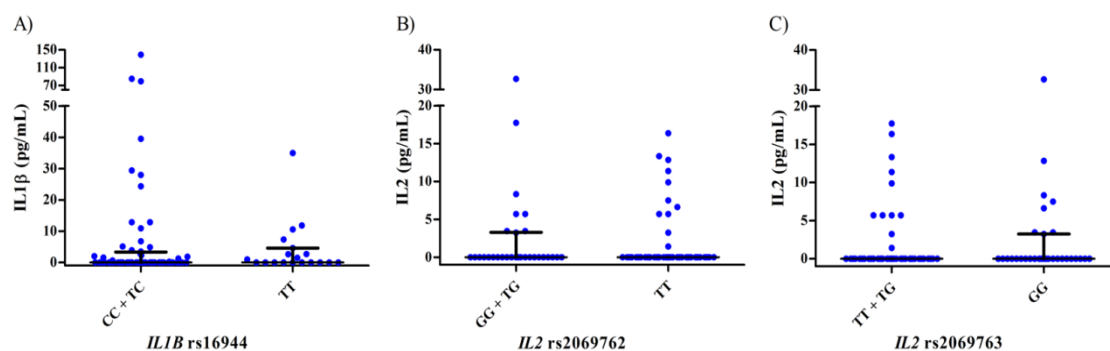


Figura 11. Associação entre os SNPs *IL1B* rs16944 (A), *IL2* rs2069762 (B) e *IL2* rs2069763 (C) com seus produtos gênicos. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil. Não houve diferença significativa utilizando diferentes modelos genéticos.

5. DISCUSSÃO

O TCR e as citocinas possuem um papel chave na modulação imunológica na malária, em estudos com humanos e modelos murinos participando no controle da parasitemia e na fisiopatogenia da doença, dependendo de seus níveis celulares e circulantes (LOKOSSU, et al., 2013). Os dados disponíveis na literatura são restritos, a maioria relacionado a artrite reumatoide, câncer e outras doenças autoimunes. Com os genes estudados neste trabalho, *TCR*, *IL-1* e *IL-2*, as investigações são muito mais escassas, principalmente com doenças infecto-parasitárias; há relatos de associações positivas com TCR e diabetes tipo 1 (FERJENI et al., 2015), *IL-2* e IFN-gama em indivíduos com lúpus eritematoso (HARSINI et al., 2016), *IL-2* e câncer (WANG et al., 2015) e *IL-1* com pneumonia (BAYGOZINA et al., 2015).

Relacionado à malária, os casos de associação significantes entre os níveis de anticorpos e SNPs em citocinas, em geral foram descritos para *Plasmodium falciparum* e em populações africanas e asiáticas (LOUGHLAND et al., 2016; DRISS et al., 2011). No Brasil, os dados disponíveis são restritos e estão relacionados com o *P. vivax*. Resultados contraditórios são apresentados à avaliação do polimorfismo de HLA (Antígeno Leucocitário Humano) (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; STORTI-MELO et al., 2012; LIMA-JUNIOR; PRATT-RICCIO, 2016; D'ALMEIDA et al., 2016) e moléculas coestimulatórias do sistema imune (MEDINA et al., 2011; SORTICA et al., 2012; TOMAZ et al., 2015; CASSIANO et al., 2016a, CASSIANO et al., 2016b). Primeiramente, discutimos a frequência alélica e genotípica de cinco SNPs em três genes de moléculas envolvidas na resposta imune, ainda não investigados no Brasil, e correlacionamos com a parasitemia de indivíduos naturalmente infectados com o *P. vivax* em área endêmica da Amazônia brasileira.

A avaliação dos polimorfismos no segmento gênico do TCR tem sido descrita, principalmente, com doenças autoimunes e/ou genéticas, tais como lúpus eritematoso, esclerose múltipla, e artrite reumatoide (MARGUERIE et al., 1992; CHARMLEY et al., 1994; HUANG et al., 1995; HOCKERTZ et al., 1998). Nossos resultados revelam que o genótipo e o alelo mais frequente para o

segmento gênico *TCRBV3S1(C/T)* foi o TC (46,3%) e o alelo foi o C (82,5%) e, para o segmento *TCRBV20S1(C/T)*, o genótipo mais frequente foi o CC (53,7%) e o alelo mais frequente foi o C (88,3%). Dados semelhantes foram observados por Bredemeier e colaboradores (2008) ao avaliar estes mesmos SNPs em uma população brasileira, geograficamente diferente na esclerose sistêmica. Por outro lado, Dresch e colaboradores (2002) também analisaram o segmento gênico *TCRBV3S1* em dois grupos étnicos diferentes (negros e caucasóides) e os dados indicaram diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas para os dois grupos étnicos analisados, sugerindo que para correlacionar o receptor de células T (TCR) com o desenvolvimento de uma determinada doença deve-se levar em conta a origem étnica da população estudada.

A associação entre variabilidade de genes codificadores de moléculas envolvidas na resposta imune tem caracterizado alterações na carga de microrganismo, aspectos clínicos, e também em relação à susceptibilidade a doença (DRISS et al., 2011). Com relação aos aspectos relacionados a risco de desenvolvimento da doença e alteração na fisiopatogenia da malária, Bredemeier, (2008) avaliando SNPs nos segmentos gênicos do *TCRBV* na esclerose sistêmica, sugeriu que a presença do alelo nulo no segmento *TCRBV20S1* e do alelo C no segmento *TCRBV3S1* podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento da esclerose sistêmica.

No presente estudo, avaliamos o polimorfismo no gene da *IL-1B* (-511C>T) e demonstramos que o genótipo mais frequente foi o TC (62,8%) e o alelo foi o T (86,0%), resultado semelhante ao encontrado por Israelsson e colaboradores (2011), analisando indivíduos infectados por *P. falciparum* do grupo populacional Fulani. De acordo com esta hipótese sugerimos que as mesmas adaptações ocorrem como eventos isolados em dois países geograficamente separados/continentes.

Analisamos também dois polimorfismos no gene da *IL2* (+ 114T/G e - 330 T/G). Para o SNP -330 (T/G), verificamos que o genótipo mais frequente foi TT (60,46%) e o alelo foi o T (96,5%). Para o segundo SNP, observamos que o genótipo mais frequente foi TG (54,1%) e o alelo foi G (95,3%). Resultados

semelhantes foram encontrados em Togawa e colaboradores (2005) para o SNP – 330 em indivíduos japoneses, demonstrando que o genótipo mais frequente foi TT (39,6%). Song e colaboradores (2012) avaliaram estes dois SNPs no gene da IL-2 em indivíduos chineses e o genótipo mais frequente na posição -330 foi TG, no entanto, o alelo foi o T. Para a posição +114, o genótipo mais frequente foi o TG e o alelo também foi o T, sugerindo assim, que a composição étnica e a pressão de doenças infecto-parasitárias e autoimunes possam alterar o padrão de polimorfismo deste gene em diferentes áreas no mundo.

Adicionalmente, Israelsson (2011), analisando o polimorfismo no gene da *IL-1B* (-511C>T) em indivíduos infectados por *Plasmodium falciparum*, sugeriu que a presença do alelo polimórfico pode influenciar na susceptibilidade a doença. Este mesmo SNP também foi associado com a presença de anemia em pacientes com malária grave (OUMA, et al., 2008). A presença do alelo G para o SNP na posição -330 T/G, localizado na região promotora do gene da *IL-2*, está relacionado com o aumento da susceptibilidade a doenças inflamatórias e cânceres, incluindo artrite reumatoide e leucemia mieloide (AMIRZARGAR et al., 2005; SHIN et al., 2008; WU et al., 2009), além deste alelo também estar relacionado com alterações nos níveis desta citocina (TOGAWA et al., 2005; SHIN et al., 2008; WU et al., 2009).

Estudos também relataram que os linfócitos T de pacientes com o SNP - 330 G/G foram capazes de produzir uma maior quantidade da proteína IL-2 do que os que possuíam -330 T/G ou T/T, sugerindo que o G-330T (rs2069762) identificado nesta região promotora pode influenciar a produção desta proteína em indivíduos saudáveis (HOFFMANN et al., 2001). Trabalhos em câncer de próstata também mostraram uma associação de variantes genéticas de IL-2 com o risco deste tipo de câncer, revelando uma significativa contribuição da variante do exón 1 do gene IL-2 (rs2069763 G/T) para a suscetibilidade à doença (WU et al., 2009). Vários estudos tem revelado uma possível associação de asma com genes codificadores de resposta imune, incluindo os genes de citocinas devido ao seu papel na fisiopatogenia da doença (OBER; HOFFJAN, 2006). Padrón- Morales e colaboradores (2013) avaliaram se o

polimorfismo +114 T/G (rs2069763) no gene *IL-2* e suas variantes genéticas poderiam ter influência no desenvolvimento de asma, mas não foram observadas associações significativas positivas.

Compreender a dinâmica de transmissão e a estrutura genética da população de *P. vivax* é muito importante para prever o surgimento e distribuição de diferentes cepas do parasito, que podem diferir em sua virulência e resistência a drogas, fato este que é particularmente importante quando levamos em conta o gene da CSP, o principal antígeno de superfície do esporozoítio, crucial para este estágio de desenvolvimento do parasito (GAZINELLI et al., 2014). Este gene tem se mostrado um valioso marcador em estudos de genética populacional, sobretudo para o *P. vivax*, já que nesta espécie, a porção central repetitiva da proteína é marcada por repetições em tandem, e três tipos de “*peptide repeat motif*” são reconhecidos, definindo as variantes conhecidas como VK210, VK247 e *P. vivax-like* (ROSENBERG et al., 1989; QARI et al., 1993^a).

Por abordagens sorológicas e/ou moleculares, diferentes autores avaliaram a ocorrência de variantes da CSP do *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) em áreas endêmicas da região amazônica. Ambas as variantes VK210 e VK247 são amplamente distribuídas (STORTI-MELO, 2009; PATIL et al., 2010; SOUZA-NEIRAS et al., 2010; DIAS et al., 2013; SHABANI et al., 2016), sendo que a VK210 predomina em muitas áreas do Brasil e algumas outras áreas a VK247 tem sido limitada e, em outras regiões, infecções com genótipos mistos tem sido evidenciadas (MACHADO, PÓVOA, 2000; STORTI-MELO et al., 2009). Recentemente, a presença da VK247 em infecções únicas foi identificada em duas áreas do Estado do Pará; Novo Repartimento (STORTI-MELO, 2009) e em Goianésia do Pará (SANTOS et al., 2016), bem como no município de Oiapoque no Estado do Amapá (GOMES et al., 2016).

Entretanto, diferentemente da maioria destes estudos, a variante VK247 foi encontrada em maior frequência em nossa população. Este resultado é particularmente importante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que já tem sido demonstrado que infecções com a variante VK247 apresentam maior carga parasitária e um predomínio de citocinas inflamatórias, as quais

poderiam resultar em maiores complicações na infecção (RIBEIRO et al., 2016). As razões para as variáveis frequências encontradas para as variantes da CSP do *P. vivax* não são claras, mas podem estar relacionadas as condições epidemiológicas de transmissão. Já foi descrito que diferentes espécies de vetores apresentam susceptibilidade diferencial para cada variante. Por exemplo, o *Anopheles darlingi*, *An. aquasalis* e o *An. albimanus* são mais susceptíveis a variante VK210 comparado a variante VK247 (GONZALES-CERON et al., 2000; DA SILVA et al., 2006), e por sua vez, os oocinetos da VK210 não conseguem se desenvolver no epitélio intestinal do *An. pseudopunctipennis* (GONZALES-CERON et al., 1999).

Dessa forma, a estrutura genética populacional do *P. vivax* provavelmente está condicionada as espécies vetoras locais, as quais podem facilitar a introdução ou exclusão de novas cepas e genótipos com favorável condição de transmissão. Outra condição que provavelmente contribui para a dinâmica e estrutura genética da população de parasitos é o status imune do hospedeiro humano, pois a região central repetitiva da CSP, que caracteriza as variantes do *P. vivax*, contem epítomos de células B e, anticorpos específicos contra esta região são capazes de bloquear a invasão dos esporozoítos aos hepatócitos (PERSSON et al., 2002), além de serem correlacionados com proteção (YADAVA et al., 2014). Assim, poderíamos explicar a maior frequência de infecções por VK247 caso a população apresentasse maior resposta de anticorpos contra a VK210. Entretanto, esta hipótese dificilmente pode ser aplicada em nossa população por duas razões: 1) a baixa proporção de indivíduos com anticorpos contra a VK210 (22.6%) e; 2) o fato de não termos encontrado associação entre a variante presente no momento da infecção com anticorpos CSP-específicos.

No presente estudo, avaliamos a resposta de anticorpos IgG específicos contra cada variante do *P. vivax*. Estudos prévios já demonstraram que anticorpos contra as três variantes estão presentes em diferentes áreas endêmicas da Amazônia brasileira (ARRUDA et al., 1998; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; SOUZA-NEIRAS et al., 2010). Nós encontramos maior frequência de respondedores e níveis de anticorpos contra a variante VK210 comparada as outras variantes. Curiosamente, esta maior resposta de

anticorpos IgG contra a VK210 não parece ser decorrente de maior exposição a esta variante, uma vez que foi encontrado maior frequência de infecções contendo a variante VK247. Assim, provavelmente este resultado reflete a maior antigenicidade da VK210, conforme demonstrado em outros trabalhos (ARÉVOLO et al., 1998; CESPEDDES et al., 2013). Outro resultado importante foi a detecção de anticorpos contra a variante *P. vivax-like*. Apesar desta variante ter sido reconhecida no início da década de 1990, na Papua Nova Guiné (QARI et al., 1993^a), vários estudos no mundo falharam em detectar esta variante (GOPINATH et al., 1994; SUWANABUN et al., 1994; PATIL et al., 2010).

Entretanto, somado a detecção de algumas amostras contendo esta infecção, a presença de anticorpos contra esta variante indica que ocorre a circulação do *P. vivax-like* em baixas frequências na Amazônia brasileira. Resultados semelhantes já haviam sido observados em diferentes regiões da Amazônia, no Brasil (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; ARRUDA et al., 2007; STORTI-MELO et al., 2009) e na Guiana Francesa (VOLNEY et al., 2002).

De maneira geral, a soropositividade de indivíduos com anticorpos contra as repetições da CSP foi baixa (28.2%, considerando as três variantes). Esta taxa de respondedores foi similar a observada em outras áreas da Amazônia brasileira (CARVALHO et al., 1997; ARRUDA et al., 2007; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004), porém menor a encontrada em outros estudos, inclusive no Brasil (ARÉVOLO-HERRERA et al., 1998; ARRUDA et al., 1998; RUI et al., 2011). Na verdade, a frequência de respondedores para a CSP do *P. vivax* depende de diferentes fatores, tais como as condições de endemicidade e do número de episódios anteriores de malária do hospedeiro humano (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; ARRUDA et al., 2007; CHENG et al., 2013).

Investigamos também se polimorfismos nos genes *IL1B* e *IL2* poderiam estar associados a resposta de anticorpos IgG contra as variantes da CSP. Sabe-se que a IL-1 pode aumentar a resposta imune humoral ao estimular a diferenciação das células B e também aumentar a proliferação e secreção de imunoglobulinas (DINARELLO, 1989). Já o papel da IL-2 na produção de

anticorpos é controversa. Enquanto a sinergia com a IL-10 parece aumentar a produção de IgG por células B ativadas por *Staphylococcus aureus* (ITOH et al., 1994), a infusão de IL-2 aumenta a citotoxicidade mediada por células e diminui a quantidade de IgG total gerada em pacientes com doenças hematológicas. Nosso resultados revelaram que indivíduos com o genótipo CC para o SNP *IL1B* -511C>T (rs16944) apresentaram maior resposta de anticorpos IgG contra as variantes VK247 e *P. vivax-like*. Este SNP vem sendo recentemente estudado em diversas doenças, e o alelo T vem sendo associado com risco aumentado de desenvolver choque séptico (JIMÉNEZ-SOUZA et al., 2017), câncer gástrico (EL-OMAR et al., 2000) e cervical (XU et al., 2013). Na malária, as frequências alélicas deste SNP não diferiram entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos da etnia Fulani (ISRAELSSON et al., 2011), mas foi associado com anemia grave em pacientes com malária falciparum no Quênia (OUMA et al., 2008). Curiosamente, este SNP não influenciou os níveis plasmáticos da IL-1 β em nosso estudo. Na verdade, alguns estudos prévios falharam em associar este SNP isoladamente com alterações relevantes na transcrição do gene (CHEN et al., 2006^a; BHAT et al., 2014). Este SNP localiza-se *upstream of the transcription start site*, na região promotora do gene, e já tem sido demonstrado que existe alto desequilíbrio de ligação entre SNPs localizados nesta região, e as alterações na expressão do gene parecem ser muito mais influenciadas por haplótipos do que por SNPs específicos (CHEN et al., 2006^a). Assim, é provável que o SNP rs16944 não seja o responsável por tais alterações, mas que ou esteja em desequilíbrio de ligação com a verdadeira variante causal, ou que participe no contexto de certos haplótipos. Assim, é preciso levar em consideração que um dos limitantes do estudo foi a avaliação de um único SNP no gene da IL-1 β . Dessa forma, novos estudos avaliando uma maior cobertura genética do gene *IL1B*, em um tamanho amostral maior, ajudará a confirmar a participação deste SNP na resposta humoral contra o *P. vivax*.

Pode-se concluir que estudos de possíveis associações de SNPs em genes de citocinas na resposta imune humoral na malária ainda são incipientes na malária vivax e os resultados contraditórios, bem como a maioria são executados em modelos experimentais e/ou com *P. falciparum*. Parâmetros

moleculares da porção central da CSP do *P. vivax* e sua associação com o perfil de citocinas pró- inflamatórias e anticorpos anti-CSP mostram resultados importantes nesta avaliação na Amazônia Brasileira. Tendo em vista que a evolução da malária é resultado da interação de fatores inerentes ao parasito e ao hospedeiro, portanto, a variabilidade genética de ambos deve ser considerada sobre o processo doença.

6. CONCLUSÃO

Nos indivíduos infectados por *P. vivax*, residentes no Município de Goianésia do Pará, observa-se que:

1. Na casuística estudada o genótipo selvagem é o mais freqüente para os polimorfismos no segmento gênico do *TCRBV20S1* e para o SNP na posição - 330 no gene da *IL2*. Para os polimorfismos no segmento gênico do *TCRBV3S1*, no gene da *IL1B* e na posição +114 para o gene da *IL2* os genótipos mais freqüentes foram os heterozigotos. Há predomínio do alelo selvagem para todos os polimorfismos, com exceção do SNP na posição +114 no gene da *IL2*.
2. Os polimorfismos nos genes do *TCR*, *IL1* e *IL2* não estão associados com a densidade parasitária dos indivíduos infectados pelo *P. vivax*.
3. Os níveis das interleucinas IL-1 e IL-2 não apresentam influência na parasitemia e nos níveis de anticorpos contra as variantes da CSP do *P. vivax*.
4. Em relação à magnitude da resposta (RI) os níveis de anticorpos IgG são mais elevados para a variante VK210 quando comparado as variantes VK247 e *P. vivax-like*. Há correlação entre os níveis de anticorpos IgG para as três variantes (VK210, VK247 e *P.vivax-like*). As variantes não influenciaram nos níveis de anticorpos contra as proteínas da CSP de *P. vivax*.
5. O SNP no gene da *IL1B* está associado com níveis de anticorpos contra as variantes VK247 e *P. vivax-like*. Indivíduos portadores do genótipo CC apresentaram maiores níveis de anticorpos contra a VK247 comparado aos indivíduos CT + TT. Além disso, indivíduos com o genótipo CC também possuem mais anticorpos contra a *P. vivax-like*.

7. REFERÊNCIAS

ALECRIM, M.G; LACERDA, M.V.; MOURÃO, M.P; ALECRIM, W.D.; PADILHA A.; CARDOSO, B.S.; BOULOS, M.M. Successful treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with a six-dose regime no farte-mether-lume fantrine versus quinine-doxycycline in the Western Amazon region of Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n.1, p. 20-25, 2006.

AMIRZARGAR, A.A; BAGHERI M.; GHAVAMZADEH, A.; ALIMOGHADAM, K.; KHOSRAVI, F.; REZAEI, N.; MOHEYDIN, M.; ANSARIPOUR, B.; MORADI, B.; NIKBIN, B. Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenous leukaemia. **International Journal Immunogenetic**, v. 32, p.167–171, 2005.

AMYES, E.; MCMICHAEL, A. J.; CALLAN, M. F. Human CD4 + T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5765-5773, 2005.

