JÚLIA MOREIRA PESCARINI

**BUSCA DE POLIMORFISMOS
RELACIONADOS À VARIABILIDADE
DO NÚMERO DE EPISÓDIOS DE
MALÁRIA NA POPULAÇÃO DE
MONTE NEGRO (RO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre de Ciências.

São Paulo
2012

JÚLIA MOREIRA PESCARINI

**BUSCA DE POLIMORFISMOS
RELACIONADOS À VARIABILIDADE
DO NÚMERO DE EPISÓDIOS DE
MALÁRIA NA POPULAÇÃO DE
MONTE NEGRO (RO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre de Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Henrique Krieger

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pescarini, Júlia Moreira.

Busca de polimorfismos relacionados à variabilidade do número de episódios de malária na população de Monte Negro (RO) / Júlia Moreira Pescarini. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Krieger.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia genética.

Versão do título para o inglês: Search for polymorphisms related to the variability in the number of malaria episodes in Monte Negro (RO) population.

1. Malária 2. Plasmodium 3. Epidemiologia (Genética) 4. GWAS 5. TLR 6. Amazônia I. Krieger, Prof. Dr. Henrique II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB073/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Júlia Moreira Pescarini.

Título da Dissertação: Busca de polimorfismos relacionados à variabilidade do número de episódios de malária na população de Monte Negro (RO).

Orientador(a): Prof. Dr. Henrique Krieger.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cop. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 23 de setembro de 2010.

PARECER 957/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 21.09.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Epidemiologia genética de malária na Amazônia ocidental brasileira"* sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. HENRIQUE KRIEGER e aluna JULIA MOREIRA PISCARINI, **condicionado ao cadastro do material biológico humano armazenado (teca), conforme modelo disponível no site do icb.usp.br.**

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **21.09.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico essa dissertação a todas as pessoas que veem na ciência um modo de mudar o mundo para melhor. Que ela seja usada para o bem, de forma a almejar a igualdade no mais amplo sentido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo o incentivo e apoio para que eu realizasse o mestrado e para que continue no sonho de seguir a carreira acadêmica.

À minha mãe e meu pai, que estiveram ao meu lado, cada um ao seu modo, em muitos dos momentos em que precisei e, por todas as belas palavras que foram proferidas nessas ocasiões.

Agradeço a todas as amigas que estiveram e que ainda estão ao meu lado durante todo esse percurso, por me incentivarem, me divertirem, me fazerem chorar, me mostrando acima de tudo que amizades podem ser e serão para toda a vida.

Ao Gabriel, que esteve sempre longe e ao mesmo tempo muito próximo de mim, por me incentivar e me mostrar a felicidade de lecionar, por meio de sua inspiração e empolgação.

Ao Professor Dr. Henrique Krieger, que além de orientador, é um grande amigo: Me ensinou além de ciência, arte, música, cultura, futebol e até como apreciar uma boa carne mal passada.

Ao Dr. Leandro M. Garrido, que me ajudou em todas as etapas do mestrado, me orientou, me aconselhou, tornando-se um grande amigo.

Aos amigos e colegas que ganhei com esse mestrado: Dr. Antônio Malheiros, Msc. Alexandre La Luna, Dr. Carlos Kawamata, Msc. Lucas Pereira, Msc. Fernando Azenha, Dr. Ricardo Ferreira: Agradeço pelas conversas, viagens, risadas, pelas ajudas em todos os momentos e nos mais diversos assuntos.

Agradeço a todos as pessoas de Monte Negro que contribuíram com as informações e com seu próprio sangue para este estudo. Sem eles este trabalho não existiria.

Ao suporte financeiro do CNPq, do INAGEMP e a bolsa concedida pelo IBMP/Fiocruz.

RESUMO

Pescarini JM. Busca de polimorfismos relacionados à variabilidade do número de episódios de malária na população de Monte Negro (RO). [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A malária acompanha os seres humanos há cerca de 50 mil anos. Em 2009, foram relatados cerca de 82 milhões de casos espalhados por 99 países. No mesmo ano, no Brasil, foram registrados mais de 300 mil casos da doença, sendo ao menos 99% deles na Amazônia legal. Diferentes fatores genéticos do hospedeiro humano já foram relacionados à suscetibilidade ou resistência a malária, tais como as hemoglobinas S, C e E, o antígeno Duffy, a enzima G6PD, o TNF, os TLRs, entre outros. Poucos estudos genético-epidemiológicos foram, até agora, conduzidos em populações misturadas, como a população brasileira e, em regiões com predominância da infecção por *P. vivax*. Estudos anteriores mostraram, por meio de análise de segregação complexa, a presença de um fator genético principal relacionado ao número de episódios de malária no município de Monte Negro (RO), bem como, foi sugerido em outra população, a partir de dados de ligação utilizando STRs, que esse gene principal pudesse estar localizado no cromossomo 4. Assim, o presente trabalho buscou, por meio de duas abordagens, fatores genéticos relacionados ao número individual de episódios de malária na População de Monte Negro (RO). A primeira delas, analisando o polimorfismo I602S do gene TLR1 (4p) pela técnica de RFLP mostrou que o polimorfismo não está associado ao fenótipo estudado. Já por meio da abordagem de GWAS (microarranjos de DNA), foram encontradas sugestões de marcadores, que devem ser replicados em futuros estudos para verificar possíveis associações verdadeiras, sendo os mais relevantes os rs3796504, rs17518475, rs17527389, rs17660753, rs221188, rs7918405, rs7068695, entre outros.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium*. Epidemiologia (Genética). TLR1. GWAS. Amazônia.

ABSTRACT

Pescarini JM. Search for polymorphisms related to the variability in the number of malaria episodes in Monte Negro (RO) population. [Masters thesis (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Malaria is present in humans since 50,000 years ago. In 2009, about 82 million cases were reported across 99 countries. In Brazil, in the same period, more than 300 thousand cases of the disease were registered. Almost 99% of them were in the Amazon region. Different Human host genetic factors are known to be related to susceptibility or resistance to malaria, such as hemoglobin S, C and E, the Duffy antigen, the enzyme G6PD, TNF, TLRs, among others. Otherwise, few studies have been conducted in admixed populations, such as Brazilian populations and, in *P. vivax* predominance regions. Previous studies using segregation analysis have shown the presence of a major genetic factor related to the number of malaria episodes of in the municipality of Monte Negro (RO), located in the Western Amazon Region and, it was also suggested, through linkage analysis using STRs, that this genetic factor may be located on chromosome 4. Thus, this study aimed to search genetic factors related to the number of individual malaria episodes in Monte Negro by two different approaches: a) TLR1 candidate gene (4p) by RFLP b) GWAS. The first approach did not show any association with the studied phenotype, whereas GWAS data was able to suggest candidate markers that can be replicated in further studies in order to identify truly associations. The more relevant ones were rs3796504, rs17518475, rs17527389, rs17660753, rs221188, rs7918405, rs7068695, among others.

Key words: Malaria. *Plasmodium*. Epidemiology (Genetic). TLR1. GWAS. Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Distribuição global da malária no último século	15
Figura 1.2 - I - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA). II - Índice parasitário anual (IPA) de malária em Rondônia, referente ao ano de 2005 ...	16
Figura 1.3 - Ciclo do <i>Plasmodium</i>	18
Figura 1.4 - Infecção malárica e sintomas decorrentes	20
Figura 1.5 - Prevalência mundial de Fy (a ⁻ b ⁻)	23
Figura 4.3 - Distribuição do valor padronizado de episódios de malária (Nm _p). ...	34
Figura 4.5 - Resumo dos procedimentos para a genotipagem por microchips de DNA	39
Figura 5.2 - Gel de agarose (4%) mostrando os diferentes genótipos do polimorfismo S602I	44
Figura 5.4 - Visualização gráfica dos SNPs ao longo do cromossomo 4 ...	46
Figura 5.5 - Manhattan Plot na análise de associação alélica do genoma completo	47
Figura 5.7 - Manhattan plot da análise de associação alélica sem indivíduos duffy negativos	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.6 - Associações descritas na literatura entre polimorfismos nos TLRs e malária	26
Tabela 1.7 - Estudos do tipo GWAS em malária: Tamanhos amostrais, populações e fenótipos diversos de malária analisadas e achados encontrados	28
Tabela 4.4 - Padronização da reação de polimerase em cadeia utilizada	36
Tabela 4.6 - Local e procedimentos realizados para a obtenção dos microarranjos de DNA	40
Tabela 4.7 - Análise de heterogeneidade entre os casos e controles genotipados pela técnica de microarranjos de DNA	41
Tabela 5.1 - Análise da relação entre o fenótipo estudado e o antígeno Duffy	44
Tabela 5.3 - Análise de associação entre os genótipos do polimorfismo S602I do gene TLR1 e o fenótipo	45
Tabela 5.6 - Polimorfismos na região do gene Darc/Duffy	48
Tabela 5.8 - Marcadores selecionados a partir das análises com e sem indivíduos Duffy negativos na amostra	50
Tabela A1 - Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica	68
Tabela B1 - Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica	69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 4.1 - Equação da regressão	33
Equação 4.2 - Número corrigido de episódios de malária	33