ANDRADE, B.B; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S.M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L.M.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal** , v. 9, p.13, 2010.

AREND, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 223, p. 20-38, 2002.

ARÉVALO-HERRERA M, ROGGERO MA, GONZALEZ JM, VERGARA J, CORRADIN G, LÓPEZ JA, HERRERA S. Mapping and comparison of the B-cell epitopes recognized on the Plasmodium vivax circumsporozoite protein by immune Colombians and immunized Aotus monkeys. **Annual Tropical Medicine Parasitology**, v. 92, n.5, p. 539-51, 1998.

ARÉVALO-HERRERA, M.; SOLARTE, Y.; ZAMORA, F.; MENDEZ, F.; YASNOT, M. F.; ROCHA, L.; LONG, C.; MILLER, L. H.; HERRERA, S. *Plasmodium vivax*: transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, Sup 5, p. 38-43, 2005.

ARNOT DE, BARNWELL JW, TAM JP, NUSSENZWEIG V, NUSSENZWEIG RS, ENEA V. Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, v. 230, p.815-819, 1985.

ARRUDA ME, ZIMMERMAN RH, SOUZA RM, OLIVEIRA-FERREIRA J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n. 3, p. 367-71, 2007.

ARRUDA, M.E., SOUZA, R.C., VEIGA, M.E., FERREIRA, A.F., ZIMMERMAN, R.H. Prevalence of Plasmodium vivax variants VK247 and P. vivax-like human malaria: a retrospective study in indigenous Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 92, p. 628, 1998.

BAYGOZINA, E.A.; DOLGIH, V.T.; SOVALKIM, V.I. Polymorphism of genes of interleukin-1 family as factor of pathogenesis of nozokomialny

pneumonia. **Patologicheskaiia fiziologiia i èksperimental'naia terapiia**, v. 59, n.4, p.66-72, 2015.

BHAT IA, NAYKOO NA, QASIM I, GANIE FA, YOUSUF Q, BHAT BA, RASOOL R, AZIZ SA, SHAH ZA. Association of interleukin 1 beta (IL-1 β) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. **Meta Gene**, v.2, p.123-33, 2014.

BLACKMAN MJ, HEIDRICH HG, DONACHIE S, MCBRIDE JS, HOLDER AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J Exp Med**, v. 172, n. 1, p. 379- 82, 1990.

BOUHAROUN-TAYOUN H, OEUVRAY C, LUNEL F, DRUILHE P. Mechanisms underlying the monocyte mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **J Exp Med**, v. 182, n. 2, p. 409-18, 1995.

BRANQUINHO, M. et al. *Anophelines* in the State of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum* *Plasmodium vivax*, the variant *Plasmodium vivax* VK247 and *P. malariae*. **Trans Royal Soc Trop Med and Hygiene**, v. 87, p. 391-394, 1993.

BREDEMEIER, M.; CHIES, J.A.;WIECK, A.; CAPOBIANCO, K.G.;PITREZ, E.H.; ROHDE, L.E.; PINOTTI, A.F.; BRENOL, J.C.; XAVIER, R.M. TCRBV20S1 and TCRBV3S1 gene segment polymorphisms in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n.6, p. 1058-1063, 2008.

BROCK, P.M.; FORNACE, K.M.; PARMITER, M.; COX, J.; DRAKELEY C.J.; FERGUSON, H.M. et al. *Plasmodium knowlesi* transmission: integrating quantitative approaches from epidemiology and ecology to

understand malaria as a zoonosis. **Parasitology**, v.143, p.389-400, 2016.

BRUNET, J. F.; DENIZOT, F.; LUCIANI, M. F.; ROUX-DOSSETO, M.; SUZAN, M.; MATTEI, M. G.; GOLSTEIN, P. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 267-270, 1987.

BUJAK, M.; FRANGOIANNIS, N. G. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. **Archivum Immunologiae at Therapia Experimentalis**, v.57, p. 165-176, 2009.

CANTAGREL A, NAVAUX F, LOUBET-LESCOULIÉ P, NOURHASHEMI F, ENAULT G, ABBAL M, CONSTANTIN A, LAROCHE M, MAZIÈRES B. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 6, p. 1093-100, 1999.

CARPENTER, D; ROTH, I; FAMERT, A; ABUSHAMA, H; QUINNELL, R.J; SHAW, M.A. Immunogenetic control of antibody responsive nessin a malaria endemic area. **Hum. Immunology**, v. 68, p.165–169, 2007.

CARTER, M. J; DI GIOVINE, F.S.; JONES, S.; MEE, J.; CAMP, N.J.; LOBO, A.J.; DUFF, G.W. Association of the interleukin 1 receptor antagonist gene with ulcerative colitis in Northern European Caucasians. **Gut**, v. 48, p. 461-467, 2001.

CARVALHO, L.H., FONTES, C.J.F., FERNANDES, A.A.M., MARINUZZI, H.C., KRETTLI, A.U.K. Cross-reactive cellular imune

response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. **Parasite Immunology**, v.19, p. 47-59, 1997.

CASSIANO GC, et al. Development of PCR-RFLP assay for the discrimination of *Plasmodium* species and variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax-like*) in *Anopheles* mosquitoes. **Acta Tropica**, v.118, n. 2, p. 118-22, 2011.

CASSIANO, G.C.; FURINI, A.A.; CAPOBIANCO, M.P.; STORTI-MELO, L.M.; CUNHA, M.G.; KANO, F.S. et al. Polymorphisms in B Cell Co-Stimulatory Genes Are Associated with IgG Antibody Responses against Blood-Stage Proteins of *Plasmodium vivax*. **PLoS One**, v.22, 2016.

CASSIANO, G.C.; SANTOS, E.J.; MAIA, M.H.; FURINI, A.D.A.C.; STORTI-MELO, L.M.; TOMAZ, F.M. et al. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. **Human Immunology**, v.76, p. 836-2, 2015.

CAVASINI, C.E.; DE MATTOS, L.C.; COUTO, A.A.; COUTO, V.S.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L.J.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; ROSSIT, A.R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R.L. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malaria Journal**, v.6, p.167, 2007.

CERÁVOLO, I.P.; BRUÑA-ROMERO, O.; BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.; BRITO, C.F.; SOUZA, J.M. et al. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 675-681, 2010.

CESPEDES N, AREVALO-HERRERA M, FELGER I, REED S, KAJAVA AV, CORRADIN G, HERRERA S: Antigenicity and immunogenicity of a novel chimeric peptide antigen based on the *P. vivax* circumsporozoite protein. **Vaccine**, v.31, p. 4923–4930, 2013.

CHAPPEL, J. A.; HOLLINGDALE, M. R.; KANG, A. S. IgG(4) Pf NPNA-1 a human anti-*Plasmodium falciparum* sporozoite monoclonal antibody cloned from a protected individual inhibits parasite invasion of hepatocytes. **Human Antibodies**, v. 13, n. 3, p. 91-96, 2004.

CHARMLEY, P. NEPOM, B.S.; CONCANNON, P. HLA and T cell receptor beta-chain DNA polymorphisms identify a distinct subset of patients with particular-onset juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.37, p. 695, 1994.

CHARMLEY, P.; WANG, K.; HOOD, L.; NICKERSON, D.A. Identification and physical mapping of a polymorphic human T-cell receptor V beta with a frequent null allele. **The Journal of experimental medicine**, v.177, p.135–143, 1993.

CHEN, H., WILKINS, L.M., AZIZ, N., CANNINGS, C., WYLLIE, D.H., BINGLE, C., ROGUS, J., BECK, J.D., OFFENBACHER, S., CORK, M.J., RAFIE-KOLPIN, M., HSIEH, C.M., KORNMAN, K.S. Duff GW Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. **Human Molecular Genetics**, v.15, p.519-529, 2006^a.

COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, n.4. p. 579-592, 2007.

COPPI A, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. **J Exp Med**, v. 208, n. 2, p. 341-56, 2011.

CORDEIRO, C. A.; MOREIRA, P.R.; COSTA, G.C.; DUTRA, W.O.; CAMPOS, W.R.; ORÉFICE, F.; TEIXEIRA, A.L. Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis. **Molecular Vision**, v. 14, p. 1845-1849, 2008.

COWMAN, A.F.; CRABB, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v.124, n.4, p.755-766, 2006.

CURADO, I et al. Antibodies anti blood stream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasiliense*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 235-243, 1997.

D'SOUZA, W.N.; LEFRANCOIS, L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 5727–5735, 2003.

DA SILVA AN, SANTOS CC, LACERDA RN, MACHADO RL, PÓVOA MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v.101, n.5, p.547-550, 2006.

D'ALMEIDA, T.C.; SADISSOU, I.; COTTRELL, G.; TAHAR, R.; MOREAU, P.; FAVIER, B.; MONTAIROU, K.; DONADI, E.A.; MASSOUGBODJI, A.; ROUASS-FREISS, N.; COURTIN, D.; GARCIA, A. Evolution of the levels of human leukocyte antigen G (HLA-G) in Beninese infant during the first year of life in a malaria endemic area: using latent class analysis. **Malaria Journal**, v.15, p. 78, 2016.

DANIS, V. A.; MILLINGTON, M.; HYLAND, V.J.; GRENNAN, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. **Clinical Experimental Immunology**, v. 99, p. 303-310, 1995.

DAVEY, M.P.; MEYER, M.M.; MUNKIRS, D.D.; BABCOCK, D.; BRAUN, M.P.; HAYDEN, J.B.; BAKKE, A.C. T-cell receptor variable beta genes show differential expression in CD4 and CD8 T cells. **Human Immunology**, v. 32, n.3, p.194-202, 1991.

DE INOCENCIO, J.; CHOI, E.; GLASS, D.N.; HIRSCH, R. T cell receptor repertoire differences between African Americans and Caucasians associated with polymorphism of the TCRBV3S1 (V beta 3.1) gene. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 4836–4841, 1995.

DE LA CRUZ VF, LAL AA, MCCUTCHAN TF. Variation among circumsporozoite protein genes from rodent malarias. **Mol Biochem Parasitol**, v.28, n. 1, p. 31-8, 1988.

DIAS S, WICKRAMARACHCHI T, SAHABANDU I, ESCALANTE AA, UDAGAMA PV. Population genetic structure of the Plasmodium vivax

circumsporozoite protein (Pvcsp) in Sri Lanka. **Gene**, v. 518, n. 2, p. 381-387, 2013.

DINARELLO CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 519-550, 2009.

DRESCH, C.; NARDI, N.B.; CHIES, J.A. TCRBV3S1 and TCRBV18 gene segment polymorphisms in Brazilian Caucasoid and Black populations. **European Journal of Immunogenetics**, v. 29, n.1, p.11-15, 2002.

DRISS, A.; HIBBERT, J.M.; WILSON, N.O.; IQBAL, S.A.; ADAMKIEWICZ, T.V.; STILES, J.K. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to Malaria. **Malaria Journal**, v.10, p. 271, 2011.

ELIAS, R. M.; SARDINHA, L.R.; BASTOS, K.R.; ZAGO, C.A.; SILVA, A.P.; ALVAREZ, J.M.; LIMA, M.R. Role of CD28 in Polyclonal and Specific T and B Cell Responses Required for Protection against Blood Stage Malaria. **Journal of Immunology**, v.174, p. 790–799, 2005.

EL-OMAR EM, CARRINGTON M, CHOW WH, MCCOLL KE, BREM JH, YOUNG HA, ET AL. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v. 404, p. 398–402, 2000.

FERJENI, Z.; BOUZID, D.; FOURATI, H.; STAYOUSSEF, M.; ABIDA, O.; KAMMOUN, T.; HACHICHA, M. PENHA-GONÇALVES, C.; MASMOUDI, H. Association of TCR/CD3, PTPN22, CD28 and ZAP70 gene polymorphisms with type 1 diabetes risk in Tunisian population: family based association study. **Immunology Letters**, v. 163, n.1, p.1-7, 2015.

FERNANDEZ-BECERRA C, YAMAMOTO MM, VÊNCIO RZ, LACERDA M, ROSANAS-URGELL A, DEL PORTILLO HA. Plasmodium vivax and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 1, p. 44-51, 2009.

FRASER, J. D.; IRVING, B. A.; CRABTREE, G. R.; WEISS, A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. **Science**, v. 251, n. 4991, p. 313-316, 1991.

FREEMAN, G. J.; GRIBBEN, J. G.; BOUSSIOTIS, V. A.; NG, J. W.; RESTIVO, V. A. Jr, LOMBARD, L. A.; GRAY, G. S.; NADLER, L. M. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. **Science**, v. 262, n. 5135, p. 909-911, 1993.

GAFFEN, S.L. Signaling domains of Interleukin-2 receptor. **Cytokine**, v. 14, p. 63-77, 2001.

GAFFEN, S.L.; LIU, K.D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, p. 109-123, 2004.

GAUR D, CHITNIS CE. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 422-8, 2011.

GAZZINELLI, R.; PARISA, K.; FITZGERALD, K.A.; GOLENBOCK, D.T. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p.744-757, 2014.

GOMES MD, VIEIRA JL, CASSIANO GC, MUSSET L, LEGRAND E, NACHER M, COUTO VS, MACHADO RL, COUTO ÁA. Evaluation of circumsporozoite protein of Plasmodium vivax to estimate its

prevalence in Oiapoque , Amapá state, Brazil, bordering French Guiana. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 58, p. 72, 2016.

GONCALVES, R.M.; GONÇALVES, R.M.; SALMAZI, K.C.; SANTOS, B.A.; BASTOS, M.S.; ROCHA, S.C.; BOSCARDIN, S.B.; SILBER, A.M.; KALLÁS, E.G.; FERREIRA, M.U.; SCOPEL, K.K. CD4_ CD25_ Foxp3_ Regulatory T Cells, Dendritic Cells, and Circulating Cytokines in Uncomplicated Malaria: Do Different Parasite Species Elicit Similar Host Responses? **Infection and Immunity** , p. 4763–4772, 2010.

GONZALEZ J R, ARMENGOL L, SOLE X, et al. SNP assoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinform**, v. 23, p. 644–645, 2003.

GONZÁLEZ JM, et al. Variants of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n.5, p. 709-12, 2001.

GONZÁLEZ-CERÓN L, et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. **Malar J**, v. 15, n.12, p. 243, 2013.

GONZALEZ-CERON L, RODRIGUEZ MH, SANTILLAN FV, HERNANDEZ JE, WIRTZ RA. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein phenotypes in southern Mexico. **Journal Med Entomology**, v. 37, n. 3, p. 331-334, 2000.

GONZALEZ-CERON, L., RODRÍGUEZ, M.H., NETTEL, J.A., VILLARREAL, C., KAIN, K.C., HERNÁNDEZ, J.E. DiVerential susceptibility of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax*

variants VK210 and VK247 in southern Mexico. **Infection Immunology**, v.67, p. 410-412, 1999.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Immune effector mechanisms in malaria. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 4, p. 412-419, 1999.

GOPINATH R, WONGSRICHANALAI C, CORDON-ROSALES C, MIRABELLI L, KYLE D, KAIN KC: Failure to detect a Plasmodium vivax-like malaria parasite in globally collected blood samples. **Journal Infection Disease**, v.170, p.1630–1633, 1994.

GROSS, J. A.; JOHNSTON, J.; MUDRI, S.; ENSELMAN, R.; DILLON, S. R.; MADDEN, K.; XU, W.; PARRISH-NOVAK, J.; FOSTER, D.; LOFTON-DAY, C.; MOORE, M.; LITTAU, A.; GROSSMAN, A.; HAUGEN, H.; FOLEY, K.; BLUMBERG, H.; HARRISON, K.; KINDSVOGEL, W.; CLEGG, C. H. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 995-999, 2000.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunology Reviews**, v. 240, n. 1, p. 297-316, 2011.

HENRY, J.B. **Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais** 19. ed. Mnole LTDA, 1999.

HOCKERTZ, M.K.; PATY, D.W.; BEALL, S.S. Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: use of affected family-based controls. **American Journal of Human Genetics**, v.62, p. 373., 1998.

HOFFMANN, S.C.; STANLEY, E.M.; DARRIN, E.; CRAIGHEAD, N.; DIMERCURIO, B.S.; KOZIOL, D.E.; HARLAN, D.M.; KIRK, A.D.; BLAIR, P.J. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Transplantation**, v. 72, n.8, p. 1444-1450, 2001.

HORUK R, CHITNIS CE, DARBONNE WC, COLBY TJ, RYBICKI A, HADLEY TJ, MILLER LH. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. **Science**. V. 27, n. 261, p.1182-4, 1993.

HUANG, D.F.; SIMINOVITCH, K.A.; LIU, X.Y.; OLEE, T.; OLSEN, N.J.; BERRY, C.; CARSON, D.A.; CHEN, P.P. Population and family studies of three disease-related polymorphic genes in systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p. 1766., 1995.

HUGHES, AL. The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms. **J Mol Evol**, v. 59, p. 528-535, 2004.

HURME, M.; SANTILLA, S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 2598-2602, 1998.

ISRAELSSON, E; MAIGA B; KEARSLEY,S; DOLO, A; HOMANN, M.V.; DOUMBO, O.K.; TROYE-BLOMBERG, M; TORNVALL,P; BERZINS, K. Cytokine gene haplotypes with a potential effect on susceptibility to malaria in sympatric ethnic groups in Mali. **Infect Genetic Evolution**, v.11, p. 1608-1615, 2011.

ITOH K, INOUE T, ITO K, HIROHATA S. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. **Cell Immunology**, v. 157, n. 2, p. 478-88, 1994.

JAIN, V.; SINGH, P.P.; SILAWAT, N.; PATEL, R.; SAXENA, A.; BHARTI, P.K.; SHUKLA, M.; BISWAS, S.; SINGH, N. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. **Acta Tropica**, v. 113, p. 263–268, 2010.

JIMÉNEZ-SOUSA MÁ, MEDRANO LM, LIU P, ALMANSA R, FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ A, GÓMEZ-SÁNCHEZ E, RICO L, HEREDIA-RODRÍGUEZ M, GÓMEZ-PESQUERA E, TAMAYO E, RESINO S. IL-1B rs16944 polymorphism is related to septic shock and death. **Eur J Clin Invest**, v. 47, n.1, 53-62, 2017.

KAIN KC, et al. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. **J Clin Microbiol**, v.30, n.7, p. 1863-6, 1992.

KAIN KC, et al. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. **J Infect Dis**, v.168, n.5, p.1323-6, 1993.

KOMATSU, Y.; GALICIA, J.C.; KOBAYASHI, T.; YAMAZAKI, K.; YOSHIE, H. Association of interleukin-1 receptor antagonist +2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, p. 165-170, 2008.

KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 459-465, 1995.

LACERDA, M. V.; HIPÓLITO, J. R.; PASSOS, L. N. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 522-523, 2008.

LAROCQUE, R.; ROBINSON, M.A. Diversity in the human T cell receptor beta chain. **Human Immunology**, v. 48, n.1-2, p.3-11, 1996.

LENARDO, M.J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. **Nature**, v. 353, p. 858–861, 1991.

LI, P.; WANG, X.; ZHAO, M.Q.; LI, L.J.; ZHANG, C.; LI, B.Z.; LIU, J.; YANG, X.K.; LENG, R.X.; FAN, Y.G.; PAN, H.F.; YE, D.Q. TCR-CD3 ζ gene polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity**, v. 26, p. 1-6, 2016.

LIAO, N.S.; MALTZMAN, J.; RAULET, D.H. Positive selection determines T cell receptor V beta 14 gene usage by CD8⁺ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.170, p. 135-43, 1989.

LIMA-JÚNIOR, J.C.; PRATT-RICCIO, L.R. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* infection. **Front Immunology**, v.7, 2016.

LOKOSSOU, A.G.; DECHAVANNE, C.; BOURAÏMA, A.; COURTIN, D.; LE PORT, A.; LADÉKPO, R. et al. Association of IL-4 and IL-10 maternal haplotypes with immune responses to *P. falciparum* in mothers and newborns. **BMC Infection Disease**, v.13, p.215, 2013.

LONG, G. H.; CHAN, B. H. K.; ALLEN, J. E.; READ, A. F.; GRAHAM, A. L. Blockade of TNF receptor 1 reduces disease severity but increases parasite transmission during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. **International Journal of Parasitology**, v. 38, n. 8-9, p. 1073-1081, 2008.

LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B.S.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra Amazonian regions of Brazil. **Malar Journal**, v.14, p. 208, 2015.