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmett-Guérin
CHR/Chr	Cromossomo
DARC	Duffy antigen/receptor for chemokines
dsRNA	duble strand RNA
DTT	Ditiotreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy Weinberg
g.l.	Grau de liberdade
G6PD	Desidrogenase da glicose 6-fosfato
GPI	Glicofosfatidilinositol
GWAS	Genome Wide Association Studies
Hb	Hemoglobina
HBV	Virus da Hepatite B (Sigla em inglês)
HCl	Cloreto de hidrogênio
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana (Sigla em inglês)
I	Isoleucina
IFN	Interferon
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPA	Índice Parasitário Anual
KOH	Hidróxido de potássio
LD	Desequilíbrio de Ligação (Sigla em inglês)
LPS	Lipopolissacarídeos
MAF	Frequência alélica mínima (Sigla em inglês)
n.s.	Não significativa
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization
OPAS/PAHO	Organização Pan-americana de Saúde/ Pan American Health Organization
OR	Odds ratio / Razão de odd
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RO	Rondônia
S	Serina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short tandem repeat
TdT	Terminal desoxinucleotidil transferase
TLR	Receptor do tipo Toll (Sigla em inglês)
TNF	Fator de necrose tumoral (Sigla em inglês)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	14
1.1.1 Histórico da malária	14
1.1.2 A infecção e a doença	17
1.2 FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS À MALÁRIA	21
1.2.1 Alterações nas cadeias de hemoglobinas	21
1.2.2 Duffy	22
1.2.3 Deficiências da enzima G6PD	23
1.2.4 Fator de Necrose Tumoral do tipo alfa (TNF- α).....	24
1.2.5 Receptores do tipo Toll.....	24
1.4 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO E ESTUDOS DE VARREDURA GENÔMICA (GWAS).....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 MONTE NEGRO.....	32
4.2 SELEÇÃO DOS GRUPOS CASO-CONTROLE.....	33
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	35
4.4 GENOTIPAGEM DE SNP PRESENTE NO GENE TLR1.....	36
4.5 GENOTIPAGEM POR MICROARRANJOS DE DNA.....	38
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
4.6.1 Relação do fenótipo ao antígeno Duffy.....	41
4.6.2 Teste de associação para os polimorfismos 602 do gene TLR1.....	41
4.6.3 Verificação de Heterogeneidade entre os grupos caso e controle.....	41
4.6.4 Análises utilizando dados de varredura genômica.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 RELAÇÃO DO FENÓTIPO AO ANTÍGENO DUFFY.....	44
5.2 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO S602I DO GENE TLR1.....	45
5.4 MICROARRANJOS DE DNA.....	46
5.4.1 Análise de associação alélica do cromossomo 4.....	46
5.4.2 Análise de associação alélica do genoma completo.....	48

5.3.3 Análise de associação alélica sem indivíduos Duffy negativos	50
5.3.4 Análise comparativa das análises de associação alélica de genoma com e sem indivíduos Duffy negativos	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	67
ANEXO A – Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica (vide item 5.3.2)	68
ANEXO B - Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica (vide item 5.3.3)	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 A EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

As doenças infecciosas compõem um grupo responsável pelas maiores taxas de morbidade e mortalidade no mundo. Essas doenças acometem indivíduos de todas as idades, sendo uma grande fonte de pressão seletiva nas populações ao afetarem indivíduos antes da idade reprodutiva, ao longo de um extenso período de tempo (Burgner et al., 2006; Segal e Hill, 2003). A malária é um exemplo de doença infecciosa importante que deve ter exercido esse tipo de influência.

1.1.1 Histórico da malária

A malária acompanha os seres humanos há cerca de 50 mil anos. Ela surgiu nos ancestrais primatas do Homem na África, na região da Etiópia, e desenvolveu-se continuamente com os seres humanos. Do vale do Nilo, a malária se espalhou para a região do Mediterrâneo e, em seguida, para a Ásia e o norte da Europa. No início de 1800, a malária já estava distribuída por todos os continentes (Neguina et al., 2010).

O típico padrão de febre, associado ao aumento do baço (esplenomegalia) e tendência epidêmica foram descritas em 2700 a. C pelos chineses e, mais tarde por civilizações sumérias, assírias, babilônicas, egípcias, indiana, grega, romana ou árabe. Hipócrates (460-377 a. C.), médico grego, foi o primeiro a descrever as características da malária (calafrios, febre, e sudorese) e os diferentes tipos clínicos da doença, dependendo da periodicidade das febres (Neguina et al., 2010).

A etimologia da palavra "malária" vem do termo italiano e medieval "Mal'aria" ou ar ruim. A palavra foi introduzida em italiano por Horace Walpole, que descreveu o termo, em 1740, como "um mal chamado "Mal'aria", horrível, que vem a Roma todos os verões matando um". Apenas no século XX, a palavra malária, sem o apóstrofo, se tornou conhecida como o nome da doença (Scotto, 2010).

A malária hoje está distribuída majoritariamente na região dos trópicos, como é observado na figura 1.1.1A. A diminuição ou mesmo extinção dos casos em muitos países ocorreu principalmente por meio do controle da doença (Hay et al., 2004).

De acordo com a WHO, no ano de 2009, 1,2 bilhões de pessoas no mundo estavam sob alto risco de contágio de malária. Em 2009, foram relatados cerca de 82 milhões de casos espalhados pelos 99 países analisados (World Health Organization, 2010).

Figura 1.1 - Distribuição global da malária no último século

FONTE: Hay et al. (2004).

No Brasil, apesar da continua redução do número de casos de malária nos últimos anos, dados de 2009 registraram mais de 300 mil casos dessa doença, sendo pelo menos 99% deles na Amazônia legal (Brasil, 2011; Pan American Health Organization, 2011).

Figura 1.2 I - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA). **II** - Índice parasitário anual (IPA) de malária em Rondônia, referente ao ano de 2005.

FONTE: Adaptado de Brasil, 2006.

O estado de Rondônia, localizado no oeste do país, assim como boa parte da região amazônica, possui baixa densidade demográfica, de 6,58 habitantes por km², no entanto, possuem um IPA alto (Brasil, 2006; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011). O IPA de malária em Rondônia, como mostrado na figura 1.2II, varia quando são analisadas as diferentes regiões do estado.

1.1.2 A infecção e a doença

A malária é causada pelo contágio do protozoário do gênero *Plasmodium*, transmitido pela picada das fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*.

O gênero *Plasmodium* pertence à família Plasmodiidae e é composto por cerca de 100 espécies parasitas de diversos animais. Dentre estas, cinco espécies infectam o Homem de forma natural: *Plasmodium ovale*, *Plasmodium*

knowlesi, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum* (Cox-Singh et al., 2008; Rey, 2008).

No Brasil três espécies de *Plasmodium* são responsáveis pelas infecções no homem. São elas o *P. vivax*, que corresponde a 85% dos casos confirmados, o *P. falciparum* que é responsável por aproximadamente 15% dos casos e, menos de 0,5% associados à infecção por *P. malariae* (PAHO, 2011).

Os insetos vetores do protozoário da malária pertencem ao gênero *Anopheles*, da família Culicidae (Ordem Díptera). Dentre as espécies de maior importância no Brasil podemos citar o subgênero *Nyssorhynchus*, que compreende o *A. (Nyssorhynchus) darlingi* e o *A. (Nyssorhynchus) aquasalis* (Rey, 2008).

Os esporozoítas do *Plasmodium* (formas infectantes) se alojam nas glândulas salivares do inseto, que infectam o homem (hospedeiro vertebrado) durante o repasto sanguíneo por meio na inoculação da saliva infectada. Os esporozoítas atingem as células hepáticas, multiplicam-se dentro dessas e originam os esquizontes, repletos de merozoítas em seu interior (Centers for Disease Control and Prevention, 2011).

Ao romperem o hepatócito, os merozoítas atingem a corrente sanguínea, infectando os eritrócitos e, iniciando-se o ciclo eritrocítico. Os merozoítas transformam-se em trofozoítas que, por sua vez, originam ou outros merozoítas (dando continuidade ao ciclo assexuado) ou os gametócitos, formas sexuais do parasita. As últimas serão responsáveis pela infecção de novos mosquitos durante o repasto sanguíneo. A figura 1.3 descreve o ciclo do parasita no hospedeiro invertebrado e vertebrado (CDC, 2011).

Figura 1.3 - Ciclo do *Plasmodium*.

FONTE: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011.

A infecção malárica possui um quadro clínico bastante variável. Os sintomas podem ser divididos em quatro subtipos: infecção assintomática, malária crônica, malária branda e malária grave. A determinação do tipo e da gravidade da infecção pode ser ocasionada por diferentes fatores como a espécie e cepa do *Plasmodium* infectante, a imunidade ou mesmo fatores intrínsecos do hospedeiro definitivo, como será aprofundado no item 1.2.

Os sintomas mais característicos da infecção malárica são dores de cabeça, mal-estar, dores no corpo e a elevação da temperatura, que pode ser leve ou pode consistir em acessos maláricos, caracterizados por calafrios, sensação de calor, febre intensa de até 41 °C, sudorese e finalmente o quadro segue para a aparente recuperação quase total do indivíduo. O ciclo de rompimento dos eritrócitos para a liberação de merozoítas na corrente sanguínea é responsável pelos picos de acessos febris, cujo intervalo irá variar de acordo com o tempo necessário para se completar o ciclo de esquizogonia de cada uma das espécies de *Plasmodium* infectante (Rey, 2008).

Os sintomas clássicos podem progredir para quadros graves como a malária cerebral e a agudização da doença em crianças e gestantes, quadros estes historicamente mais conhecidos na infecção por *P. falciparum*, mas que também podem ocorrer em menor escala na infecção por *P. vivax* (Anstey et al., 2009). Em estudos realizados em Papua, a taxa de mortalidade de malária entre pacientes hospitalizados é de 1,6% entre os pacientes hospitalizados com *P. vivax*, contra 2,2% observado com *P. falciparum* (Tjitra et al., 2008)

No Brasil, apesar do baixo número de mortes associadas ao *P. vivax*, foram relatados um grande espectro de complicações clínicas tais como anemia, complicações metabólicas (acidose metabólica e hipoglicemia), edema pulmonar, trombocitopenia e distúrbios da coagulação, falência renal aguda, coma, entre outros (Lacerda et al., 2012).