LOUGHLAND JR, MINIGO G, BUREL J, TIPPING PE, PIERA KA, AMANTE FH, ENGWERDA CR, GOOD MF, DOOLAN DL, ANSTEY NM, MCCARTHY JS, WOODBERRY T. Profoundly Reduced CD1c+ Myeloid Dendritic Cell HLA-DR and CD86 Expression and Increased Tumor Necrosis Factor Production in Experimental Human Blood-Stage Malaria Infection. **Infection Immunology**, v.84, n.5, p.1403-12, 2016.

MACHADO RL, PÓVOA MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, n.4, p. 377-81, 2000.

MACHADO, R.L.D. et al. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. *J Infec Dis* 7: 175-177, 2003.

MAIGA, B.; DOLO, A.; TOURÉ, O.; DARA, V.; TAPILY, A.; CAMPINO, S. et al. Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. **PLoS One**, v. 9, 2013.

MALEK, T. R.; BAYER, A. L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nature Reviews/ Immunology**. v. 4, p. 665 – 674, 2004.

MALHOTRA, U.; SPIELMAN, R.; CONCANNON, P. Studies of identical twins, siblings and insulin-dependent diabetes mellitus patients. **Journal of Immunology**, v.149, p. 1802-1808, 1992.

MARGUERIE, C.; LUNARDI, C.; SO, A. PCR-based analysis of the TCR repertoire in human autoimmune diseases. **Immunology Today**, v. 13, p.336, 1992.

MARMOR, M.D.; JULIUS, M. Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. **Immunology**. v. 98, p. 1489-1497, 2001.

MARRELLI MT, BRANQUINHO MS, HOFFMANN EH, TAÍPE-LAGOS CB, NATAL D, KLOETZEL JK. Correlation between positive serology for Plasmodium vivax-like/Plasmodium simiovale malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n.2, p. 149-51, 1998.

MATESANZ, F.; FEDETZ, M.; LEYVA, L.; DELGADO, C.; FERNÁNDEZ, O.; ALCINA, A. Effects of the multiple sclerosis associated - 330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 148, p. 212–217, 2004.

MAZIER, D.; GOMA, J.; PIED, S.; RENIA, L.; NUSSLER, A.; MILTGEN, F.; MATTEI, D.; GRAU, G. Hepatic phase of malaria: a crucial role as "go-between" with other stages. **Bulletin of the World Health Organization**, Sup 68, p. 126-131, 1990.

MBENGUE B, KPODJI P, SYLLA NIANG M, VARELA ML, THIAM A, SOW A, NDIAYE K, AIDARA M, THIAM F, NDIAYE R, DIOP G, NGUER CM, PERRAUT R, DIÈYE A. Profiles of IgG responses against CSP, GLURP and LSA-3NR2 in urban malaria (Dakar): relations with haemoglobin levels and parasite densities. **Bull Soc Pathol Exot**, v.2, p.91-98, 2016.

MEDINA, T.S.; COSTA, S.P.; OLIVEIRA, M.D.; VENTURA, A.M.; SOUZA, J.M.; GOMES, T.F.; VALLINOTO, A.C.; PÓVOA, M.M.; SILVA, J.S.; CUNHA, M.G. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. **Malaria Journal**, v.10, p. 264, 2011.

MÉNARD, D.; BARNADAS, C.; BOUCHIER, C.; HENRY-HALLDIN, C.; GRAY, L.R.; RATSIMBASOA, A.; THONIER, V.; CAROD, J.F.; DOMARLE, O.; COLIN, Y.; BERTRAND, O.; PICOT, J.; KING, C.L.; GRIMBERG, B.T.; MERCEREAU-PUJALON, O.; ZIMMERNAN, P.A.. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 5967-5971, 2010.

MENDONÇA, V.R.; SOUZA, L.C.; GARCIA, G.C.; MAGALHÃES, B.M.; LACERDA, M.V.; ANDRANDE, B.B. et al. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v.13, p.278, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, Relatório de Situação do Pará – 5^a Edição, 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_pa_5ed.pdf. Acesso em: 13/05/2013.

MOREIRA, P. R.; DE SÁ, A.R.; XAVIER, G.M.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. A functional interleukin-1 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, p. 306–311, 2005.

MOREIRA, P. R.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. The *IL1A* (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 42, p. 23–30, 2007.

MUELLER, I.; GALINSKI, M.R.; BAIRD, J.K.; CARLTON, J.M.; KOCHAR, D.K.; ALONSO, P.L. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infectious Disease**, v.9, p.555-566, 2009.

NTUMNGIA FB, KING CL, ADAMS JH. Finding the sweet spots of inhibition: understanding the targets of a functional antibody against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Int J Parasitol**, v.42, n.12, p. 1055-62, 2012.

OBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes Immunology**, v. 7, n.2, p. 95-100, 2006.

OLIVEIRA-FERREIRA J, PRATT-RICCIO LR, ARRUDA M, SANTOS F, DANIEL RIBEIRO CT, GOLDBERG AC, BANIC DM. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. **Acta Tropica**, v.1, p. 63-69, 2004.

OUMA, C;DAVENPORT, G.C.; AWANDARE, G.A.;KELLER, C.C.; WERE, T; OTIENO M.F.; VULULE, J.M.; MARTINSON, J; ONGÉCHA,J.M.; FERRELL, R.E.;PERKINS, D.J. Polymorphic variability in the interleukin (IL)-1beta promoter conditions susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-1beta production. **Journal Infect Disease**, v. 15, p. 1219 – 1226, 2008.

PADRÓN-MORALES, J.; SANZ, C.; DÁVILA, I.; MUÑOZ-BELLIDO, F.,; LORENTE, F.; ISIDORO-GARCÍA, M. Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. **Journal of Investigation of Allergology Clinical and Immunology**, v. 23, n.7, p. 487-494, 2013.

PATIL, A., ORJUELA-SÁNCHEZ, P., DA SILVA-NUNES, M., FERREIRA, M.U. Evolutionary dynamics of the immunodominant repeats of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate circumsporozoite protein (CSP). **Infection Genetic Evolution**, v. 10, p. 298–303, 2010.

PEREIRA, V.A.; SÁNCHEZ-ARCILA, J.C.; TEVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D.C.; VASCONCELOS, M.P.A.; LIMA, C.A.M. et al. IL10 a genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v.28, p.30, 2015.

PEREZ-MAZLIAH, D.; LANGHORNE, J. CD4T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. **Front Immunology**, v.5, p.671, 2015.

PERSSON C, OLIVEIRA GA, SULTAN AA, BHANOT P, NUSSENZWEIG V, NARDIN E: Cutting edge: a new tool to evaluate human pre-erythrocytic malaria vaccines: rodent parasites bearing a hybrid Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. **Journal of Immunology**, v.169, p. 6681–6685, 2002.

PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; DI SANTI, S.M.; ARAUJO, M.P.; SUÁREZ-MUTIS, M.C.; FARIA E SILVA SANTELLI, A.C. et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 618-633, 2014.

POCIOT, F.; MOLVIG, J.; WOGENSEN, L.; WORSAAE, H.; NERUP, J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **European Journal of Clinical Investigations**, v. 22, p. 396-402, 1992.

POSNETT, D.N.; VISSINGA, C.S.; PAMBUCCIAN, C.; WEI, S.; ROBINSON, M.A.; KOSTYU, D.; CONCANNON, P. Level of TCRBV3S1(V beta 3.1) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence. **The Journal of experimental medicine**, v.179, p.1707–1711, 1994.

QARI SH, SHI YP, POVOA MM, ALPERS MP, DELORON P, MURPHY GS, HARJOSUWARNO S, LAL AA. Global occurrence of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **J Infect Dis**, v. 168, n.6, p. 1485-9, 1993.

QARI, S.H., SHI, Y.P., GOLDMAN, I.F., UDHAYAKUMAR, V., ALPERS, M.P., COLLINS, W.E. Identification of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **Lancet**, v.341, p. 780–783, 1993a.

RIBEIRO BP, CASSIANO GC, DE SOUZA RM, CYSNE DN, GRISOTTO MA, DE AZEVEDO DOS SANTOS AP, MARINHO CR, MACHADO RL, NASCIMENTO FR. Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. **PLoS Negl Tropical Disease**, v. 10, n. 3, 2016.

ROSENBERG, R., WIRTZ, R.A., LANAR, D.E., SATTABONGKOT, J., HALL, T., WATERS, A.P.,. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 245, p. 973–976, 1989.

RUI E, FERNANDEZ-BECERRA C, TAKEO S, SANZ S, LACERDA MV, TSUBOI T, DEL PORTILLO HA: *Plasmodium vivax*: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. **Malaria Journal**, v.10, p. 192, 2011.

RUMMEL, T.; BATCHELDER, J.; FLAHERTY, P.; LAFLEUR, G.; NANAVATI, P.; BURNS, J.M.; WEIDANZ, W.P. CD28 Costimulation Is Required for the Expression of T-Cell-Dependent Cell-Mediated Immunity against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* Malaria Parasites. **Infection and Immunity**, vol. 72, n.10, p. 5768–5774, 2004.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, vol. 133, p. 775–787, 2008.

SANTOS EA, PRIMO DG, SUCUPIRA IMC, CASSIANO GC, BARBOSA DRL, VIANA GMR, MACHADO RLD, PÓVOA MM. Frequency of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotypes in humans and anopheline mosquitoes in an endemic area of

southeastern Pará State, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 3, p. 57-64, 2016.

SCHWENK, R.; ASHER, L. V.; CHALOM, I.; LANAR, D.; SUN, P.; WHITE, K.; KEIL, D.; KESTER, K. E.; STOUTE, J.; HEPPNER, D. G.; KRZYCH, U. Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-based vaccine. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 1, p. 17-25, 2003.

SCOTTO, G. **Malaria: an update. Le infezioni in medicina**, v. 18, n.4, p. 213-234, 2010.

SHABANI SH, ZAKERI S, MEHRIZI AA, MORTAZAVI Y, DJADID ND. Population genetics structure of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein during the elimination process in low and unstable malaria transmission areas, southeast of Iran. **Acta Tropica**, v. 160, p. 23-34, 2016.

SHIN, W.G.; JANG, J.S.; KIM, H.S.; KIM, S.J.; KIM, K.H.; JANG, M.K.; LEE, J.H.; KIM, H.J.; KIM, H.Y. Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-2 genes in patients with gastric cancer in Korea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, p. 1567–1573, 2008.

SILVA SANTOS, S.; CLARK, T.G.; CAMPINO, S.; SUAREZ-MUTIS, M.C.; ROCKETT, K.A.; KWIATKOWSKI, D.P. et al. Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. **PLoS One**, v.7, 2012.

SMITH, A. J. P.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 43-59, 2009.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.58, n. 2, p. 283-292, 1993.

SOHAIL, M.; KAUL, A.; BALI, P.; RAZIUDDIN, M.; SINGH, M.P.; SINGH, O.P.; DASH, A.P.; ADAK, T. Allels -308A and -1031C in the TNF α gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF α and clinical features of vivaxmalaria in Indian patients. **Molecular Immunology**, v. 45, p.1682-1692, 2008.

SONG, H.; CHEN, L.; ZHANSHAN, C.; JIANWEN, B. Interleukin 2 Gene Polymorphisms Are Associated with Non-Hodgkin Lymphoma. **DNA and Cell Biology**, v.31,n.7, 2012.

SORTICA, V.A.; CUNHA, M.G.; OHNISHI, M.D.O.; SOUZA, J.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C.; SANTOS, N.P.C. et al. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with Plasmodium vivax malaria in Brazil. **Malaria Journal**, v.11, p.409, 2012.

SOUZA-NEIRAS et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? **Malaria Journal**, v. 9, p. 178, 2010.

SOUZA-NEIRAS WC, STORTI-MELO LM, CASSIANO GC, COUTO VS, COUTO AA, SOARES IS, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? **Malaria Journal**, v. 9, p. 178, 2010.

SPERLING, A. I.; AUGER, J. A.; EHST, B. D.; RULIFSON, I. C.; THOMPSON, C. B.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 9, p. 3909-3917, 1996.

STORTI-MELO LM, *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 672-8, 2009.

STORTI-MELO, L. M.; DA COSTA, D.R.; SOUZA-NEIRAS, W.C.; CASSIANO.G.C.; COUTO, V.S.; PÓVOA, M.M.; SOARES, IDA.S.; DE CARVALHO, L.H.; AREVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S.; ROSSIT, A.R.; CORDEIRO, J.A.; DE MATTOS, L.C.; MACHADO, R.L. Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. **Actatropica**, v.121, p. 152-155, 2012.

SUWANABUN N, SATTABONGKOT J, WIRTZ RA, ROSENBERG R: The epidemiology of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein polymorphs in Thailand. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 50, p. 460–464, 1994.

TAYLOR JE, et al. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 9, p. 2050-64, 2013.

TOGAWA, S.; TOGAWA, S.; JOH, T.; ITOH, M.; KATSUDA, N.; ITO, H.; MATSUO, K.; TAJIMA, K.; HAMAJIMA, N. Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 10, p 172–178, 2005.

TOMAZ, F.M.M.B.; FURINI, A.A.C.; CAPOBIANCO, M.P.; PÓVOA, M.M.; TRINDADE, P.C.A.; FRAGA, V.D. et al. Humoral immune responses against the malaria vaccine candidate antigen *Plasmodium vivax* AMA-1 and IL-4 gene polymorphisms in individuals living in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Cytokine**, v.74, p. 273-278, 2015.

TSUBOI, T.; TACHIBANA, M.; KANEKO, O.; TORII, M. Transmission-blocking vaccine of vivax malaria. **Parasitology International**, v. 52, n. 1, p. 1-11, 2003.

TUTEJA R. Unraveling the components of protein translocation pathway in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Arch Biochem Biophys**. v.467, n.2, p. 249-60, 2007.

VICENOVÁ, B.; VOPÁLENSKÝ, V.; BURÝSEK, L.; POSPÍSEK, M. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. **Physiological Research**, v. 58, p. 481-498, 2009.

VOLNEY B, POULIQUEN JF, DE THOISY B, FANDEUR T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Tropica**, v.82, n.1, p.11-23, 2002.

WALTHER, M.; WOODRUFF, J.; EDELE, F.; JEFFRIES, D.; TONGREN, J.E.; KING, E.; ANDREWS, L.; BEJON, P.; GILBERT, S.C.; DE SOUZA, J.B.; SINDEN, R.; HILL, A.V.; RILLEY, E.M. Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogeneous Cytokine Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes. **Journal of Immunology**, v.177, p. 5736-5745, 2006.

WALUNAS, T. L.; BAKKER, C. Y.; BLUESTONE, J. A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 6, p. 2541-2550, 1996.

WANG, Y.; SHU, Y.; JIANG, H.; SUN, B.; MA, Z.; TANG, W. Lack of association between interleukin-2 (IL-2) gene rs2069762 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v.8, n.o, p. 12557-65, 2015.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science Signaling**, v. 3, 2010.

WESTWOOD, O. The Generation of Diversity. In: Roitt I, Brostoff, J, Male D, editors. **Immunology**. 5th edition, p. 93-106, 1998.

WILSON, A.G.; DI GIOVINE, F.S.; BLAKEMORE, A.I.; DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, v. 1, n.5, p. 353,1992.

WILSON, R. K.; LAI, E.; CONCANNON, P.; BARTH, R.K.; HODD, L.E. Structure, Organization and Polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. **Immunological Review**, v. 101, p. 149-172, 1988.

WIPASA, J.; OKELL, L.; SAKKHACHORNPHOP, S.; SUPHAVILAI, C.; CHAWANSUNTATI, K.; LIEWSAREE, W.; HAFALLA, J.C.; RILEY, E.M. Short-Lived IFN- γ Effector Responses, but Long-Lived IL-10 Memory Responses, to Malaria in an Area of Low Malaria Endemicity. **PLoS Pathogens**, v. 7, n.2, 2011.

WOLDEAREGAI TG, KREMSNER PG, KUN JF, MORDMÜLLER B. Plasmodium vivax malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.107, n.5, p. 328-31, 2013.

World Health Organization. Country Profiles. Geneva: Disponível em http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_country_profiles.pdf?ua=1. Acesso em 10 abr 2016.

World Health Organization. **Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030**. Geneva: Disponível em: http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/en/. Acesso em: 16 abr 2016.

World Health Organization. **World Malaria Report 2012**, Disponível em <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>> Acesso em: 14 maio. 2012.

WU, J., LU, Y.; DING, Y.B.; KE, Q.; HU, Z.B.; YAN, Z.G.; XUE, Y.; ZHOU, Y.; HUA, Z.L.; SHY, Y.Q.; LIU, P.; SHEN, J.; XU, Y.C.; SHEN, H.B. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a

high-risk Chinese population. **Molecular Carcinogenesis** , v. 48, p. 626–632, 2009.

XU J, YIN Z, CAO S, GAO W, LIU L, YIN Y, LIU P, SHU Y. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. **PLoS One**, v.8, n.5, p.636-54, 2013.

YADAVA A, HALL CE, SULLIVAN JS, NACE D, WILLIAMS T, COLLINS WE, OCKENHOUSE CF, BARNWELL JW. Protective efficacy of a Plasmodium vivax circumsporozoite protein-based vaccine in Aotus nancymae is associated with antibodies to the repeat region. **PLoS Negl Tropical Disease**, v.8, n.10, p. 3268, 2014.

ANEXO I

1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação de polimorfismos do receptor TCR e dos genes da IL-1 e IL-2 com a infecção por *Plasmodium vivax* no município de Goianésia do Pará, Estado do Pará

Pesquisador: Marcela Petrolini Capobianco

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 15287513.0.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 331.162

Data da Relatoria: 10/07/2013

Apresentação do Projeto:

No Brasil o *P. vivax* é a espécie mais prevalente, responsável por aproximadamente 80% dos casos de malária na região Amazônica brasileira. Diversos estudos analisando resposta sorológica a diferentes peptídeos do *Plasmodium* têm obtido resultados variáveis de acordo com o antígeno utilizado e a população analisada, evidenciando a associação entre polimorfismos de genes humanos envolvidos na entrada do parasito no eritrócito e na susceptibilidade a malária vivax. Além disso, associações entre variabilidade em genes codificadores de moléculas envolvidas na resposta imune tem caracterizado alterações no padrão da parasitemia, aspectos clínicos, e também em relação a susceptibilidade a doença. As citocinas e receptores de ativação do TCR podem desempenhar um papel importante na resposta imune a malária por *P. vivax*. Diferenças alélicas nos genes TCR, IL-1 e IL-2 podem modular a concentração dessas moléculas e a resposta imune celular a diferentes antígenos do *P. vivax*, influenciando assim, na susceptibilidade ou resistência a malária.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar os polimorfismos do TCRBV20S1, do TCRBV3S1, IL-1 e da IL-2 em 150 pacientes

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2545

Fax: (17)3221-2500

E-mail: soraiafr@ibilce.unesp.br

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO**



Continuação do Parecer: 331.162

infectados pelo *Plasmodium vivax*, em Goianésia (PA), município que está, atualmente, entre os 5 municípios que concentram 50% dos casos de malária do Estado do Pará; e de 150 indivíduos não maláricos, visando identificar possíveis associações com a malária.

Identificar os polimorfismos do TCRBV20S1, do TCRBV3S1, IL-1 e da IL-2 em 150 pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, em Goianésia (PA), município que está, atualmente, entre os 5 municípios que concentram 50% dos casos de malária do Estado do Pará; e de 150 indivíduos não maláricos, visando identificar possíveis associações com a malária.

Estimar as frequências alélicas e genotípicas de variantes do TCRBV20S1, TCRBV3S1, da IL-1 e da IL-2 de amostras de pacientes infectados por *P. vivax* e indivíduos não maláricos.

Detectar os níveis de IL-1 e IL-2 na população estudada.

Identificar possíveis associações entre os níveis de citocinas estudadas e seus polimorfismos em relação à densidade parasitária.

Identificar possíveis associações entre os polimorfismos do gene TCRBV20S1 e TCRBV3S1 além dos níveis de citocinas em pacientes infectados por *P. vivax* e indivíduos não maláricos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As amostras foram previamente coletas, aprovadas em projeto anterior, desta forma, os participantes da pesquisa, não estarão expostos à riscos neste projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância científica, pois visa identificar suscetibilidade genética a *P. vivax*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: Serão utilizadas as amostras, já existentes no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da FARMERP que foram coletadas para o projeto 'Influência de polimorfismos em genes associados na produção de anticorpos contra diferentes antígenos candidatos à vacina em indivíduos com malária vivax no Estado do Pará', aprovado no CEP/FAMERP 4599/2011 em 13 de outubro de 2011. Desta forma, solicita-se ao CEP a reutilização das amostras e a dispensa do Termo de Consentimento de Livre e Esclarecido. O órgão proponente é o Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) devido ao vínculo institucional da pesquisadora, entretanto o projeto será realizado em outras instituições, as quais a pesquisadora apresentou os termos de

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2545

Fax: (17)3221-2500

E-mail: sorai@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 331.162

concordância, como solicitado anteriormente.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu a pendência anexando os termos de concordância das instituições.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Os relatórios são obrigatórios e devem ser encaminhados semestralmente a partir da data de aprovação do projeto.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 10 de Julho de 2013

Assinador por:
Ana Elizabete Silva
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2545

Fax: (17)3221-2500

E-mail: soraiafr@ibilce.unesp.br

ANEXO II

2. RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

2.1 Resumo apresentado no 64rd Annual Meeting -ASMTH - American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2015.