A infecção malárica também pode tomar outros cursos, como a infecção crônica e a assintomática. Estudos conduzidos em diversas localidades endêmicas para malária mostraram a presença de uma taxa de até 14% de indivíduos assintomáticos em vilarejos na África subsaariana e de até 21% em populações ribeirinhas na Amazônia ocidental brasileira (Alves et al., 2002; Nkoghe et al., 2011).

A figura 1.4 mostra diferentes sintomas da infecção malárica de acordo com a gravidade dos mesmos, sem distinção, do tipo de *Plasmodium* infectante.

Figura 1.4 - Infecção malárica e sintomas decorrentes.

FONTE: Pescarini (2012).

O primeiro medicamento utilizado no tratamento da malária foi a quinina, substância extraída da *Cinchona calisaya*. Na década de 20 também foi incorporado ao tratamento derivados dessa substância, tais como a cloroquina e a primaquina. Inibidores da síntese do folato, descobertos na década de 40, também se mostraram eficientes no tratamento da malária, porém foram alvos rápidos de resistência do parasita. A artemisinina, desenvolvida na década de 70 pelos chineses, é amplamente usada em terapia combinada com outros medicamentos, apesar de sua eficácia ter diminuído nos últimos anos (Hobbs e Duffy, 2011).

No Brasil o tratamento da malária é preconizado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2010) e prevê o uso de Cloroquina ou Primaquina nas infecções por *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae* e um protocolo variado com o uso associado de derivados da quinina e da artemisinina, nas infecções por *P. falciparum*.

A malária é uma doença curável e com ausência de seqüelas graves quando tratada corretamente e dentro de poucos dias do início da infecção (Brasil, 2012), salvo em algumas complicações pouco frequentes (Anstey et al., 2009; Lacerda et al., 2012).

1.2 FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS À MALÁRIA

Haldane (1949) foi o primeiro a sugerir que a presença de variabilidade em alguns genes e o aumento na frequência desses em determinadas regiões poderia ser ocasionada pela presença de doenças infecciosas. Também considerou a possibilidade de que indivíduos heterozigotos para a β -talassemia tivessem um valor adaptativo superior aos indivíduos que não possuem um alelo para essa doença, levantando a hipótese de que os eritrócitos microcíticos dos indivíduos heterozigotos são mais resistentes ao ataque do *Plasmodium*. Essa foi uma idéia inovadora para a época, sendo o primeiro a articular a potencial importância das variantes gênicas na patogenia da malária (Hedrick, 2011).

Alguns anos mais tarde, Allison (1954), concluiu que os eritrócitos de indivíduos portadores do alelo HbS são menos parasitados por *P. falciparum* que os normais, que os indivíduos heterozigotos para o gene HbS teriam uma vantagem seletiva em regiões onde a malária é hiperendêmica e que, assim, a endemicidade da malária seria um fator muito importante para determinar a frequência do traço falciforme nessas regiões.

Esses estudos foram de extrema importância na contribuição para o início da busca de fatores genéticos relacionados à suscetibilidade ou resistência as doenças infecciosas, abordando questões fundamentais para a compreensão da patogênese dessas doenças.

1.2.1 Alterações nas cadeias de hemoglobinas

Alterações nas cadeias de hemoglobinas podem ser caracterizadas por anormalidades na estrutura ou na função das hemoglobinas α e β e, que são, em geral, mais prevalentes em lugares historicamente endêmicos para a malária (Hedrick, 2011).

As hemoglobinas mutantes HbS, HbC e HbE resultam de diferentes alterações em um único aminoácido da cadeia beta (*HBB*), enquanto que as talassemias do tipo α e β , são geradas pela deleção de um ou dos dois locos da cadeia alfa (*HBA1* e/ou *HBA2*). Em geral a presença dessas

hemoglobinopatias está associada à infecção mais branda ou limitada por *Plasmodium falciparum* (May et al., 2007).

1.2.2 Duffy

O antígeno Duffy ou também denominado “Duffy antigen receptor for chemokines” (DARC) é determinado por dois alelos diferentes FY*A e FY*B que diferem entre si por uma mutação pontual do tipo 125G→A, sendo A o antígeno FY*B e G o antígeno FY*A (Pogo e Chaudhuri, 2010).

O antígeno Duffy foi, desde a década de 70, objeto de estudo na patogenia da malária, já que este se apresenta na superfície do eritrócito, célula alvo do *Plasmodium*. Miller et al. (1975, 1976) observaram que alguns indivíduos eram refratários à infecção pelo *P. knowlesi* devido à ausência do receptor Duffy na superfície dos eritrócitos. Mais tarde Barnwell et al. (1989) mostraram a utilização do antígeno Duffy como receptor para a invasão de *P. knowlesi* e *P. vivax* no eritrócito e o estabelecimento da infecção.