Association between genetic polymorphisms of TCR Receptor and malaria vivax in Brazil.

MARCELA P. CAPOBIANCO^{1,2}, ADRIANA C. FURINI², GUSTAVO C. CASSIANO^{1,2}, VALERIA DALTIBARI FRAGA², LUCIANA MORAN CONCEIÇÃO², CLÁUDIA REGINA BONINI-DOMINGOS¹, RICARDO L. D. MACHADO^{1,2,3}

¹UNESP "UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA" JULIO DE MESQUITA FILHO", SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SP, BRASIL ²FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SP, BRASIL, ³ INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, ANANINDEUA, PA, BRASIL.

E-MAIL: mpcapobianco@yahoo.com.br

Malaria is a major cause of morbidity and mortality in many tropical and subtropical countries. In Brazil, the *Plasmodium vivax* has been the most prevalent species, accounting for approximately 88% of malaria cases in the Brazilian Amazon region. Even though the clinical descriptions of the disease caused by the *P. vivax* is well described, standards regarding humoral and cellular immune response, are scarce and not fully understood. TCR is a heterodimer formed of two polypeptide chains linked together by disulfide bonds that on the surface of T lymphocytes are linked to a signaling molecule, called CD3. These chains present constant and variable regions, which attribute specificity to the antigen and differentiate the cell clones. First, polymorphisms in genes encoding variable chains may result in differences without number of expressed gene segments or in changes in the amino acid sequence of the gene product. Second, how T cells can be selected or excluded are not time depending on the type of TCR that it presents. Some of the polymorphisms

identified in the TCR gene are observed in the beta chain. Among the polymorphisms found in this region, TCRBV3S1 (C / T) has been extensively investigated to detect the repertoire of cellular receptors. We analyzed 83 blood samples from patients with malaria vivax diagnosed by molecular biology and thick gout and all are from Goianésia, Pará, Brazil. Polymorphisms in the TCRBV3S1 (C / T) gene. As the DNA samples were amplified by PCR technique and the size of the fragments resulting from the amplification was 431 bp. These fragments were digested with a restriction endonuclease Pvu. Homozygous individuals for this allele were identified by the presence of a single 431 bp fragment, thus reflecting the absence of the restriction site. However, individuals were identified by the presence of a fragment of approximately 352 bp and heterozygotes were identified by the presence of two fragments of 352 and 431 bp, respectively.

All statistical analyzes were performed with program R v 2.11.1 (<http://www.r-project.org>). The differences in the median parasitemia in relation to the genotypes were evaluated by the non-parametric Mann-Whitney test. Values of $p < 0.05$ were significant. For the polymorphism in the gene TCRBV3S1, the most frequent was CT (45.8%) and the most frequent allele was C (82.5%). The polymorphism tested was in the Hardy-Weinberg equilibrium. Parasitemia ranged from 15 to 70,000, with a median of 1,500 parasites per microliter of blood. No significant associations were found between the polymorphisms tested and the p values of vivax malaria in co-dominant, dominant and recessive models and there was no significant association between the tested polymorphisms and the p values of vivax malaria. The results of this study suggest that genetic variants analyzed in the different genetic segments of the TCR do not affect the functionality of the molecules so that they interfere in the parasitemia of the malaria caused by *P. vivax*.

2.2 Resumo apresentado XIV Reunião Nacional de Pesquisa em Malária, 2015.

POLIMORFISMO NO GENE DA *IL2* E OS NÍVEIS DE PARASITEMIA NA MALÁRIA VIVAX

CAPOBIANCO, MARCELA PETROLINI.^{1,2}; CASSIANO, GUSTAVO CAPATTI.^{1,2}; FURINI, ADRIANA ANTÔNIA DA CRUZ.²; FRAGA, VALERIA DALTIBARI.²; CONCEIÇÃO, LUCIANA MORAN²; BONINI-DOMINGOS, CLÁUDIA REGINA¹; MACHADO, RICARDO LUIZ DANTAS.^{1,2,3}

¹Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, UNESP/IBILCE.

²Centro de Investigação de Microrganismos – CIM – FAMERP.

³ Instituto Evandro Chagas, Pará, Brasil.

INTRODUÇÃO: O *Plasmodium vivax* tem sido responsável pela maioria dos casos de malária no Brasil. A interleucina 2 (IL-2) é uma citocina pró-inflamatória segregada por células do tipo Th1 que influencia nos fenômenos de sobrevivência, diferenciação, formação de células de memória imunológica e também atua como regulador negativo da ativação imune. Dessa forma, como o equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias é necessário para o controle das alterações imunopatológicas na malária, nós hipotetizamos que polimorfismos no gene *IL2* possam ser importantes no controle da carga parasitária na malária vivax. **MÉTODOS:** A amostra foi composta por 83 indivíduos infectados por *P. vivax*, com mais de 18 anos de idade, provenientes do município de Goianésia do Pará, Estado do Pará, confirmadas pelo método da Gota Espessa e por PCR aninhado. O SNP - 330 T/G foi analisado por PCR-Alelo Específico. As diferenças nas medianas da parasitemia em relação aos genótipos foram avaliadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. **RESULTADOS:** O genótipo mais freqüente foi TT (60,46%) e o polimorfismo encontrou-se em Equilíbrio de

Hardy-Weinberg. A parasitemia variou de 15 a 70.000, com mediana de 1.500 parasitos por microlitro de sangue. Não houve diferença significativa da parasitemia em relação ao SNP -330 T/G ($p= 0,81$). **DISCUSSÃO:** A associação entre variabilidade de genes codificadores de moléculas envolvidas na resposta imune tem caracterizado alterações no padrão da parasitemia, aspectos clínicos, e também em relação a susceptibilidade a doença. Em decorrência dos dados obtidos pelo seqüenciamento do genoma humano, o conhecimento dos genes humanos envolvidos na resposta imune e a verificação das implicações de sua variabilidade com relação à causa de doenças é uma etapa avançada atualmente. Além de genes e alelos envolvidos na patogênese de nosologias, os trabalhos de associação também permitem que sejam determinadas as frequências populacionais destes alelos. Os resultados deste estudo sugerem que a variante genética analisada no gene da *IL2* não afeta a funcionalidade das moléculas de modo que possam interferir na parasitemia da malária causada por *P. vivax*. Apesar da não associação entre este SNP e os níveis de parasitemia do indivíduo, não podemos excluir a possibilidade de associação s com a patogenicidade/gravidade da doença. Sendo assim, os resultados das dosagens dos níveis de citocinas poderão esclarecer melhores conclusões sobre o SNP analisado.

SUPORTE FINANCEIRO: CAPES, INSTITUTO EVANDRO CHAGAS E UNESP (PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA – SÃO JOSÉ DO RIO PRETO).

REFERÊNCIAS:

1. AMIRZARGAR, A.A., et.al. Intern. Journal Immunogenetic, v. 32, p.167, 2005.
2. DRISS, A., et.al. Malaria Journal, v.10, p. 271, 2011.
3. MALEK, T. R., et.al. Nature Reviews/ Immunology. v. 4, p. 665, 2004
4. MEDINA, T.S., et.al. Malaria Journal , v.10, p. 264, 2011.
5. SAKAGUCHI, S., et.al. Cell, vol. 133, p. 775, 2008.
6. SHIN, W.G., et.al. Journal of Gastroenterology and Hepatology, v. 23, p. 1567, 2008.
7. SOHAIL, M., et.al. Molecular Immunology, v. 45, p.1682, 2008.
8. TOGAWA, S., et.al. Helicobacter, v. 10, p 172, 2005.

9. World Health Organization. World Malaria Report 2015, Disponível em <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>> Acesso em: 14 abril de 2015.
10. WU, J., et.al. Molecular Carcinogenesis , v. 48, p. 626, 2009.



Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review

Marcela Petrolini Capobianco^{1*}, Gustavo Capatti Cassiano², Adriana Antônia da Cruz Furini³, Luciane Moreno Storti de Melo⁴, Cláudia Regina Bonini Domingos¹ and Ricardo Luiz Dantas Machado⁵

¹Graduate Program in Genetics, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

²University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

⁴Department of Biology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

⁵Laboratory of Malaria Immunogenetics, Evandro Chagas Institute/Health Ministry, Pará, Brazil

*Corresponding author: Marcela Petrolini Capobianco, Centro de Investigação de Microrganismos Depto. de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 CEP: 15090-000, Vila São Pedro, Brazil, Tel: +551732015736; Fax: +551732015736; E-mail: mpcapobianco@yahoo.com.br

Received date: June 27, 2016; Accepted date: July 21, 2016; Published date: July 21, 2016

Copyright: © 2016 Capobianco MP, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Abstract

Interleukin 2 (IL-2) is a monomeric glycoprotein that is primarily produced by activated CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and dendritic cells. It is characterized as a proinflammatory cytokine that is secreted by Th1 cells. IL-2 plays a central role in the activation of regulatory T cells to produce the cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ). IL-2 may also enhance the cytolytic activity of natural killer cells, thereby ensuring their significance in the control of the immune response, and effectively participate in the pathogenesis of several pathological conditions, such as cancer and metabolic, infectious, autoimmune and inflammatory diseases. We emphasize the importance of studies of IL-2 and discuss perspectives resulting from our increasing understanding of genetic diversity and its role in the immune response.

Keywords: IL-2; Immune response; Polymorphism; Parasitic infectious diseases

Interleukin 2 and the Immune Response

Cytokines are produced by various immune system cells and perform several functions, including mediation of the immune and inflammatory responses. The effects of cytokines on the immune response depend on a number of factors, such as their local concentrations, receptor expression patterns and the integration of multiple signalling pathways in response to immune cells [1]. The immune system includes proinflammatory cytokines that can enhance the functions of other cytokines and the immune response and anti-inflammatory cytokines that suppress this response; various interleukins (ILs) stand out in these responses [2]. ILs are small protein molecules that signal specific cells to regulate the immune systems of organisms. They are primarily synthesized by T cells, monocytes, macrophages and endothelial cells. The functions of ILs include the facilitation of communication among immune system cells, regulation of transcription factors, and control of inflammation, cell differentiation, proliferation and antibody secretion [3]. The characterization of interleukin 2 (IL-2) as a T-cell growth factor was consolidated in 1975 at the Second International Lymphokine Workshop. The number of studies on this molecule increased quickly; by 1983, the IL-2 gene was cloned, and in 1992, the IL-2 crystal structure was described [1]. Analysis of the three-dimensional structure of the IL-2 molecule shows that it is composed of four "packed" α -helices. The first and fourth helices are connected by a long upper loop to form a typical structure known as "up-up-down-down". Within this configuration, the first two α -helices are turned upward,

and the last two helices are turned downward. Importantly, the disulphide bond between the cysteines at positions 58 and 105 (Cys 58-105) of the second helix and the inter-helix region of the third and fourth α -helices are necessary to ensure the stability of the protein [3]. IL-2 is a monomeric glycoprotein with a molecular weight of approximately 15 kDa that is primarily produced by activated CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and dendritic cells [4]. IL-2 is a proinflammatory cytokine that is secreted by Th-1 cells, and it effectively participates in the activation of T cells to produce the cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ); IL-2 can also enhance the 3 cytolytic activity of natural killer cells (NK) [5,6]. Therefore, IL-2 is used therapeutically to stimulate the immune system [7]. IL-2 also contributes to the development of regulatory T cells, which control the expansion and apoptosis of activated T cells [5,8]. Furthermore, IL-2 influences cell survival, differentiation [1] and the formation of immune memory cells [1,9] and acts as a negative regulator of immune activation [8]. Recent studies showed that IL-2 played a critical role in the differentiation and survival of regulatory T cells, thereby ensuring their significance in the control of the immune response [10]. Cytokines effectively participate in the pathogenesis of several pathological conditions, such as cancer and metabolic, infectious, autoimmune and inflammatory diseases [11,12]. Thus, IL-2 plays multiple roles in immune functions by contributing to the generation and propagation of antigen-specific immune responses [13]. Studies conducted with animals and humans showed that low doses of IL-2 induced expansion of regulatory T cells in vivo and suppressed autoimmune diseases; this phenomenon is representative of a novel therapeutic approach to modulate the immune response for the treatment of these types of illnesses [14]. Anti-humoral therapy associated with IL-2 administration led to the remission of metastatic

Citation: Capobianco MP, Cassiano, GC, da Cruz Furini AA, Storti de Melo LM, Domingos CRB, et al. (2018) Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review. *J Cytokine Biol* 1: 109.

Page 2 of 4

renal cell carcinoma in up to 30% of patients and increased the survival of patients with melanoma and acute myeloid leukemia [15]. In these situations, the administration of high doses of IL-2 was associated with improved survival, although the related adverse effects were considerably severe in most patients [16]. Cases of cellular and humoral immunodeficiency exhibited satisfactory outcomes following IL-2 administration [17].

Genetic Variability of IL-2 and the Physiopathogenesis of Parasitic Infections and Autoimmune Diseases and Cancer

Individual genetic variability is an essential component of the immune response in general. This fact has become increasingly evident in recent years because genetic variability contributes to the susceptibility to, progression and outcomes of infectious and autoimmune diseases and cancer. While attempting to map its role in multifactorial and polygenic diseases, several studies revealed the true extension of human genetic variation [18]. Cytokines and their receptors emerged as intriguing targets of therapeutic intervention. Cytokine receptor subunit expression differs among various cell types. These subunits may be shared by different cytokines, which increases the complexity of these molecules [19]. The IL-2 receptor (IL-2R) is comprised of three subunits (α , β and γ) [20]. The gene that encodes subunit α is located on chromosome 10; this subunit (also known as CD25 or Tac antigen) is the subunit to which IL-2 selectively binds. The main function of the IL-2R α chain is to mediate the receptor's affinity for its ligand. Different from the other two IL-2R subunits, subunit α is located in special regions of the plasma membrane [21]. Subunit α simply requires IL-2 binding to help subunits β and γ come closer and consequently, trigger the signaling cascade. The gene that encodes subunit β (p75 or CD122) is located on chromosome 22. The β and γ chains together constitute an intermediate affinity receptor that is sufficient to trigger the IL-2 signaling pathways. Subunits β and γ are located in regions close to subunit α , which is the subunit that selectively binds IL-2. The gene that encodes the γ c chain of the IL-2R (common γ or p64) is located on chromosome X. Several cytokines share IL-2R γ , such as IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 and IL-21 [1]. When IL-2 receptor alpha (IL-2Ra) is activated, its soluble form is released into the serum. Thus, IL-2Ra protein concentration can be measured. In patients with colorectal and breast cancer, high serum IL-2Ra concentrations are indicative of disease progression and distant metastasis [22]. According to studies that analyzed genes encoding cytokines, several polymorphisms in the regulatory regions of these genes might be responsible for the changes in the production of the corresponding cytokines [23]. Several studies noted the importance of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the occurrence of infectious and autoimmune diseases [24], the transplantation course [25] and the allele frequencies of populations [26]. The association of SNPs with human diseases has great potential for clinical applications because it provides new genetic markers for diagnosis and prognosis and possibly new therapeutic targets.

The IL-2 gene (3558) is located in chromosome 4, region q26-q27. It contains four exons separated by three introns, with a total extension of approximately 5 kb [27]. Several IL-2 gene polymorphisms are known, including those at positions -330 T/G and +114 T/G. Polymorphism -330 T/G (rs2069762) is located in the gene promoter region and is associated with increased susceptibility to inflammatory diseases and cancer, including rheumatoid arthritis and myeloid leukemia [28-30]. Additionally, studies show that changes in the serum

IL-2 levels were found when this polymorphism was analyzed [29-31]. This finding was confirmed because the presence of allele G in gene position -330 was correlated with reduced IL-2 production *in vivo* [32]. Studies showed that the T lymphocytes of patients with SNP -330 G/G were able to produce larger amounts of IL-2 than the lymphocytes from patients with SNP -330 T/G or T/T, which suggests that the presence of -330T/G (rs2069762) in the aforementioned promoter region may influence IL-2 production in healthy individuals [33]. Studies on prostate cancer also found an association between genetic variants within IL-2 and the risk for this type of cancer, revealing a significant contribution of the IL-2 exon 1 variant rs2069763 G/T to disease susceptibility [34].

Several studies noted the possible association of asthma with genes that encoded components of the immune response, including cytokine genes, due to their roles in the pathophysiology of the disease [35]. One study investigated the association of the IL-2 gene polymorphism +114 T/G (rs2069763) and its genetic variants with asthma; however, no significant positive correlation was found [36]. IL2 +166 G/T is another polymorphism of the IL-2 gene that encodes a silent mutation that does not affect the amino acid sequence [37].

Studies on leishmaniasis showed that the presence of variants in the IL-2R β gene predisposed individuals infected with *Leishmania donovani* to the development of visceral leishmaniasis (VL), which indicated that the IL-2 signaling pathway participated in the occurrence of leishmaniasis [38]. Additionally, susceptibility to VL (caused by *L. donovani*) in Sudan (Arima ethnic group) was controlled by locus 22q12 [39]. Another study showed that mutations in the IL-2R β gene located in locus 22q12 might be at least partially responsible for the genetic linkage with VL [38], thus demonstrating the importance of this IL-2 signaling pathway.

The immune response to malaria involves innate and adaptive mechanisms, including the participation of several cell types and soluble components that lead to the elimination of the etiologic agent or to immunopathology [40-42]. *Plasmodium vivax* elicits a specific immune response in the host that is mediated by humoral (Th2 lymphocytes) and cellular (Th1 lymphocytes) mechanisms. The humoral mechanisms are characterized by the involvement of antibodies that confer protection through the opsonization of merozoites, thereby blocking the invasion of erythrocytes. This response is characterized by the participation of T lymphocytes, which, after recognizing agents processed by antigen-processing cells (APCs), release interleukins that regulate macrophages, dendritic cells and even B lymphocytes to activate the immune response against the etiologic agent.

B lymphocytes are activated by released IL-2, IL-4 and IL-5, which determine the type of antibodies that will be produced, as well as the immunoglobulin isotype switch. Regarding the cell-mediated response, ILs released by T lymphocytes increase the phagocytic activity of macrophages, neutrophils, dendritic cells, monocytes and NK lymphocytes to combat infections [40,42-44].

T lymphocytes are activated when the T-cell receptor (TCR) and CD4 or CD8 co-receptors recognize the major histocompatibility complex (MHC) expressed on APCs and bind to peptide antigens processed by lysosomal or proteasomal mechanisms [40,45]. However, binding alone does not suffice to trigger clonal expansion, which needs a second co-stimulatory signal provided by the APCs themselves through glycoproteins known as B7.1 (or CD80) and B7.2 (or CD86).

Citation: Capobianco MP, Cassiano, GC, da Cruz Furini AA, Storti de Melo LM, Domingos CRB, et al. (2016) Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review. *J Cytokine Biol* 1: 109.

These glycoproteins bind to the corresponding receptor on T cells (the CD28 molecule) [45].

Several studies revealed an association between polymorphisms of human genes involved in the invasion of erythrocytes by parasites and the susceptibility to vivax malaria. Additionally, the variability in genes that encode molecules involved in the immune response is associated with changes in the pattern of parasitemia, clinical aspects and susceptibility to disease [18,46].

Concerning *P. vivax* erythrocyte invasion receptors and ligands, individuals heterozygous for the Duffy blood group antigens (FyA/FyB) were found to be more susceptible to malaria in Brazil [47]. However, Duffy-negative individuals may become infected with *P. vivax* via other receptors involved in erythrocyte recognition [47,48].

The role of the human leukocyte antigen (HLA) system in the immune response to Plasmodium antigens has been widely investigated. Allelic differences in these genes exhibited contradictory results among the various investigated endemic areas, including Brazil; therefore, it seems unlikely that they are the only mechanism responsible for deviations of the immune response [49-51].

The current knowledge about the genes involved in the immune response and the implications of their variability for the causes of disease has been greatly advanced by data from human genome sequencing. In addition to the genes and alleles involved in the pathogenesis of several diseases, association studies have allowed the frequencies of these alleles to be determined in these populations. Because genetic polymorphisms vary among different population groups, the heterogeneity of the Brazilian populations will contribute relevant information to the understanding of the causes of complex diseases, such as malaria. These studies also contribute knowledge on the evolution a functional implications of genetic polymorphisms.

Concluding Remarks

The development of the immune response depends on a cellular and molecular complex that is essential for the protection of humans against infectious agents, autoimmune diseases and tumors. For the immune response to adequately occur, a balance is needed in the ability of the cells to respond to infectious agents and to suppress autoimmunity [52]. Thus, polymorphisms associated with modulation of the expression of genes that encode immune response co-stimulatory molecules might influence the occurrence of various diseases; indeed, several recent studies demonstrated this association [53].

Variability in genes that encode molecules involved in the immune response is associated with changes in the pattern of parasitemia, clinical aspects and susceptibility to disease. The current knowledge about the genes involved in the immune response and the implications of their variability for the cause of disease has been greatly advanced by data resulting from human genome sequencing. IL-2 is a cytokine that contributes to the differentiation and survival of regulatory T cells, thereby ensuring their significance in the control of the immune response and their effective participation in the pathogenesis of several pathological conditions, such as cancer and metabolic, infectious, autoimmune and inflammatory diseases [11,12]. Therefore, IL-2 plays multiple roles in immune functions by contributing to the generation and propagation of antigen-specific immune responses [13]. Although the relevant role of this molecule in the immune response is known,

more studies on its function are needed, especially concerning parasitic infectious diseases.

Acknowledgments

To all individuals enrolled in this study.

Funding Information

This study was partially supported by Laboratory of Malaria Immunogenetics, Evandro Chagas Institute/Health Ministry, Pará, Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazil.

References

- Gaffen SL, Liu KD (2004) Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28: 109-123.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, et al. (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 26: 410.
- Salazar-Onfray F, Lopez MN, Mendoza-Naranjo A (2007) Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine & growth factor reviews* 18: 171-182.
- Nelson AJ, Staines WR, McIlroy WE (2004) Tactile stimulus predictability modulates activity in a tactile-motor cortical network. *Exp Brain Res* 154(1):22-32.
- Lenardo MJ (1991) Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353: 858-861.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787.
- Smith AJP, Humphries SE (2009) Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20:43-59.
- D'Souza WN, Lefrançois L (2003) IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *Journal of Immunology* 171: 5727-5735.
- Malek TR, Bayer AI (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature Reviews/Immunology* 4: 665-674.
- Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, et al. (2008) IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 28: 635-639.
- Mok CC, Lau CS (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56: 481-490.
- Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S (2006) Interleukin-6 transsignalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* 63: 321.
- Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH (2002) Cytokines for surgeons. *Am J Surg* 183:268-273.
- Yu HB, Yurieva M, Balachander A, Foo I, Leong X, et al. (2015) NFATc2 mediates epigenetic modification of dendritic cell cytokine and chemokine responses to dectin-1 stimulation. *Nucleic Acids Res* 43: 836-847.
- Waxman J, Balkwill F (1992) Interleukin 2. Blackwell Sci Publ.
- Halama N, Zoernig I, Jaeger D (2010) Advanced malignant melanoma: immunologic and multimodal therapeutic strategies. *Journal of oncology* 689893.
- Hatakeyama M, Tsudi M, Minamoto S, Kono T, Doi T, et al. (1989) Interleukin 2 receptor beta chain gene: generation of the three receptor forms by cloned human alpha and beta chain DNAs. *Science* 244: 551-556.
- Driss A, Hibbert JM, Wilson NO, Iqbal SA, Adamkiewicz TV, et al. (2011) Genetic polymorphisms linked to susceptibility to Malaria. *Malaria Journal* 10: 271.

Citation: Capobianco MP, Cassiano, GC, da Cruz Furini AA, Storti de Melo LM, Domingos CRB, et al. (2018) Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review. *J Cytokine Biol* 1: 109.

Page 4 of 4

19. Bluestone JA, Bour-Jordan H, Cheng M, Anderson M (2015) T cells in the control of organ specific autoimmunity. *J Clin Invest* 125: 2250-2260.
20. Yu A, Malek TR (2001) The Proteasome Regulates Receptor-mediated Endocytosis of Interleukin-2. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 381-385.
21. Marmor MD, Julius M (2001) Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Immunology* 98: 1489-1497.
22. Saito H, Tsujitani S, Katano K, Ikeguchi M, Maeta M, et al. (1998) Levels of serum-soluble receptor for interleukin-2 in patients with colorectal cancer. *Surgery today* 28(10):1115-1117.
23. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, et al. (1999) In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 26: 1-3.
24. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL (2008) Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 17: 3532-3538.
25. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW (1992) Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1: 353.
26. Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, et al. (2008) TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet* 35: 287-293.
27. Fujita T, Takaoka C, Matsui H, Taniguchi T (1983) Structure of the human interleukin 2 gene. *Proc Natl Acad* 80: 7437-7441.
28. Amirzargar AA, Bagheri M, Ghavamzadeh A, Alimoghdam K, Khosravi F, et al. (2005) Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenousleukaemia. *International Journal Immunogenetic* 32:167-171.
29. Shin WG, Jang JS, Kim HS, Kim SJ, Kim KH, et al. (2008) Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-2 genes in patients with gastric cancer in Korea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23: 1567-1573.
30. Wu J, Lu Y, Ding YB, Ke Q, Hu ZB, et al. (2009) Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Molecular Carcinogenesis* 48: 626-632.
31. Togawa S, Joh T, Itoh M, Katsuda N, Ito H, et al. (2005) Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 10: 172-178.
32. Matesanz F, Fedetz M, Leyva L, Delgado C, Fernandez O, et al. (2004) Effects of the multiple sclerosis associated - 330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. *Journal of Neuroimmunology* 148: 212-217.
33. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, et al. (2001) Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28- stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72(8):1444-1450.
34. Wu HC, Chang CH, Wan L, Wu CI, Tsai FJ, et al. (2006) IL-2 gene C/T polymorphism is associated with prostate cancer. *Journal of clinical laboratory analysis* 20: 245-249.
35. Ober C, Hoffman S (2006) Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 7: 95-100.
36. Padrón-Morales J, Sanz C, Dávila I, Muñoz-Bellido F, Lorente F, et al. (2013) Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 23: 487-494.
37. John S, Myerscough A, Marlow A, Hajeer A, Silman A, et al. (1998) Linkage of cytokine genes to rheumatoid arthritis Evidence of genetic heterogeneity. *Ann Rheum Dis* 57: 361-365.
38. Bucheton B, Argiro L, Chevillard C, Marquet S, Kheir MM et al. (2007) Identification of a novel G245R polymorphism in the IL-2 receptor β membrane proximal domain associated with human visceral leishmaniasis. *Genes Immun* 8: 79-83.
39. Bucheton B, Abel L, El-Safi S, Kheir MM, Pavek S, et al. (2003) A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *Am. J. Hum. Genet* 73: 1052-1060.
40. Rummel T, Batchelder J, Flaherty P, Lafleur G, Nanavati P, et al. (2004) CD28 Costimulation Is Required for the Expression of T-Cell-Dependent Cell-Mediated Immunity against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* Malaria Parasites. *Infection and Immunity* 72: 5768-5774.
41. Walther M, woodruff J, Edele F, Jeffries D, tongren JE, et al. (2006) Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogeneous Cytokine Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes. *Journal of Immunology* 177: 5736-5745.
42. Medina TS, Costa Sp, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, et al. (2011) Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria Journal* 10: 264.
43. Jain V, Singh PP, Silawat N, Patel R, Saxena A, et al. (2010) A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. *Acta Tropica* 113: 263-268.
44. Wipasa J, Okell L, Sakthachornphop S, Suphavitai C, Chawansuntati K, et al. (2011) Short-Lived IFN- γ Effector Responses, but Long-Lived IL-10 Memory Responses, to Malaria in an Area of Low Malaria Endemicity. *PLoS Pathogens* 7.
45. Elias RM, Sardinha LR, Bastos KR, Zago CA, Silva AP, et al. (2005) Role of CD28 in Polyclonal and Specific T and B Cell Responses Required for Protection against Blood Stage Malaria. *Journal of Immunology* 174: 790-799.
46. Sohail M, Kaul A, Bali P, Raziuddin M, Singh MP, et al. (2008) Alleles -308A and -1031C in the TNF α gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF α and clinical features of vivax malarial in Indian patients. *Molecular Immunology* 45:1682-1692.
47. Cavasini CE, De Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, et al. (2007) Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal* 6: 167.
48. Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, et al. (2010) *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 5967-5971.
49. Oliveira-Ferreira J, Pratt Riccio LR, Arruda M, Santos F, Ribeiro CT, et al. (2004) HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Tropica* 92: 63-69.
50. Duah NO, Weiss HA, Jepson A, Tetteh KK, Whittle HC, et al. (2009) Heritability of Antibody Isotype and Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens. *PLoS One* 4: 7381.
51. Storti-Melo LM, Da Costa DR, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Couto VS, et al. (2012) Influence of HLA-DRB1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. *Acta Tropica* 121: 152-155.
52. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol* 23:515-548.
53. Zayed RA, Sheba HF, Abo Elazem MA, Elsaadany ZA, Elmessery LO, et al. (2013) B-cell activating factor promoter polymorphisms in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci* 43:289-294.

Title: Parasite-host interaction in malaria vivax: genetic plus immunological clues and Circumsporozoite Protein

Short title: Parasite-host interaction in malaria vivax

Marcela Petrolini Capobianco^{1*}, Gustavo Capatti Cassiano², Adriana Antônia da Cruz Furini³, Luciane Moreno Storti de Melo⁴, Cláudia Regina Bonini-Domingos¹, Rafaela Procópio Oliveira⁵, Tamirys Pina Simão⁵, Ana Paula Drummond Rodrigues⁶, Felipe Bonfim Freitas⁵, Daniele Regina Lima Barbosa⁵, José Eduardo Gomes Arruda⁷, Joseli Oliveira-Ferreira⁸ and Ricardo Luiz Dantas Machado^{1,5}

¹Graduate Program in Biociências, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ²Laboratory of Tropical Diseases – Prof. Luiz Jacintho da Silva, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ³Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Biology, Federal University of Sergipe, Aracajú, Sergipe, Brazil. ⁵Laboratory of Malaria Immunogenetics, Evandro Chagas Institute/Health Ministry, Pará, Brazil. ⁶ Electron Microscopy Laboratory, Evandro Chagas Institute/Health Ministry, ⁷University Federal do Pará, Belém, Brazil. ⁸Fundação Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

***Corresponding author:** mpcapobianco@yahoo.com.br

Abstract

It is well established that infection by *Plasmodium vivax* is a result of host-parasite interactions. This study evaluated polymorphisms in the *IL1* and *IL2* genes and of the central portion of the circumsporozoite protein (CSP) and correlated them with the cytokine profiles, anti-CSP antibody levels and parasitic loads of 138 individuals naturally infected with *P. vivax* in an endemic area of the Brazilian Amazon. Molecular diagnosis of *P. vivax* and variants was performed using the PCR-RFLP method, and IL-1 β and IL-2 cytokine levels

were detected by flow cytometry. *IL1B* -511C>T, *IL2* -330T>G and *IL2* +114T>G polymorphisms were identified using PCR-RFLP and allele-specific PCR. CSP antibodies were measured by ELISA. Three variants of *P. vivax* CSP were identified, and VK247 was found to be the most frequent. However, the prevalence and magnitude of IgG antibodies were higher for the VK210 variant. Furthermore, the antibody response to the CSP variants was not associated with the presence of the variant in the infection. Significant differences were observed between SNP -511T>C in the *IL1B* gene and levels of antibodies to the VK247 and *P. vivax*-like variants, but there were no associations between SNPs in genes *IL1* and *IL2* and their plasma products. Studies of associations of cytokine gene SNPs in the humoral immune response to malaria are still incomplete, and the results have been contradictory. Given that the evolution of malaria results from the interaction of factors inherent to both parasite and host, this study helped to identify genetic variants that may influence the humoral immune response against malaria, particularly *P. vivax*.

Keywords: Circumsporozoite protein (CSP), IL-1, IL-2, polymorphisms, antibodies

Author Summary

The immunopathogenesis of *P. vivax* remains unclear. New evidence suggests that serious vivax malaria complications may be more common than previously thought. Moreover, the diversity of clinical manifestations can also be attributed to each host's immune response. The immune response to malaria involves innate and adaptive mechanisms and includes the participation of various cell types and antibodies that may be responsible for eliminating the agent or immunopathology. We investigated circumsporozoite protein (CSP) polymorphisms in the parasite and in human *IL1* and *IL2* cytokine genes to verify their effect on the immune response to *P. vivax*. Infections containing only the VK247 variant were the most common, followed by simple infections with the VK210 variant and mixed infections containing the VK210 and VK247 variants. *P. vivax*-like was detected in only one sample. The CSP variant did not affect cytokine plasma levels, and there were no positive associations between the SNPs of IL-1 and IL-2 and their plasma levels. Significant differences were observed in SNP rs16944 in the *IL1B* gene between levels of antibodies to the

VK247 and *P. vivax*-like variants. Therefore, routine investigation of these factors should be performed.

Introduction

Malaria caused by *Plasmodium vivax* accounts for approximately 50% of malaria cases that occur outside Africa. In Brazil, the majority of detected cases are caused by this protozoan species [1]. Infections caused by *P. vivax* have a variety of symptoms, ranging from asymptomatic infections to more serious complications, such as severe anemia, acute respiratory failure and eventual death [2]. It is well established that infection results from parasite-host interactions and the nature of the generated immune response.

Mechanisms mediated by both antibodies and cells are essential to confer clinical protection against malaria [3, 4]. The protective roles of antibodies against the different stages of the parasite include a variety of mechanisms, such as invasion blocking [5], opsonization [6] and antibody-dependent cellular cytotoxicity [7]. Moreover, cytokine production is crucial in the control of disease symptoms and parasitemia. Some studies have suggested that the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines appears to be important in the control of clinical symptoms, parasitemia levels, degree of anemia and clinical evolution of severe infection. However, to date, the role of cytokines in the pathogenesis of malaria and their relationship to protection remain unclear [8, 9, 3, 10].

IL-1 and IL-2 are important proinflammatory cytokines involved in the early immune response to infection. IL-1 is an endogenous pyrogen that mediates its response via two cytokines, IL-1 α and IL-1 β . IL-1 has a broad spectrum of biological responses, acting mainly as a T cell proliferation stimulant and also as a co-factor in the proliferation and activation of B cells. Its excessive production is harmful and contributes to inflammatory diseases [11]. In malaria, it is believed that high IL-1 serum levels play a role in disease severity [12]. IL-2 is mainly produced by activated T cells, especially in the presence of IL-1 and IFN- α , and it is important for the growth and differentiation of different subpopulations of T cells and, to a lesser degree, B cells.

Furthermore, it is an important activator of IFN- γ and TNF- α secretion [13,14]. In malaria, IL-2 is produced by the patient's T cells in response to *P. falciparum* antigens [15] and enhances the lytic activity of NK cells against schizonts [16].

It has been well established that different strains of *Plasmodium* maintained in the laboratory and isolated from patients from malaria endemic areas may differ in their ability to induce an immune response. Although the molecular mechanisms involved in the parasite's virulence are still poorly understood, it is likely that polymorphisms in immunogenic parasite antigens are important. One of the most studied of these different antigens is circumsporozoite protein (CSP). This protein is multifunctional, acting on sporozoite maturation, salivary gland invasion in the mosquito and hepatocyte invasion at the start of the pre-erythrocytic cycle in humans [17]. This protein is the most abundant on the surface of the sporozoite and has high immunogenic potential. This molecule has been identified as a principal target in developing a recombinant anti-malaria vaccine, as it induces a good specific humoral response, similar to that observed in natural human exposure to malaria [18]. The *P. vivax* CSP gene has a central immunodominant region of tandem repeats flanked by two highly conserved regions that encode the amino terminal (N) and carboxy-terminal (C) regions. The central repetitive region (R) of *P. vivax* CSP is polymorphic and is the most immunogenic portion; three major allelic forms of PvCSP have been described - VK210, VK247 and *P. vivax*-like; [19, 20]. A recent study showed that variants may differ in the course of infection, such as in terms of parasite burden and cytokine production [21].

In addition to variations in the parasite, growing evidence shows that *host genetic background* can contribute to marked differences between individuals in the course of infection, generating frequently conflicting results in host-parasite interaction studies. For this reason, it is valuable to identify which genes could be important in the host response to malaria infection, as this could provide insights into the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of and immunity to malaria. In this manner, we can highlight the factors involved in immune response regulation, including the polymorphisms in molecule encoding genes, which are important humoral and cellular immune response mediators [22, 23, 24, 25, 26, 27]. The objective of this study was therefore to

further investigate parasite and host polymorphisms that may affect the immune response to *P. vivax*. To this end, we characterized the humoral immune response to *P. vivax*'s CS protein and variants VK 210, VK 247 and *P. vivax*-like and evaluated the effect of *IL1* and *IL2* gene polymorphisms on modulation of the humoral immune response and the parasitic load of naturally infected individuals in an endemic area of the Brazilian Amazon.

Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Júlio de Mesquita Filho São Paulo State University (Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Unesp) under protocol number 331,162. All study participants signed written terms of informed consent."

Sample

This study included 138 patients from a previous study in the Goianésia do Pará municipality of Pará, Brazil (These samples were first analyzed by Cassiano et al., 2015) [28]. This region was among the five municipalities that accounted for 50% of malaria cases in the State of Pará in 2012, which was the blood sample collection period. Patients were included in the study after confirmed infection with *P. vivax*, diagnosed by TBF (thick blood film) and molecular protocol [29], before starting treatment.

Cytokine assay

A CBA Kit (BD) (cytometric bead array) was used in this study to quantify the IL-1 β and IL-2 cytokines according to the protocol described by Walther et al. (2006) [30]. Briefly, sera and cytokine patterns from the kit were incubated with capture beads coated with antibodies specific to the respective cytokines and with detection antibody labeled with phycoerythrin (PE). After incubation, a wash solution was added and centrifuged. The supernatant was discarded, and

the samples were resuspended for acquisition on a FACSCanto type II flow cytometer (Becton Dickinson, San José, CA, USA). A standard curve was generated for each cytokine and analyzed using FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The results were analyzed using FCAP Array 3.0 software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Raw FIM (Fluorescence Intensity Mean) values were quantified for each cytokine. Values were expressed in pg/ml for each cytokine in comparison to the standard curve. The measurements were performed in duplicate, and the arithmetic mean of the two values was used for analysis.

Evaluation of genetic polymorphisms in the *IL1B* (-511C>T) gene

For the analysis of polymorphisms in the *IL1B* -511C>T (rs16944) gene, the DNA samples were amplified using the PCR-RFLP method according to Cantagrel et al. 1999 [31]. The size of the resulting amplified fragment was approximately 305 bp, which was digested with restriction endonuclease Eco 881. The presence of the T allele was identified by one 305 bp fragment and the C allele by the presence of 115 and 190 bp fragments.

Genotyping of SNP -330T/G and +114T/G in the *IL2* gene

Determination of SNP +114T>G (rs2069763) was performed using the PCR-RFLP method according to Song et al. 2012 [32]. The size of the resulting amplified fragment was 262 bp. After digestion with the *MwoI* enzyme, the G allele was identified by formation of 111 and 151 bp fragments, while there was no T allele cleavage.

The determination of SNP -330T>G (rs2069762) was performed using the allele-specific PCR method (PCR-CTPP) according to the protocol described by Togawa et al. (2005) [33]. The resulting G allele fragment was 215 bp, while the T allele fragment was 152 bp.

***Plasmodium vivax* CSP gene fragment amplification using the PCR-RFLP method**

The *P. vivax* CSP variants were analyzed using the PCR-RFLP method. Amplification was performed as described by Cassiano et al. (2011) [34] with modifications. A reaction mix was prepared with a final volume of 25 µL,

containing *P. vivax* DNA, 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.2 μM each primer (5' AGGCAGAGGACTTGGTGAGA 3' and 5' CCACAGGTTACACTGCATGG 3') and 1 U of Platinum Taq (Invitrogen). The reaction was carried out in a thermocycler (DNA Mastercycler, Eppendorf, Germany) as follows: an initial cycle at 94°C for 15 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. As a positive control, we used three plasmids containing a gene insertion of the CSP repetitive portion from the variants amplified from *P. vivax* VK210, VK247 and *P. vivax*-like (Bluescript Stratagene, La Jolla, USA). Sterile water was used for the negative control. The digestion reaction was performed in a final volume of 20 μL, containing 10 U of *AluI* (Invitrogen), 2 μL of enzyme reaction buffer, 10 μL of PCR product and 7 μL of DNase-free sterile water. The reactions were performed overnight in a water bath at 37°C.