As bases moleculares da resistência à algumas espécies de *Plasmodium* foram decifradas por Tournamille et al. (1995), que mostraram que o fenótipo FY- é causado por uma mutação do tipo T-46C no promotor do alelo FY*B, levando à não expressão de FY*B no eritrócito (Fy*B^{es} ou Fy*B^{null}). Estudos posteriores mostraram que essa mutação também pode estar presente no alelo FY*A em alguns países endêmicos para malária na África e na Ásia (Howes et al., 2011; Sellami et al., 2008; Zimmerman et al., 1999). A distribuição mundial do fenótipo Fy negativo pode ser observada na figura 1.5.

Figura 1.5 - Prevalência mundial de Fy (a⁻ b⁻).

FONTE: Adaptado de Howes et al. (2011).

1.2.3 Deficiências da enzima G6PD (Desidrogenase de glicose 6-fosfato)

Outro fator importante relacionado a resistência à malária é a enzima G6PD, que catalisa a primeira reação da via das pentoses e é uma fonte importante na proteção do acúmulo de radicais livres e do estresse respiratório nos eritrócitos. O gene que codifica a G6PD está localizado no cromossomo Xq28 e, alterações nessa enzima, que levam à diminuição da quantidade ou da efetividade dessas dentro do eritrócito podem desencadear formas mais brandas da malária ou a resistência a malária grave. Esse fato se deve a uma provável dificuldade do *Plasmodium* em se manter e se reproduzir dentro do eritrócito alterado (Hedrick, 2011; López et al., 2010).

Cerca de 140 mutações já foram descritas, a maioria decorrente de polimorfismos únicos e, cujas manifestações clínicas podem variar bastante (Cappellini e Fiorelli, 2008). As principais variantes do alelo B (ancestral) são a A (A376G), a A- (A376G e G202A), mais prevalentes no continente africano, a Med (C563G), prevalente na região do mediterrâneo, Índia e Indonésia e a variante Mahidol (G487A), presente no sudeste asiático (Hedrick, 2011).

A variante A- é responsável por conferir resistência clara contra a malária *falciparum*, porém existem divergências se essa resistência ocorre em mulheres heterozigotas e em homens hemizigotos (Bienzle et al., 1972; Clark

et al., 2009), se ocorre somente em hemizigotos (Guindo et al., 2007) ou se mulheres homozigotas também possuem essa resistência.

1.2.4 Fator de Necrose Tumoral do tipo alfa (TNF- α)

O TNF é uma citocina pró-inflamatória normalmente presente na resposta a patógenos intracelulares. A produção do TNF- α na infecção malárica se dá pela estimulação de monócitos, macrófagos e linfócitos por produtos derivados dos protozoários durante a infecção do eritrócito. O papel do mediador TNF- α na patogenia da malária não é completamente compreendido, porém sabe-se que apesar do papel protetor na infecção, ele apresenta-se muito elevado nos casos mais severos de malária, como morte por malária cerebral por *P. falciparum* (Körner et al., 2010; Kwiatkowski et al., 1990)

Os níveis plasmáticos de TNF- α , além de IFN-gama e IFN-gama/IL-10 exibiram uma tendência linear de aumento com a severidade da malária na infecção por *P. vivax* (Andrade et al., 2010).

A associação entre polimorfismos no TNF- α e diferentes fenótipos de malária se mostraram contraditórias quando observadas diferentes populações. Na Índia, os polimorfismos -1031 e -863 foram associados à malária severa e à alta parasitemia por *P. falciparum*. Também foi constatada associação de duas combinações haplotípicas diferentes do conjunto TNF-1031/-857/-308/-238 à alta parasitemia (Basu et al., 2010; Sinha et al., 2008). Já em algumas populações da Oceania e África, polimorfismos no gene TNF- α não parecem estar associados aos diferentes fenótipos de malária estudados (Eid et al., 2010; Randall et al., 2010).

1.2.5 Receptores do tipo Toll

Os receptores do tipo Toll ou TLR são uma família de receptores altamente conservados em vertebrados. Cada um dos 13 membros da família dos Tolls, expressos em mamíferos, são capazes de orquestrar uma resposta imune por vias intrínsecas de sinalização a diferentes ligantes e patógenos (Roach et al., 2005; Uematsu e Akira, 2006). Essa família de receptores está

presente tanto na superfície quanto no citoplasma de diferentes tipos celulares como macrófagos, células dendríticas e células B e T (Akira et al., 2006).

Os TLRs estão relacionados diretamente ao reconhecimento de substâncias presentes ou produzidas pelo *Plasmodium*. A hemozoina, cristal insolúvel formado a partir do grupo heme pelo *Plasmodium*, em conjunto com o DNA desse protozoário induzem o TLR9 (Parroche et al., 2007). O glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *P. falciparum*, por exemplo, induz uma resposta Myd88 dependente pela ativação dos TLR4 e TLR2 (Krishnegowda et al., 2005).