Evaluation of serological response to *P. vivax* CSP

Anti-CSP antibodies were detected using synthetic peptides corresponding to the immunodominant epitope of the repetitive regions of the *P. vivax* CSP (PvCSP) gene as described by Cochrane et al. (1990) [35]. Briefly, 96-well plates (Maxsorp) were incubated overnight at 4°C with antigens at concentrations of 1 μg/mL for the VK210 variant and 5 μg/mL for the VK247 and *P. vivax*-like variants. After the incubation period, the antigens were blocked with BSA (Sigma-Aldrich, USA). The sera were diluted at a ratio of 1/100 in PBS-T-2.5% BSA and applied to the 96-well plate (Corning, New York, USA) in duplicate. After washing, 100 μL of anti-human IgG conjugate labeled with peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 1 hour. After a second washing, 100 μL of substrate [ortho-phenylenediamine and hydrogen peroxide (Merck, Darmstadt, Germany)] was added to each well and again incubated at 37°C for 1 hour. The reaction was stopped with 100 μL of 1% H₂SO₄ solution.

Sera from 25 control (non-malarial) samples from Rio de Janeiro were used as a negative control (These samples were first analyzed by Cassiano et al., 2015) [28]. The cutoff value was determined to be the mean optical density

(OD) + three standard deviations of the control samples (cut-off values: VK210 = 0.073; VK247 = 0.060; *P. vivax*-like = 0.070). To homogenize the OD data obtained in the different experiments, the reactivity index (RI) was calculated for each sample by dividing the mean OD of the sample tested by the OD cut-off value of each experiment. Samples with RI > 1.0 were considered positive.

Statistical analysis

Genotypic and allelic frequencies and those of individuals with each allele were estimated by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was evaluated using the Bioestat v.5.3. Statistical analyses were performed using R version 3.0.0. The charts were created using GraphPad Prism v5.01. For univariate analysis, differences in proportions were measured using the Chi Square test, and differences in medians were tested using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. Correlations were measured using the Spearman coefficient. Association analyses involving SNPs were performed using the SNPAssoc R package [36]. The SNPs were tested following different genetic models (co-dominant, dominant or recessive) in multivariate logistic regression models using covariates, such as age, gender and malaria history. p values less than 0.05 were considered significant.

Results

Study subjects

There was a greater frequency of males in the studied subject group (71%). The mean age was 29.8 (SD $\pm$ 14.1) years. Of the 122 individuals who remembered already having contracted malaria in the past, only eight reported never having had a previous episode of malaria. Parasitemia data were available for 94 samples, and the mean parasitemia was 769.3 parasites/mm³ (95% CI: 494.3 - 1197.4).

CSP genotyping

The *P. vivax* CSP gene was successfully amplified in 131 (94.9%) of the samples included in this study. Infections containing only the VK247 variant were the most common (45.8%), followed by simple infections with the VK210

variant (36.6%) and mixed infections containing the VK210 and VK247 variants (13.7%). The *P. vivax*-like variant was detected in isolation in only one sample, and four samples had mixed infections of the three variants. There was no significant difference in parasitemia between the VK210 variant (geometric mean = 460.2 parasites/mm³, 95% CI: 224.3 - 903.6) and VK247 variant (geometric mean = 965.9 parasites/mm³, 95% CI: 562.9 – 1657.6) ($p = 0.20$, Mann-Whitney test).

Antibody recognition of PvCSP variants

Of the 133 individuals infected with *P. vivax*, 28.2% had antibodies specific to at least one CSP variant. The frequency of responders for the VK210, VK247 and *P. vivax*-like variants was 22.6%, 8.3% and 12.0%, respectively (Fig 1A). The prevalence and reactivity index of CSP antibodies was higher for the VK210 variant than for VK247 ($p = 0.001$). Regarding the magnitude (RI) of the IgG response, higher levels were observed for the VK210 variant (median = 0.60; IQ: 0.43 - 0.87) than for the VK247 (0.39; IQ: 0.30 - 0.52) and *P. vivax*-like (0.43; IQ: 0.36 - 0.62) ($p < 0.0001$) variants (Fig 1B). There was a significant correlation between IgG antibody levels for all three variants (Fig 1C-E).

Figure 1. Naturally acquired IgG antibodies against PvCSP variants. A) Frequency of IgG responders against the three PvCSP variants. B) Differences in IgG antibody levels (RI) for the three PvCSP variants (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$). C) Significant Spearman correlation between specific antibody levels against the VK210 and VK247 variants ($r = 0.236$, $p = 0.006$); D) VK210 and *P. vivax*-like ($r = 0.221$, $p = 0.01$) and; E) VK247 and *P. vivax*-like ($r = 0.874$, $p < 0.0001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

We tested whether demographic variables (gender, age, previous history of malaria and residence time in the study area) could affect the antibody response to PvCSP; the only significant association was the higher proportion of women among individuals with *P. vivax*-like variant antibodies ($p = 0.02$) (Table 1).

Effect of CSP genotype on antibody production

There was no significant difference in antibody responses between individuals infected with the different variants. It is noteworthy that in individuals who did not have antibodies and in those who did, responder frequency was not associated with the infecting variant. The VK210 responder frequency was similar among individuals infected with the VK210 variant compared to individuals who were not infected with VK210 (24.3% vs 19.7%, $p = 0.67$). Likewise, the presence of the VK247 variant at collection time did not increase the frequency of VK247 responders (8.5% vs 8.2%, $p = 1.0$). Moreover, there was no significant difference in CSP antibody reactivity rate according to the variant present in the infection (VK210 or VK247) (Fig 2). Because only one sample contained a simple *P. vivax*-like variant infection, further analysis was not performed on this variant.

Figure 2. Anti-CSP antibody levels in relation to the presence of variants in infection. A) Anti-VK210 antibody levels according to the presence of the VK210 variant in the infection ($p = 0.1$). B) Anti-VK247 antibody levels according to the presence of the VK247 variant in the infection ($p = 0.57$).

Single nucleotide polymorphisms and their association with antibody response

SNPs in the *IL2* (rs2069762 and rs2069763) and *IL1B* (rs16944) genes were genotyped in 77 samples. The genotypic frequencies are presented in Table 1. HWE was observed only for SNP rs16944 ($p = 0.02$). The SNPs were evaluated in relation to anti-CSP antibody levels (Table 1). Significant differences were observed in SNPs in the *IL1B* rs16944 gene between levels of antibodies to the VK247 and *P. vivax*-like variants. Individuals with the CC genotype had higher levels of anti-VK247 antibodies than did individuals with CT + TT (0.77 vs 0.47, $p = 0.003$). Furthermore, it was observed that individuals with the CC genotype also had more anti-*P. vivax*-like antibodies (0.94 vs 0.55, $p = 0.001$).

Table 1. Polymorphism frequency and association with levels of anti-CSP variant antibodies

Gene	SNP	n (%)	VK210		VK247		<i>P. vivax</i> -like	
				p ^a	Negative	p ^a	Negative	p ^a
<i>IL1B</i>	rs16944			0.14		0.005		0.005
	<i>C/C</i>	12 (15.6)	0.66 ± 0.71		0.77 ± 0.76		0.95 ± 0.86	
	<i>C/T</i>	49 (63.6)	0.59 ± 0.29		0.44 ± 0.21		0.53 ± 0.36	
	<i>T/T</i>	16 (20.8)	0.94 ± 0.53		0.56 ± 0.29		0.64 ± 0.34	
<i>IL2</i>	rs2069762			0.54		0.25		0.07
	<i>G/G</i>	3 (3.9)	0.62 ± 0.36		0.37 ± 0.01		0.44 ± 0.03	
	<i>G/T</i>	27 (35.1)	0.81 ± 0.64		0.59 ± 0.53		0.74 ± 0.68	
	<i>T/T</i>	47 (61.0)	0.60 ± 0.30		0.48 ± 0.27		0.55 ± 0.34	
<i>IL2</i>	rs2069763			0.31		0.93		0.99
	<i>G/G</i>	32 (42.1)	0.63 ± 0.52		0.51 ± 0.47		0.61 ± 0.58	
	<i>G/T</i>	40 (52.6)	0.69 ± 0.40		0.52 ± 0.31		0.60 ± 0.41	
	<i>T/T</i>	4 (5.3)	0.84 ± 0.52		0.58 ± 0.33		0.83 ± 0.44	

^ap values are based on fitting logistic regression models adjusting for gender, age and previous malaria infection

Cytokine profile

IL-1 β and IL-2 cytokine plasma levels were measured in 79 patients infected with *P. vivax*; of these, 24 patients met or exceeded the detection limit for IL-1 β (median 10.73 pg/mL; IQR: 4.41 – 28.32). On the other hand, IL-2 levels exceeded the detection limit in only 7 samples (median 13.35 pg/ml, IQR: 12.1 - 17.1). There was no significant correlation between IL-1 β and IL-2 levels (Spearman's rho = 0.128, p = 0.26). There was also no significant correlation between the levels of interleukins with parasitemia and anti-CSP variant antibody levels (Table 2).

Table 2. Correlation between cytokine levels and parasitemia and anti-CSP antibodies

Spearman's rho, p-value				
Variable	Parasitemia	VK210	VK247	<i>P. vivax</i> -like
IL-1 β	0.039, 0.73	0.034, 0.77	-0.143, 0.22	-0.156, 0.18
IL-2	0.068, 0.55	-0.171, 0.14	0.067, 0.57	0.091, 0.44

Influence of CSP variants on cytokine levels

The CSP variant did not affect the cytokine plasma level. As shown in Figure 3 (Fig 3), there was no significant difference in the levels of IL-1 β (p =

0.89) and IL-2 ($p = 0.07$) between infections containing the VK210 and VK247 variants.

Figure 3. Cytokine profile among infections containing the VK210 and VK247 variants. Cytokines were measured by CBA. The bars represent the medians and interquartile ranges of the groups. P values were determined by nonparametric Mann-Whitney U tests.

Association of polymorphisms in *IL1B* and *IL2* genes with their products

Regardless of the tested genetic model (co-dominant, recessive or dominant), no significant associations were observed between SNP rs16944 in the *IL1B* gene and IL-1 β levels or between SNPs rs2069762 and rs2069763 in the *IL2* gene and IL-2 levels (Fig 4).

Figure 4. Association between the SNPs *IL1B* rs16944 (A), *IL2* rs2069762 (B) and *IL2* rs2069763 (C) and their genetic products. The bars represent the medians and interquartile ranges. There was no significant difference when using different genetic models.

Discussion

Understanding the dynamics of transmission and genetic structure of the *P. vivax* population is important in predicting the emergence and distribution of different strains of the parasite, which may differ in terms of virulence and drug resistance. This is particularly important when we consider the CSP gene, the principal sporozoite surface antigen, which is crucial for this stage of the parasite's development [4]. This gene has been shown to be a valuable marker in studies of population genetics, especially for *P. vivax* because in this species, the central repetitive region of the protein is marked by tandem repeats, and three types of *peptide repeat motifs* are recognized, defining the VK210, V247 and *P. vivax*-like variants [37, 38]. Using serological and/or molecular approaches, different authors have evaluated the occurrence of *P. vivax* CSP

variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in endemic areas of the Amazon. Both the VK210 and VK247 variants are widely distributed [18, 19,39, 40, 41]; VK210 predominates in many areas of Brazil and in some other areas, VK247 has been limited, and in other regions, mixed genotype infections have been evidenced [42,18]. Recently, the presence of VK247 in single infections has been identified in two areas of the state of Pará (Novo Repartimento [18] and Goianésia do Pará [43]) and in the Oiapoque municipality in the state of Amapá [44]. However, in contrast to the findings of most of these studies, the VK247 variant was found in greater frequency in our population. This result is particularly important from an epidemiological point of view because it has been shown that infections with the V247 variant have a higher parasitic burden and prevalence of inflammatory cytokines, which could result in major complications [21]. The reasons for the frequency variables found for *P. vivax* CSP variants are unclear but may be related to epidemiological transmission conditions. It has been reported that different vector species have different susceptibilities to each variant. For example, *Anopheles darlingi*, *An. Aquasalis* and *An. Albimanus* are more susceptible to the VK210 variant than the VK247 variant [45, 46]; in turn, VK210 ookinetes fail to develop in the intestinal epithelium of *An. pseudopunctipennis* [47]. Thus, the population genetic structure of *P. vivax* is probably conditioned to the local vector species, which may facilitate the introduction or exclusion of new strains and genotypes with favorable transmission conditions. Another condition that likely contributes to the dynamics and genetic structure of the parasite population is the immune status of the human host because the CSP's repetitive central region, which characterizes the *P. vivax* variants, contains B cell epitopes. Antibodies specific to this region are able to block invasion of sporozoites into the hepatocytes [48] and are correlated with protection [49]. The higher frequency of VK247 infections where the population presents higher antibody responses to VK210 can therefore be explained. However, this hypothesis can hardly be applied to our population for two reasons: 1) the low proportion of individuals with anti-VK210 antibodies (22.6%) and 2) the fact that we found no association between the presence of this variant at the time of infection and CSP-specific antibodies.

Knowledge of the naturally acquired immune response is essential for the development of vaccination strategies. This is particularly important for the CSP, which is a principal candidate antigen for the *P. vivax* vaccine. In the present study, we evaluated the specific IgG antibody response to each *P. vivax* variant. Previous studies have shown that antibodies to the three variants are present in different endemic areas of the Brazilian Amazon [50, 19, 51]. We found a greater frequency of anti-VK210 responders and antibody levels than for the other variants. Interestingly, this increased anti-VK210 IgG antibody response does not seem to be due to greater exposure to this variant because a greater frequency of infections containing the VK247 variant was found. This result therefore probably reflects the increased antigenicity of VK210, as shown in other studies [52, 53]. Another important result was the detection of anti-*P. vivax*-like variant antibodies. Although this variant was recognized in the early 1990s in Papua New Guinea [38], several studies across the world have failed to detect it [40, 54, 55]. However, coupled with the detection of some samples containing this infection, the presence of antibodies to this variant indicates that *P. vivax*-like circulation occurs at low frequencies in the Brazilian Amazon. Similar results have been observed in different Amazonian regions in Brazil [18, 50, 51] and French Guiana [56].

Generally, the seropositivity of individuals with anti-CSP repeat antibodies was low (28.2%, considering the three variants). The responder frequency was similar to that observed in other areas of the Brazilian Amazon [50, 51, 57] but less than that found in other studies, including studies conducted in Brazil [53, 58, 59]. In fact, the frequency of *P. vivax* CSP responders depends on different factors, such as endemicity conditions and the human host's background [50, 58, 60]. For this reason, we investigated whether polymorphisms in the *IL1B* and *IL2* genes might be associated with IgG antibody responses to CSP variants. It is known from studies with human and murine models that cytokines play a key role in immune modulation in malaria, participating in parasitemia control and physiopathogenesis of the disease, depending on their cellular and circulating levels [61].

IL-1 may increase the humoral immune response by stimulating B cell differentiation and increasing immunoglobulin proliferation and secretion [62].

The role of IL-2 in antibody production is controversial. While synergy with IL-10 appears to increase IgG production by B cells activated by *Staphylococcus aureus* [63], IL-2 infusion increases cell-mediated cytotoxicity and decreases the total amount of IgG generated in patients with hematological malignancy [64].

We therefore analyzed two polymorphisms in the *IL2* gene (+114T>G and -330T>G). In position -330T>G, the most frequent genotype was TT (60.46%), and the most frequent allele was T (96.5%). For the +114T/G position, the most frequent genotype was TG (54.1%), and the allele was G (95.3%). Similar results were found by Togawa et al. (2005) [33] for position -330 in Japanese subjects, demonstrating that the most frequent genotype was TT (39.6%). Song et al. (2012) [32] evaluated these two SNPs in the *IL2* gene in Chinese subjects and found that the most frequent genotype at position -330 was TG; however, the most frequent allele was T. In position +114, the most frequent genotype was TG, and the most frequent allele was also T. This suggests, therefore, that the composition and pressure of parasitic infectious and autoimmune diseases can alter the polymorphism pattern of this gene in different areas of the world. Additionally, in analyzing polymorphisms of the *IL1B* gene in the -511 position in individuals infected with *Plasmodium falciparum*, Israelsson (2011) [65] suggested that the presence of a polymorphic allele can affect disease susceptibility. This same SNP was also associated with the presence of anemia in patients with severe malaria [65].

The presence of the G allele for SNP -330T/G, located in the promoter region of the *IL2* gene, is associated with increased susceptibility to cancers and inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis and myeloid leukemia [66,67,68]. In addition, this allele is also associated with changes in levels of this cytokine [67, 68]. Studies have also reported that T lymphocytes from patients with SNP -330G/G were capable of producing a greater quantity of IL-2 protein than those with -330T/G or T/T, suggesting that the identification of G-330T (rs2069762) in this promoter region can influence the production of this protein in healthy subjects [69].

In the present study, we found that individuals with the genotype CC for SNP *IL1B* -511C>T (rs16944) showed a higher IgG antibody response to the VK247 and *P. vivax*-like variants. This SNP has recently been studied in various diseases, and the T allele has been associated with an increased risk of septic shock [70], gastric cancer [71] and cervical cancer [72]. In malaria, the allelic frequencies of this SNP did not differ between symptomatic and asymptomatic individuals in the Fulani ethnic group [65], but it has been associated with severe anemia in patients with falciparum malaria in Kenya [73]. Interestingly, this SNP did not affect IL-1 β plasma levels in our study. In fact, previous studies have failed to associate this SNP in isolation with relevant changes in gene transcription [74, 75]. This SNP is located *upstream of the transcription start site*, in the gene's promoter region; a high linkage disequilibrium between SNPs located in this region has been demonstrated, and changes in gene expression appear to be more affected by haplotypes than by specific SNPs [74]. It is therefore likely that SNP rs16944 is not responsible for these changes but that it may be in linkage disequilibrium with the true causal variant or participates in the context of certain haplotypes. Thus, one of the limitations of this study was the evaluation of only a single SNP in the *IL1B* gene. New studies evaluating greater genetic coverage of the *IL1B* gene with a larger sample size will therefore help to confirm the participation of this SNP in the humoral response against *P. vivax*.

In conclusion, studies of possible SNP associations in cytokine genes in the humoral immune response to malaria remain scarce in vivax malaria, and the results have been contradictory. The majority of studies have been performed on experimental models and/or with *P. falciparum*. Molecular parameters of *P. vivax* CSP's central portion and their association with the proinflammatory cytokine and anti-CSP antibody profile offer significant results in regard to this evaluation in the Brazilian Amazon. As the evolution of malaria results from the interaction of factors inherent to both parasite and host, the genetic variability of both should be considered with respect to the disease process. Therefore, routine investigation of these aspects should be performed.

Acknowledgements

We thank the residents of the municipality of Goianésia do Pará, who made this study possible. We are also thankful to Darci Rodrigues, who helped with sample collection, and Valéria Fraga and Luciana Conceição for their help with laboratory analyses.

Ethics considerations

All subjects involved in this study signed the consent form. All of these individuals were 18 years of age or older

References

1. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2013.
2. Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, Filho FS, Brasil P, Ventura AM, Tada MS, Couto VS, Silva AR, Silva RS, Alecrim MG. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 2012; 11:12.
3. Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, Vallinoto AC, Póvoa MM, Silva JS, Cunha M.G. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J.* 2011; 10: 264.
4. Gazinelli R, Parisa K, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology* 2014; 14: 744-57.
5. Chappel JA, Holder AA. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 60: 303-311.
6. Schwenk R, Asher LV, Chalom I, Lanar D, Sun P, White K, Keil D, Kester KE, Stoute J, Heppner DG, Krzych U. Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-based vaccine. *Parasite Immunol.* 2003; (1):17-25.