O receptor TLR2, por sua vez, requer a interação com os TLR1 ou TLR6 para a formação de um heterodímero e a conseqüente sinalização celular por meio da indução de citocinas (Ozinsky et al., 2000). Polimorfismos não sinônimos no gene TLR1, um dos TLRs essenciais para o funcionamento do heterodímero, estão relacionados a alterações que comprometem o correto funcionamento deste. Alguns exemplos são os polimorfismos S248N, H305L e P315L, que estão localizados na região extracelular do TLR1, e o polimorfismo S602I, que está localizado na junção entre domínio citoplasmático e a região transmembrana (Tapping et al., 2007).

Apesar dos TLR4 e TLR9 serem intimamente relacionados à sinalização e produção de citocinas na malária, polimorfismos nesses genes possuem uma relação duvidosa quanto a suscetibilidade/resistência/severidade à malária, não podendo ser generalizadas, uma vez que existem divergências entre os estudos nas diferentes populações estudadas (Basu et al., 2010; Leoratti et al., 2008; Mockenhaupt et al., 2006; Zakeri et al., 2011).

Johnson et al. (2007) verificaram que a ausência de expressão do TLR1 na superfície de monócitos de alguns indivíduos deve-se a presença da variante 602S no gene TLR1, que leva ao tráfico anômalo desse receptor à membrana plasmática, onde ele deveria interagir com o TLR2 para a sinalização. Nesse mesmo estudo também foi constatado uma menor produção de TNF- α em monócitos de indivíduos homozigotos para o alelo 602S, quando induzidos com um agonista do TLR1/TLR2, o que mostra um prejuízo na resposta celular desses indivíduos.

Os prejuízos na resposta celular podem, em contrapartida, levar á vantagens na resposta do hospedeiro a patógenos. A variante S, por exemplo,

está associado à menor incidência de lepra por *Mycobacterium leprae*, enquanto que a variante I/I induz uma resposta aumentada da citocina IL-6, quando estimulada com lipopeptídeos bacterianos (Hawn et al., 2007; Johnson et al., 2007). A suscetibilidade à tuberculose também foi associada a pacientes caucasianos homozigotos S/S para esse polimorfismo (Uciechowski, 2011).

O TLR1 também parece estar relacionado à resposta do hospedeiro humano à malária, já que Leoratti et al. (2008) encontraram associação entre a variante 602S desse gene e a sintomatologia da malária em três populações distintas na região amazônica.

Um estudo genético-epidemiológico realizado por Casseb et al. (2010) em diferentes populações ribeirinhas de Rondônia, localizada no oeste amazônico, encontrou associação entre o número de episódios de malária e o mesmo polimorfismo (S602I) do gene TLR1. Contudo, neste mesmo estudo não foi observado associação entre o polimorfismo estudado e a sintomatologia malárica, mostrando uma divergência entre os estudos de associação desse polimorfismo e as diferentes populações amazônicas analisadas.

A tabela 1.6 mostra as associações descritas na literatura entre os TLR e os diferentes fenótipos de malária estudados em populações distintas.

Tabela 1.6 - Associações descritas na literatura entre polimorfismos nos TLRs e malária.

Gene	SNP	Tipo de associação	Local	Autor
TLR1	S602I	Malária branda X Assintomática	Brasil (Amazônia)	Leoratti et al., 2008
	S248N	Malária placentária	Gana	Hamann et al., 2010
	S602I	Número de episódios de malária.	Brasil (Amazônia)	Casseb et al., 2010
TLR4	D299G T399I	Parasitemia/ Malária Severa	Índia	Basu et al., 2010
			Gana	Mockenhaupt et al., 2006
TLR6	S249P	Malária branda x Assintomática	Brasil (Amazônia)	Leoratti et al., 2008
TLR9	1486T/C	Parasitemia	Brasil (Amazônia)	Leoratti et al., 2008
TIRAP	S180L	Malária branda	Irã	Zakeri et al., 2011

FONTE: Pescarini (2012).

1.3 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO E ESTUDOS DE VARREDURA GENÔMICA (GWAS)

Estudos de associação gênica visam identificar relações entre um determinado fenótipo e um marcador genético. Polimorfismos únicos de um nucleotídeo (SNPs) estão amplamente distribuídos por todo o genoma e servem como marcadores para testar se há associação entre este e o fenótipo estudado. A associação, quando real, pode ser fruto do próprio polimorfismo ou de um gene que esteja em desequilíbrio de ligação com este.

Estudos de varredura genômica consistem na análise de milhares de SNPs em um único indivíduo, de forma a avaliar as diferenças nas frequências dos marcadores genéticos entre os casos e os controles (Estudos de Associação), ou entre grupos de aparentados como, por exemplo, em estudos de ligação.

O primeiro estudo publicado de GWAS em doenças infecciosas foi conduzido em 2007, determinando os componentes genéticos que influenciam na carga viral em pacientes HIV-positivos durante a fase assintomática da doença (Fellay et al., 2007). Já o primeiro estudo relacionando suscetibilidade à infecção foi realizado em grupos de aparentados com pacientes afetados pela doença de Kawasaki, mostrando a importância dos estudos de GWAS na descoberta de novos loci relacionados a esse tipo de doenças (Davila e Hibberd, 2009).