7. Mazier D, Goma J, Pied S, Renia L, Nussler A, Miltgen F, Mattei D, Grau G. Hepatic phase of malaria: a crucial role as "go-between" with other stages. *Bull World Health Organ.* 1990; 68:126-31.
8. Sohail M, Kaul A, Bali P, Raziuddin M, Singh MP, Singh OP, Dash AP, Adak T. Alleles -308A and -1031C in the TNF α gene promoter do not increase the risk but are associated with circulating levels of TNF α and clinical features of vivax malaria in Indian patients. *Molecular Immunology.* 2008; 45: 1682-92.
9. Jain V, Singh PP, Silawat N, Patel R, Saxena A, Bharti PK, Shukla M, Biswas S, Singh N. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. *Actatropica.* 2010; 113: 263–68.
10. Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, Silber AM, Kallás EG, Ferreira MU, Scopel KK. Cd4_cd25_foxp3_regulatory t cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infection and Immunity.* 2014; 4763–72.
11. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology.* 2009; 27: 519-550.
12. Rockett KA, Awburn MM, Rockett EJ, Clark IA. Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(6):735-42.
13. Waxman J, Balkwill F (eds). *Interleukin 2.* Black-well Sci Publ. Oxford. 1992.
14. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991; 353: 858-861.
15. Theander TG, Bygbjerg IC, Jepsen S, Svenson M, Kharazmi A, Larsen PB, Bendtzen K. Proliferation induced by *Plasmodium falciparum* antigen and interleukin-2 production by lymphocytes isolated from malaria-immune individuals. *Infect Immun.* 1986; 53(1):221-5.
16. Langhorne J. The role of CD4⁺ T-cells in the immune response to *Plasmodium chabaudi*. *Parasitol Today.* 1989; 5(11):362-4.

17. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med*. 2011; 208(2):341-56.
18. Storti-Melo LM, *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(7):672-8.
19. Souza-Neiras et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? *Malar J*. 2010; 9:178.
20. Sohail M, Kaul A, Bali P, Raziuddin M, Singh MP, Singh OP, Dash AP, Adak T. Alleles -308A and -1031C in the TNF α gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF α and clinical features of vivax malaria in Indian patients. *Molecular Immunology*. 2008; 45: 1682-92.
21. Ribeiro BP, Cassiano GC, de Souza RM, Cysne DN, Grisotto MA, de Azevedo dos Santos AP, Marinho CR, Machado RL, Nascimento FR. Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3).
22. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Jiang J, Singh B, Fabrício-Silva GM, Porto LC, Meyer EV, Moreno A, Rodrigues MM, Barnwell JW, Galinski MR, de Oliveira-Ferreira J. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS One*. 2012;7(5).
23. Dewasurendra RL, Suriyaphol P, Fernando SD, Carter R, Rockett K, Corran P, Kwiatkowski D, Karunaweera ND; 7 MalariaGEN Consortium. Genetic polymorphisms associated with anti-malarial antibody levels in a low and unstable malaria transmission area in southern Sri Lanka. *Malar J*. 2012; 11:281.
24. Cassiano GC, Furini AA, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Almeida ME, Barbosa DR, Póvoa MM, Nogueira PA, Machado RL. Immunogenetic

- markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J.* 2016; 15: 306.
25. Pattaradilokrat S, Li J, Wu J, Qi Y, Eastman RT, Zilversmit M, Nair SC, Huaman MC, Quinones M, Jiang H, Li N, Zhu J, Zhao K, Kaneko O, Long CA, Su XZ. *Plasmodium* genetic loci linked to host cytokine and chemokine responses. *Genes Immun.* 2014;15(3):145-52.
 26. Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhães BM, Lacerda MV, Andrade BB, Gonçalves MS, Barral-Netto M. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2014;13:278
 27. Pereira VA, Sánchez-Arcila JC, Teva A, Perce-da-Silva DS, Vasconcelos MP, Lima CA, Aprígio CJ, Rodrigues-da-Silva RN, Santos DO, Banic DM, Bonecini-Almeida MG, Lima-Júnior JC, Oliveira-Ferreira J. IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2015; 14:30.
 28. Cassiano GC, Santos EJ, Maia MH, Furini Ada C, Storti-Melo LM, Tomaz FM, Trindade PC, Capobianco MP, Amador MA, Viana GM, Póvoa MM, Santos SE, Machado RL. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. *Hum Immunol.* 2015; 11:836-42.
 29. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; (2):283-92.
 30. Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, King E, Andrews L, Bejon P, Gilbert SC, De Souza JB, Sinden R, Hill AV, Riley EM. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol.* 2006; 177(8):5736-45.
 31. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M, Mazières B. Interleukin-1beta,

- interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(6):1093-100.
32. Song H, Chen L, Zhanshan C, Jianwen B. Interleukin 2 Gene Polymorphisms Are Associated with Non-Hodgkin Lymphoma. *DNA and Cell Biology.* 2012; 31:7.
 33. Togawa S, Togawa S, Joh T, Itoh M, Katsuda N, Ito H, Matsuo K, Tajima K, HAMAJIMA N. Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2005; 10: 172–178.
 34. Cassiano GC, Storti-Melo LM, Póvoa MM, Galardo AK, Rossit AR, Machado RL. Development of PCR-RFLP assay for the discrimination of *Plasmodium* species and variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in *Anopheles* mosquitoes. *Acta Trop.* 2011;118(2):118-22.
 35. Cochrane AH, Nardim EH, Arruda M, MARACIC M, CLAVIJO P, COLINS WE, NUSSENZWEIG RS. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1990; 43(5):446-451.
 36. Gonzalez J R, Armengol L, Sole X, et al. SNP assoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinform.* 2003;23:644–645.
 37. Rosenberg, R., Wirtz, R.A., Lanar, D.E., Sattabongkot, J., Hall, T., Waters, A.P., et al., 1989. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* 245, 973–976.
 38. Qari, S.H., Shi, Y.P., Goldman, I.F., Udhayakumar, V., Alpers, M.P., Collins, W.E., et al., 1993a. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet* 341, 780–783.
 39. Dias S, Wickramarachchi T, Sahabandu I, Escalante AA, Udagama PV. Population genetic structure of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (Pvcsp) in Sri Lanka. *Gene.* 2013; 518(2):381-7.

40. Patil, A., Orjuela-Sánchez, P., da Silva-Nunes, M., Ferreira, M.U. Evolutionary dynamics of the immunodominant repeats of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate circumsporozoite protein (CSP). *Infect. Genet. Evol.* 2010; 10: 298–303.
41. Shabani SH, Zakeri S, Mehrizi AA, Mortazavi Y, Djadid ND. Population genetics structure of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein during the elimination process in low and unstable malaria transmission areas, southeast of Iran. *Acta Trop.* 2016; 160:23-34.
42. Machado RL, Póvoa MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(4):377-81.
43. Santos EA, Primo DG, Sucupira IMC, Cassiano GC, Barbosa DRL, Viana GMR, Machado RLD, Póvoa MM. Frequency of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotypes in humans and anopheline mosquitoes in an endemic area of southeastern Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2016; 7(3):57-64.
44. Gomes MD, Vieira JL, Cassiano GC, Musset L, Legrand E, Nacher M, Couto VS, Machado RL, Couto ÁA. Evaluation of circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* to estimate its prevalence in Oiapoque, Amapá state, Brazil, bordering French Guiana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016; 58:72.
45. da Silva AN, Santos CC, Lacerda RN, Machado RL, Póvoa MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *an. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(5):547-50.
46. Gonzalez-Ceron, L., Rodríguez, M.H., Nettel, J.A., Villarreal, C., Kain, K.C., Hernández, J.E. Differential susceptibility of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. *Infect. Immun.* 1999; 67, 410–412.
47. Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Santillan FV, Hernandez JE, Wirtz RA. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* circumsporozoite

- protein phenotypes in southern Mexico. *J Med Entomol.* 2000; 37(3):331-4.
48. Persson C, Oliveira GA, Sultan AA, Bhanot P, Nussenzweig V, Nardin E: Cutting edge: a new tool to evaluate human pre-erythrocytic malaria vaccines: rodent parasites bearing a hybrid *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *J Immunol* 2002, 169:6681–6685.
 49. Yadava A, Hall CE, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Collins WE, Ockenhouse CF, Barnwell JW. Protective efficacy of a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-based vaccine in *Aotus nancymae* is associated with antibodies to the repeat region. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(10):e3268.
 50. Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Daniel Ribeiro CT, Goldberg AC, Banic DM. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop.* 2004; (1):63-69.
 51. Arruda, M.E., Souza, R.C., Veiga, M.E., Ferreira, A.F., Zimmerman, R.H., 1998. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK247 and *P. vivax*-like human malaria: a retrospective study in indigenous Indian populations of the Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 628–628.
 52. Cespedes N, Arevalo-Herrera M, Felger I, Reed S, Kajava AV, Corradin G, Herrera S: Antigenicity and immunogenicity of a novel chimeric peptide antigen based on the *P. vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine* 2013, 31: 4923–4930.
 53. Arévalo-Herrera M, Roggero MA, Gonzalez JM, Vergara J, Corradin G, López JA, Herrera S. Mapping and comparison of the B-cell epitopes recognized on the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein by immune Colombians and immunized *Aotus* monkeys. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998; 92(5):539-51.
 54. Gopinath R, Wongsrichanalai C, Cordon-Rosales C, Mirabelli L, Kyle D, Kain KC: Failure to detect a *Plasmodium vivax*-like malaria parasite in globally collected blood samples. *J Infect Dis* 1994, 170:1630–1633.

55. Suwanabun N, Sattabongkot J, Wirtz RA, Rosenberg R: The epidemiology of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein polymorphs in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 50:460–464.
56. Volney B, Pouliquen JF, De Thoisy B, Fandeur T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. *Acta Trop.* 2002; 82(1):11-23.
57. Carvalho, L.H., Fontes, C.J.F., Fernandes, A.A.M., Marinuzzi, H.C., Krettli, A.U.K. Cross-reactive cellular immune response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. *Parasite Immunol.* 1997; 19: 47–59.
58. Arruda ME1, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(3):367-71.
59. Rui E, Fernandez-Becerra C, Takeo S, Sanz S, Lacerda MV, Tsuboi T, del Portillo HA: *Plasmodium vivax*: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. *Malar J.* 2011; 10:192.
60. Cheng Y, Ito D, Sattabongkot J, Lim CS, Kong DH, Ha KS, Wang B, Tsuboi T, Han ET. Serological responses to a soluble recombinant chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in VK210 and VK247 population. *Malar J.* 2013;12:323.
61. Lokossou AG, Dechavanne C, Bouraïma A, Courtin D, Le Port A, Ladékpé R. et al. Association of IL-4 and IL-10 maternal haplotypes with immune responses to *P. falciparum* in mothers and newborns. *BMC Infection Disease.* 2013; 13: 215.
62. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.* 1989; 44:153-205.
63. Itoh K, Inoue T, Ito K, Hirohata S. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. *Cell Immunol.* 1994; 157(2):478-88.

64. Gottlieb DJ, Prentice HG, Heslop HE, Bello C, Brenner MK. IL-2 infusion abrogates humoral immune responses in humans. *Clin Exp Immunol.* 1992; 87(3):493-8.
65. Israelsson E, Maiga B, Kearsley S, Dolo A, Homann MV, Doumbo OK, Troye-Blomberg M, Tornvall P, Berzins K. Cytokine gene haplotypes with a potential effect on susceptibility to malaria in sympatric ethnic groups in Mali. *Infect Genetic Evolution.* 2011; 11:1608-1615.
66. Amirzargar AA, Bagheri M, Ghavamzadeh A, Alimoghadam K, Khosravi F, Rezaei N, Moheydin M, Ansaripour B, Moradi B, Nikbin B. Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenous leukaemia. *Int J Immunogenet.* 2005; 32(3):167-71.
67. Shin WG, Jang JS, Kim HS, Kim SJ, Kim KH, Jang MK, Lee JH, Kim HJ, Kim HY. Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-2 genes in patients with gastric cancer in Korea. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23(10):1567-73.
68. Wu J, Lu Y, Ding YB, Ke Q, Hu ZB, Yan, ZG, Xue Y, Zhou Y, Hua ZL, Shy YQ, Liu P, Shen J, Xu YC, Shen H.B. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Molecular Carcinogenesis.* 2009; 48: 626–632.
69. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation.* 2001;72(8):1444-50.
70. Jiménez-Sousa MÁ, Medrano LM, Liu P, Almansa R, Fernández-Rodríguez A, Gómez-Sánchez E, Rico L, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Pesquera E, Tamayo E, Resino S. IL-1B rs16944 polymorphism is related to septic shock and death. *Eur J Clin Invest.* 2017; 47(1):53-62.
71. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404:398–402.
72. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, Liu P, Shu Y. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. *PLoS One.* 2013; 8(5):e63654.

73. Ouma C1, Davenport GC, Awandare GA, Keller CC, Were T, Otieno MF, Vulule JM, Martinson J, Ong'echa JM, Ferrell RE, Perkins DJ. Polymorphic variability in the interleukin (IL)-1beta promoter conditions susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-1beta production. *J Infect Dis.* 2008; 198(8):1219-26.
74. Chen, H., Wilkins, L.M., Aziz, N., Cannings, C., Wyllie, D.H., Bingle, C., Rogus, J., Beck, J.D., Offenbacher, S., Cork, M.J., Rafie-Kolpin, M., Hsieh, C.M., Kornman, K.S. Duff GW Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum. Mol. Genet.* 2006^a; 15: 519–529.
75. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, Rasool R, Aziz SA, Shah ZA. Association of interleukin 1 beta (IL-1 β) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene.* 2014; 2:123-33.

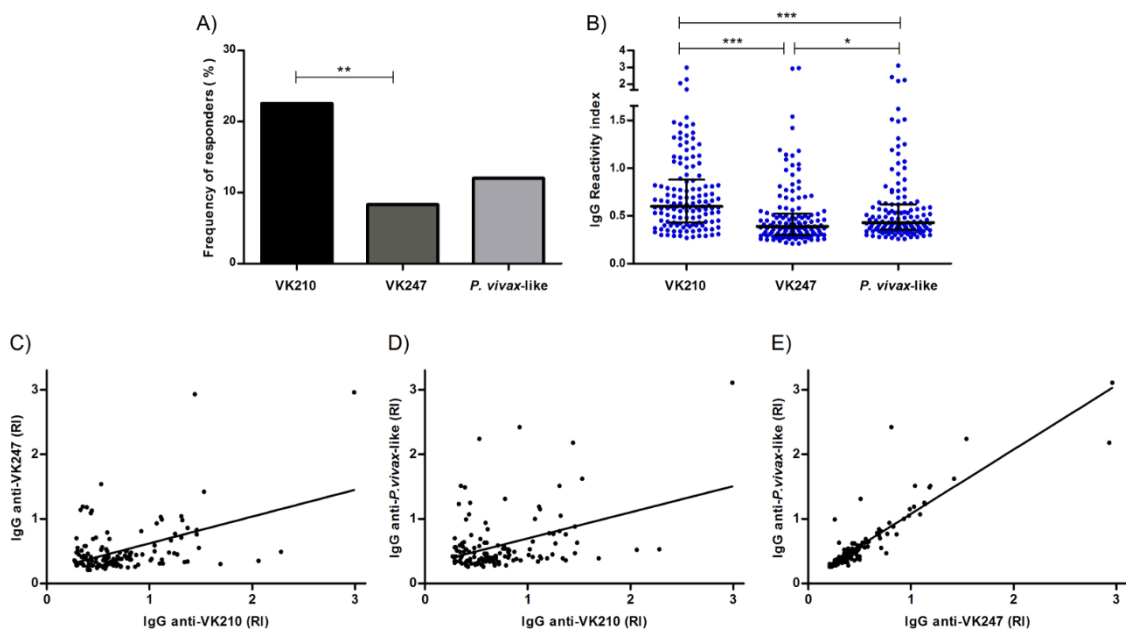


Figure 1. Naturally acquired IgG antibodies against PvCSP variants. A) Frequência de respondedores IgG contra as três variantes da PvCSP. B) Diferenças nos níveis de anticorpos (RI) IgG para as três variantes da PvCSP (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$). C) Correlação de Spearman significativa entre os níveis de anticorpos específicos contra a variante VK210 e VK247 ($r = 0.236$, $p = 0.006$); D) VK210 e *P. vivax*-like ($r = 0.221$, $p = 0.01$) e; E) VK247 e *P. vivax*-like ($r = 0.874$, $p < 0.0001$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

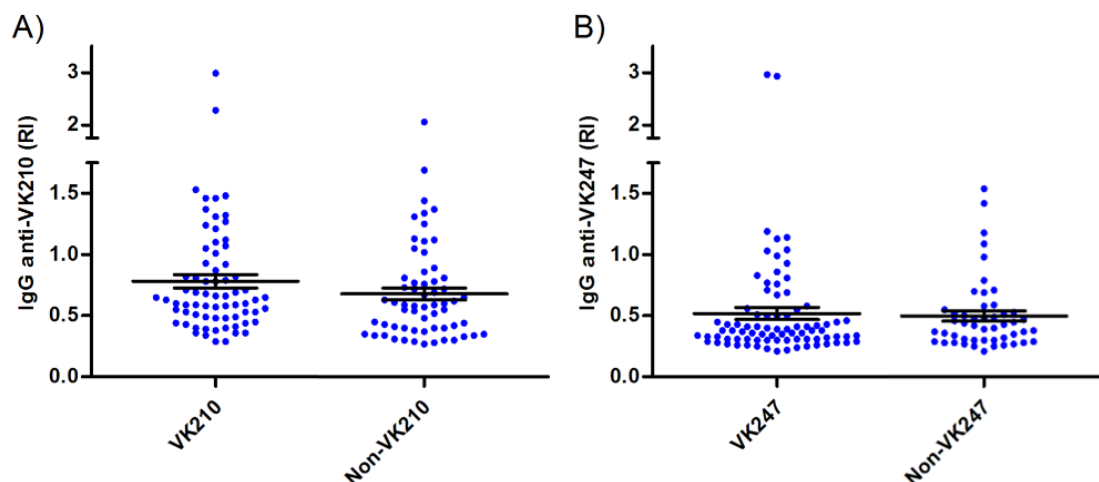


Figure 2. Níveis de anticorpos anti-CSP em relação a presença das variantes na infecção. A) Níveis de anticorpos anti-VK210 de acordo com a presença ou não da variante VK210 na infecção ($p = 0.1$). B) Níveis de anticorpos anti-VK247 de acordo com a presença ou não da variante VK247 na infecção ($p = 0.57$).

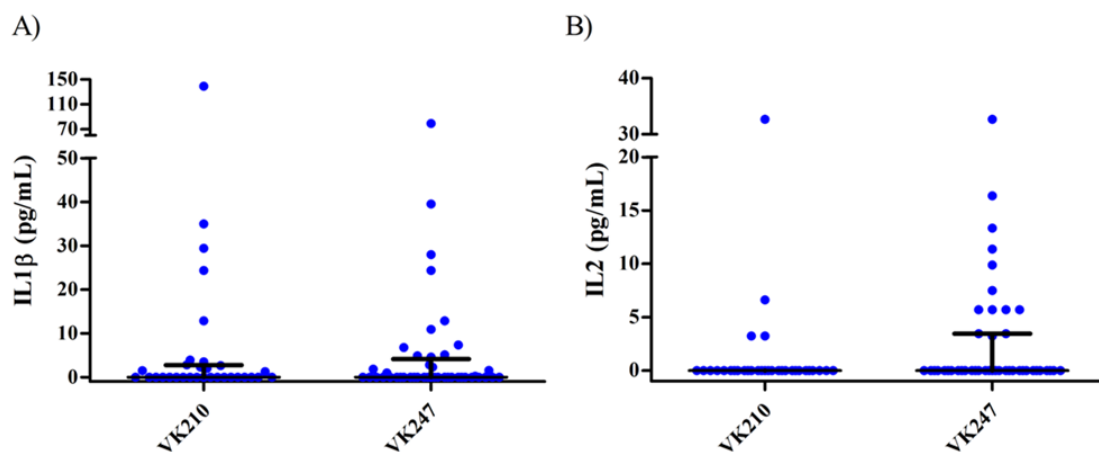


Figure 3. Perfil de citocinas entre infecções contendo as variantes VK210 e VK247. Cytokines were measured by CBA. The bars represent the median of the group and interquartile range. P values were determined by nonparametric Mann-Whitney U tests

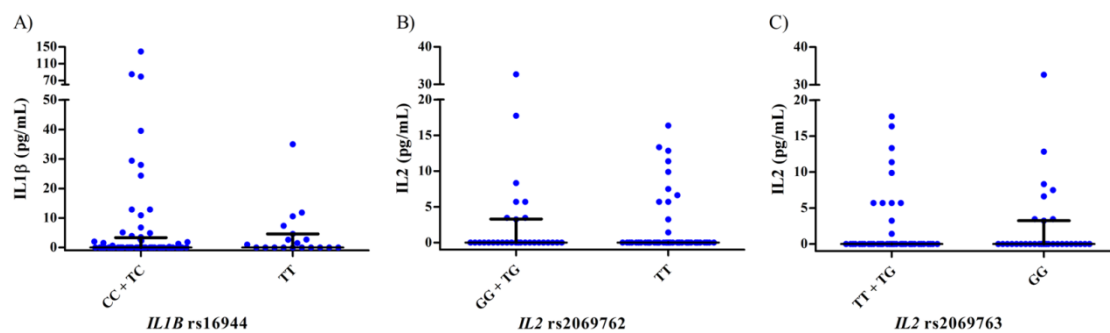


Figure 4. Associação entre os SNPs *IL1B* rs16944 (A), *IL2* rs2069762 (B) e *IL2* rs2069763 (C) com seus produtos gênicos. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil. Não houve diferença significativa utilizando diferentes modelos genéticos.

EDITAL 2017 - PROPESP/FADESP - PAPQ**Formulário de Inscrição de Proposta****Programa de Pós-Graduação: Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários****Nome do Coordenador do Programa:** Prof. Dr. Adriano Furtado**Nome do Proponente:** Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**Título do artigo:** "Parasite-host interaction in malaria vivax: genetic plus immunological clues and Circumsporozoite Protein".**Nome completo dos autores:**

Marcela Petrolini Capobianco (COLABORADOR NO BRASIL - Universidade Estadual Paulista/ SP)

Gustavo Capatti Cassiano (COLABORADOR NO BRASIL – UNIVERSIDADE DE CAMPINAS/SP)

Adriana Antônia da Cruz Furini (COLABORADOR NO BRASIL – UNIRP/SP)

Luciane Moreno Storti de Melo (COLABORADOR NO BRASIL – Universidade Federal do Sergipe)

Cláudia R. Bonini-Domingos (COLABORADOR NO BRASIL - Universidade Estadual Paulista/ SP)

Rafaele Procópio Oliveira (COLABORADOR NO BRASIL – Instituto Evandro Chagas)

Tamirys Pina Simão (COLABORADOR NO BRASIL – Instituto Evandro Chagas)

Ana Paula Drummond Rodrigues (DOCENTE PERMANENTE DO-PPGBAIP/UFGA)

Felipe Bonfim Freitas (COLABORADOR NO BRASIL – Instituto Evandro Chagas)

Daniele Regina Lima Barbosa (COLABORADOR NO BRASIL – Instituto Evandro Chagas)

Eduardo José Gomes Arruda (POS-DOC DO PPGBAIP/UFGA)

Joseli Oliveira-Ferreira (COLABORADOR NO BRASIL – FIOCRUZ/RJ)

Ricardo Luiz Dantas Machado (DOCENTE PERMANENTE DO-PPGBAIP/UFGA)

Nome da revista à qual o artigo será submetido: PLOS Neglected Tropical Diseases

ISSN da revista: 1935-2735

Área do Programa na CAPES: CB III

Classificação da revista no QUALIS/CAPES: Qualis A1. (Fator de Impacto: 3.948)

(TAXA DE PUBLICAÇÃO)

Prestador: PLoS Neglected Tropical Diseases – Public Library of Science

PAYMENT METHOD(S): INVOICE ORDER (PLOS Neglected Tropical Diseases – Public Library of Science)

Online order

Wells Fargo Bank, N.A

ABA Routing: # 4000124958*

SWIFT Code: WFBIUS6S

Bank account transfer information: #: 4000124958

Wire Payment-Beneficiary Name: PLoS – Public Library of Science

Payment Reference: : FRAKU-00C-0308134101



Assinatura do Proponente:

Data: 08/03/2017

Belém, 08 de março de 2017.

Ofício Nº 03/2016

DE: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas machado

Laboratório de Imunogenética em Malária/Instituto Evandro Chagas

FONE: (91) 3214-2382

e-mail: ricardomachado@iec.pa.gov.br

PARA: Prof. Dr. Adriano Furtado

Coordenador PPG BAIP – ICB -UFPA

FONE: (91) 3201-8412 / (91) 3201-7890

ASSUNTO: **SUBMISSÃO DE PROPOSTA AO EDITAL PAPQ/2017**

Prezado Coordenador,

Solicito viabilizar o encaminhamento de proposta ao EDITAL PROPESP/FADESP-PAPQ 2017, para custeio de despesas de pagamento de **proforma in voice (FRAKU-00C-0308134101)** referente à **TRADUÇÃO E REVISÃO PUBLICAÇÃO** de artigo intitulado **“Parasite-host interaction in malaria vivax: genetic plus immunological clues and Circumsporozoite Protein”**. (Marcela Petrolini Capobianco, Gustavo Capatti Cassiano, Adriana Antônia da Cruz Furini, Luciane Moreno Storti de Melo, Cláudia Regina Bonini-Domingos, Rafaele Procópio Oliveira, Tamirys Pina Simão, Ana Paula Drummond Rodrigues, Felipe Bonfim Freitas, Daniele Regina Lima Barbosa, Eduardo José Gomes Arruda, Joseli Oliveira-Ferreira and Ricardo Luiz Dantas Machado). O artigo será submetido neste mês de março, no periódico de circulação internacional **PLOS Neglected Tropical Diseases** (ISSN: 1935-2735), Qualis A1 (Fator de Impacto: 3.948) na Área CB III à qual o Programa vincula-se à CAPES. Informo ainda que dentre os autores existem 02 Docentes, 02 egressos deste Programa e uma discente do Programa de Neurociências e Biologia Molecular da UFPA. Segue em anexo a documentação de acordo com o Edital PAPQ 2017.

Agradeço antecipadamente V. atenção,



Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

American Journal Experts

Send to:

Ricardo Luiz Dantas Machado
 Programa de Pós-Graduação BAIP/Universidade Federal
 Estrada do Guamá s/n
 Belém, Pará
 Brazil, 66075-110

American Journal Experts
 601 West Main Street, Suite 102
 Durham, NC 27701, United States
 Phone: 1-919-704-4253
 Fax: 1-919-287-2439
<http://www.aje.com>
 Email: support@aje.com
 Tax ID: 412141424

Invoice

Receipt code: FRAKU-00C-0308134101

Authors: Marcela Petrolini Capobianco, Gustavo Capatti Cassiano, Adriana Antônia da Cruz Furini, Luciane Moreno Storti de Melo, Cláudia Regina Bonini-Domingos, Rafael Procopio Oliveira, Tamirys Pina Simão, Ana Paula Drummond Rodrigues, Felipe Bonfim Freitas, Daniele Regina Lima Barbosa, José Eduardo Gomes Arruda, Joseli Oliveira-Ferreira and Ricardo Luiz Dantas Machado

Title: Parasite-host interaction in malaria vivax: genetic plus immunological clues and Circumsporozoite Protein

Submission date: March 08 2017, 01:41 pm

Invoice date	Description	Length	Time	Area of study	Price
March 08, 2017	Portuguese Translation	Standard (3501 - 6000 words)	8 days	Infectious Diseases	\$742.00
	- Translation (Portuguese)				
	- Editing for Translation				
				Tier group discount	- \$37.10
				PO surcharge	\$25.00
				Remaining balance	\$729.90
				TOTAL (IN BRL R\$)	R\$2309.91

PAYMENT METHOD(S):

DISCLAIMER: Price in BRL R\$ valid as of Mar 8, 2017 and subject to change.

TERMS: Net 30 days. Online order

NOTES:

Bank transfer information:

Name on account: American Journal Experts

Account number: 1000079559885

Bank name and address: SunTrust Bank, 25 Park Place, Atlanta, GA 30303

Swift code: SNTRUS3A

ABA (branch): 061000104

Your wire payment must reference your Receipt Code FRAKU-00C-0308134101 for proper credit to your account. In the case of overpayment through wire transfer, AJE will provide a credit to your account.

REMINDER: The \$25.00 PO surcharge covers the AJE banking fees at the receiving end, but does NOT include the bank fee at your end. Please add the sending bank's fee to the total price of the invoice, unless otherwise noted on this invoice.

*Since we are based in the United States, we do not have an IBAN. Please use our bank account number and swift code for wire transfers. In place of VAT, please use our US Tax ID: 412141424

Dear Mrs Petrolini Capobianco,

Your Research Article entitled "Parasite-host interaction in malaria vivax: genetic plus immunological clues and Circumsporozoite Protein" has been assigned the following manuscript number: PNTD-D-17-00412.

Please include this number when sending queries to the staff. We will be in touch once we have checked your files for any modifications needed prior to editor assignment. The submission will then be assigned to a senior editor who will invite an associate editor to collaborate on management of the review process.

You will be able to check on the progress of your submission by logging on to Editorial Manager as an author. The manuscript status will say "With Editor" or "Editor Invited" when this part of this process has begun.

Thank you again for submitting to PLOS NTDs. Please don't hesitate to contact us if you have any questions.

Kind regards,

PLOS Neglected Tropical Diseases Staff

plosntds@plos.org

ARTIGOS RELACIONADOS A TESE - PARTICIPAÇÃO COMO CO-AUTORA:

1. Artigo publicado na Humann Immunology no ano de 2015

Hum Immunol. 2015 Nov; 76(11):836-42. doi: 10.1016/j.humimm.2015.09.045. Epub 2015 Sep 30.

Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population.

Cassiano GC¹, Santos EJ², Maia MH², Furini Ada C³, Storti-Melo LM⁴, Tomaz FM³, Trindade PC³, Capobianco MP⁵, Amador MA⁶, Viana GM⁷, Póvoa MM⁷, Santos SE⁶, Machado RL⁸.

Author information

Abstract

Co-stimulatory molecules are essential in the orchestration of immune response and polymorphisms in their genes are associated with various diseases. However, in the case of variable allele frequencies among continental populations, this variation can lead to biases in genetic studies conducted in admixed populations such as those from Brazil. The aim of this study was to evaluate the influence of genomic ancestry on distributions of co-stimulatory genes polymorphisms in an admixed Brazilian population. A total of 273 individuals from the north of Brazil participated in this study. Nine single nucleotide polymorphisms in 7 genes (CD28, CTLA4, ICOS, CD86, CD40, CD40L and BLYS) were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. We also investigated 48 insertion/deletion ancestry markers to characterize individual African, European and Amerindian ancestry proportions in the samples. The analysis showed that the main contribution was European (43.9%) but also a significant contribution of African (31.6%) and Amerindian (24.5%) ancestry. ICOS, CD40L and CD86 polymorphisms were associated with genomic ancestry. However there were no significant differences in the proportions of ancestry for the

other SNPs and haplotypes studied. Our findings reinforce the need to apply AIMS in genetic association studies involving these polymorphisms in the Brazilian population.

Copyright © 2015 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Admixture population; Ancestry markers; Immunogenetics

PMID: 26429313. DOI: [10.1016/j.humimm.2015.09.045](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.045). [Indexed for MEDLINE]

2. Artigo publicado na Cytokine no ano de 2015

Cytokine. 2015 Aug;74(2):273-8. doi: 10.1016/j.cyto.2015.03.020. Epub 2015 Apr 25.

Humoral immune responses against the malaria vaccine candidate antigen Plasmodium vivaxAMA-1 and IL-4 gene polymorphisms in individuals living in an endemic area of the BrazilianAmazon.

Tomaz FM¹, da Cruz Furini AA², Capobianco MP³, Póvoa MM⁴, Trindade PC⁵, Fraga VD⁶, Conceição LM⁷, de Azevedo LR⁸, Oliani SM⁹, Cassiano GC¹⁰, Cavasini CE¹¹, Dos Santos SE¹², Machado RL¹³.

Author information

Abstract

BACKGROUND:

Several studies have recently demonstrated that the immune responses against malaria is governed by different factors, including the genetic components of the host. The IL-4 gene appears to be a strong candidate factor because of its role in the regulation of the Th2 response. The present study investigated the role of IL-4 polymorphisms in the development of IgG antibodies against PvAMA-1 and the IL-4 levels in individuals infected with *Plasmodium vivax* in a malaria endemic area in the Brazilian Amazon.

METHODS:

The study sample included 83 patients who were diagnosed with *P. vivax* infection using thick smear and confirmed by nested-PCR. The IL-4 -590C>T and IL-4 -33C>T polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP, and the intron 3 VNTR was genotyped by PCR. A standardised ELISA protocol was used to measure the total IgG against PvAMA-1. The cytokine/chemokine levels were measured using a Milliplex multiplex assay (Millipore). All of the subjects were genotyped with 48 ancestry informative markers to determine the proportions of African, European and Amerindian ancestry using STRUCTURE software.

RESULTS:

Of the 83 patients, 60 (73%) produced IgG antibodies against PvAMA-1. A significant decrease in the percentage of respondents was observed among the primo-infected individuals. No significant differences were observed in the frequencies of genotypes and haplotypes among individuals who were positive or negative for IgG antibodies against PvAMA-1. Furthermore, no significant correlation was observed between the IL-4 polymorphisms, antibody levels, IL-4 levels, and parasitemia.

CONCLUSIONS:

This study indicated that the polymorphisms identified in the IL-4 gene are not likely to play a role in the regulation of the antibody response against PvAMA-1 and IL-4 production in vivax malaria.

Copyright © 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: Ancestry informative markers; Interleukin 4; Parasitemia; Plasmodium vivax; SNP

PMID: 25922277 DOI: [10.1016/j.cyto.2015.03.020](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.03.020) [Indexed for MEDLINE]

3. Artigo publicado na Mediators of Inflammation no ano de 2016

Mediators Inflamm. 2016;2016:5168363. doi: 10.1155/2016/5168363. Epub 2016 Nov 24

Frequency of TNFA, INFG, and IL10 Gene Polymorphisms and Their Association with Malaria Vivax and Genomic Ancestry.

Furini AA¹, Cassiano GC², Petrolini Capobianco M³, Dos Santos SE⁴, Dantas Machado RL⁵.

Author information

Abstract

Polymorphisms in cytokine genes can alter the production of these proteins and consequently affect the immune response. The trihybrid heterogeneity of the Brazilian population is characterized as a condition for the use of ancestry informative markers. The objective of this study was to evaluate the frequency of *-1031T>C*, *-308G>A* and *-238G>A* *TNFA*, *+874 A>T* *IFNG* and *-819C>T*, and *-592C>A* *IL10* gene polymorphisms and their association with malaria vivax and genomic ancestry. Samples from 90 vivax malaria-infected individuals and 51 noninfected individuals from northern Brazil were evaluated. Genotyping was carried out by using ASO-PCR or PCR/RFLP. The genomic ancestry of the individuals was classified using 48 insertion/deletion polymorphism biallelic markers. There were no differences in the proportions of African, European, and Native American ancestry between men and women. No significant association was observed for the allele and genotype frequencies of the 6 SNPs between malaria-infected and noninfected individuals. However, there was a trend toward decreasing the frequency of individuals carrying the *TNF-308A* allele with the increasing proportion of European ancestry. No ethnic-specific SNPs were identified, and there was no allelic or genotype association with susceptibility or resistance to vivax malaria. Understanding the genomic mechanisms by which ancestry influences this association is critical and requires further study.

PMID: 27999453. DOI: [10.1155/2016/5168363](https://doi.org/10.1155/2016/5168363)

4. Artigo publicado no Malaria Journal no ano de 2016

Malar J. 2016 Jun 3;15:306. doi: 10.1186/s12936-016-1350-2

Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N- terminal antigen of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 (PvMSP-1).

Cassiano GC^{1,2}, Furini AA³, Capobianco MP^{4,3}, Storti-Melo LM⁵, Almeida ME⁶, Barbosa DR⁷, Póvoa MM⁷, Nogueira PA⁶, Machado RL^{4,3,7}.

Author information

Abstract

BACKGROUND:

Humoral immune responses against proteins of asexual blood-stage malaria parasites have been associated with clinical immunity. However, variations in the antibody-driven responses may be associated with a genetic component of the human host. The objective of the present study was to evaluate the influence of co-stimulatory molecule gene polymorphisms of the immune system on the magnitude of the humoral immune response against a Plasmodium vivax vaccine candidate antigen.

METHODS:

Polymorphisms in the CD28, CTLA4, ICOS, CD40, CD86 and BLYS genes of 178 subjects infected with P. vivax in an endemic area of the Brazilian Amazon were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The levels of IgM, total IgG and IgG subclasses specific for ICB2-5, i.e., the N-terminal portion of P. vivax merozoite surfaceprotein 1 (PvMSP-1), were determined by enzyme-linked immuno assay. The associations between the polymorphisms and the antibody response were assessed by means of logistic regression models.

RESULTS:

After correcting for multiple testing, the IgG1 levels were significantly higher in individuals recessive for the single nucleotide polymorphism rs3116496 in CD28

($p = 0.00004$). Furthermore, the interaction between CD28 rs35593994 and BLYS rs9514828 had an influence on the IgM levels ($p = 0.0009$).

CONCLUSIONS:

The results of the present study support the hypothesis that polymorphisms in the genes of co-stimulatory components of the immune system can contribute to a natural antibody-driven response against *P. vivax* antigens.

KEYWORDS: Antibodies; ICB2-5; Immunogenetics; MSP-1; Plasmodium vivax
PMID: 27255376. DOI: 10.1186/s12936-016-1350-2.

5. Artigo publicado no Malaria Journal no ano de 2016

Cytokine gene polymorphisms are not associated with anti-PvDBP, anti-PvAMA-1 or anti-PvMSP-119 IgG antibody levels in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon.

Furini AA¹, Capobianco MP², Storti-Melo LM³, Cunha MG⁴, Cassiano GC⁵, Machado RL^{6,2,7}.

Author information

Abstract

BACKGROUND:

The immune response against *Plasmodium vivax* immunogenic epitopes is regulated by pro- and anti-inflammatory cytokines that determine antibody levels and class switching. Cytokine gene polymorphisms may be responsible for changes in the humoral immune response against malaria. The aim of this study was to evaluate whether polymorphisms in the TNFA, IFNG and IL10 genes would alter the levels of anti-PvAMA1, PvDBP and -PvMSP-119 IgG antibodies in patients with vivax malaria.

METHODS:

Samples from 90 vivax malaria-infected and 51 uninfected subjects from an endemic area of the Brazilian Amazon were genotyped using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to identify polymorphisms of the genes TNFA (-1031T > C, -308G > A, -238G > A), IFNG (+874T > A) and IL10 (-819C > T, -592C > A). The levels of total IgG against PvAMA1, PvDBP and PvMSP-119 were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Associations between the polymorphisms and the antibody response were assessed by means of logistic regression models.

RESULTS:

No significant differences were found in the levels of IgG antibodies against the PvAMA-1, PvDBP or PvMSP-119 proteins in relation to the studied polymorphisms.

CONCLUSIONS:

Although no associations were found among the evaluated genotypes and alleles and anti-merozoite IgG class P. vivax antibody levels, this study helps

elucidate the immunogenic profile involved in the humoral immune response in malaria.

KEYWORDS: IFNG; IL10; IgG antibody; Plasmodium vivax; TNF

PMID: 27435973. DOI: 10.1186/s12936-016-1414-3

6. Artigo publicado na Plos One no ano de 2016

PLoS One. 2016 Feb 22; 11(2):e0149581. doi: 10.1371/journal.pone.0149581. eCollection 2016.

Polymorphisms in B Cell Costimulatory Genes Are Associated with IgG Antibody Responses against Blood-Stage Proteins of *Plasmodium vivax*.

Cassiano GC¹, Furini AA², Capobianco MP¹, Storti-Melo LM³, Cunha MG⁴, Kano FS⁵, Carvalho LH⁵, Soares IS⁶, Santos SE⁷, Póvoa MM⁸, Machado RL^{1,8}.

Author information

Abstract

The development of an effective immune response can help decrease mortality from malaria and its clinical symptoms. However, this mechanism is complex and has significant inter-individual variation, most likely owing to the genetic contribution of the human host. Therefore, this study aimed to investigate the influence of polymorphisms in genes involved in the costimulation of B-lymphocytes in the naturally acquired humoral immune response against proteins of the asexual stage of *Plasmodium vivax*. A total of 319 individuals living in an area of malaria transmission in the Brazilian Amazon were genotyped for four SNPs in the genes CD40, CD40L, BLYS and CD86. In addition, IgG antibodies against *P. vivax* apical membrane antigen 1 (PvAMA-1), Duffy binding protein (PvDBP) and merozoite surface protein 1 (PvMSP-119) were detected by ELISA. The SNP BLYS -871C>T was associated with the frequency of IgG responders to PvAMA-1 and PvMSP-119. The SNP CD40 -1C>T was associated with the IgG response against PvDBP, whereas IgG antibody titers against PvMSP-119 were influenced by the polymorphism CD86 +1057G>A. These data may help to elucidate the immunological aspects of *vivax* malaria and consequently assist in the design of malaria vaccines.

PMID: 26901523. DOI: 10.1371/journal.pone.0149581