Vários estudos de ligação e associação utilizando análises de varredura genômica como ferramenta na busca de fatores genéticos do hospedeiro humano na suscetibilidade e/ou resistência à malária têm sido conduzidos nos últimos anos. Foram realizados em sua maioria em países da África, em populações negras, estudando diferentes fenótipos relacionados à infecção por *Plasmodium falciparum*, que é predominante nesse continente (Jallow et al., 2009; Millet et al., 2010; Sakuntabhai et al., 2008; Timmann et al., 2007).

A tabela 1.7 resume os estudos do tipo GWAS relacionando fatores genéticos do hospedeiro a diferentes fenótipos de malária estudados.

Tabela 1.7 - Estudos do tipo GWAS em malária: Tamanhos amostrais, populações e fenótipos diversos de malária analisadas e achados encontrados.

Autor	Cobertura	Abordagem	População	N	Fenótipos analisados	Região/gene sugeridos
Timmann et al., 2007	10K	Ligação	Gana (África)	377	Prevalência do parasita (PP); Parasitemia (Pa); Episódios febris (EF); Anemia (An);	1p36 (PP) 13q (Pa) 10p15.3-14 (EF)
Sakuntabhai et al., 2008	400 SNPs	Ligação	Senegal (África)	878	Densidade de parasitas – infec. assint. (DPA) Número de episódios clínicos de malária (NEM) Densid. máx. de parasitas – infec. assint.(DMPA)	5q31 (DPA) 5p15 (NEM) 12q21 (DMPA)
Sikora et al., 2009	880 SNPs	Associação	Moçambique (África)	360	Infecção placentária pelo <i>P. falciparum</i>	FUT9 (6q16)
Jallow et al., 2010	500K	Associação	Gana (África)	2560	Malaria severa (MS)	11p15 / HBB locus
Milet et al., 2010	250K	Ligação	Senegal (África)	626	Número de episódios de malária (NEM); Densidade média de <i>P. falciparum</i> (DMPf); Prevalência de <i>P. falciparum</i> assintomático (PPfA); Intensidade Infecção por <i>P. falciparum</i> (IIPf)	6p25.1 / 12q22 (NEM) 20p11q11 (DMPf)
Sikora et al., 2011	9K*	Associação	Moçambique (África)	360	Infecção placentária pelo <i>P. falciparum</i>	KLRK1 (12p13.2-p12.3) IL7/IL7R cascade

*Chip contendo somente SNPs relacionados à resposta imune e inflamatória.

FONTE: Pescarini (2012).

Os estudos de varredura genômica vêm se mostrando ferramentas importantes na descoberta de polimorfismos associados a muitas doenças comuns, como diabetes e Alzheimer, porém essas ferramentas explicam entre 5 e 50% dos fatores genéticos herdados dessas doenças. Sendo assim, muitos desses fatores ainda permanecem desconhecidos (Bustamante et al., 2011).

Outro ponto a ser considerado é a observação de que polimorfismos associados a uma determinada doença em uma população parecem ter efeitos distintos em cada grupo étnico ou localidade, mostrando que um achado em uma população nem sempre pode ser generalizado para outras. Além disso, 96% de todos os estudos de GWAS foram realizados em populações europeias e poucos foram conduzidos em populações miscigenadas (Need e Goldstein, 2009).

Assim, estudos em populações de diferentes grupos étnicos e minorias devem ser conduzidos de forma a se obter um quadro mais fidedigno e verificar quais variantes realmente importam no contexto global (Bustamante et al., 2011; Need e Goldstein, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A população de Monte Negro, Rondônia, assim como em muitas áreas da Amazônia brasileira, possui ancestralidade variada, composta por diferentes grupos étnicos e, a predominância da infecção por *Plasmodium vivax* com um padrão de transmissão oligoendêmico. Um estudo realizado no ano de 1998 neste município selecionou aleatoriamente 924 indivíduos (7% da população da época) e, por meio de análise de segregação complexa, indicou a presença de um mecanismo genético atuando no número individual de episódios de malária relatados nessa população (Camargo et al., 2002; La Luna, 2007).

Outro estudo, realizado no município de Portuchuelo, Rondônia, também por meio de análise de segregação, indicou a presença de um gene principal e aditivo relacionado ao número individual de episódios de malária relatados pelos indivíduos (Feitosa et al., 2002). Ferreira et al. (2008) estudaram, por intermédio de estudos de ligação com o uso de STRs, os indivíduos pertencentes a esse município e, encontraram um indício da presença de um mecanismo genético localizado no cromossomo 4, com um pico de lod score presente no braço curto desse cromossomo.

O presente estudo propõe uma abordagem diferente dos demais estudos na área de epidemiologia genética, uma vez que existem poucas informações genético-epidemiológicas de populações misturadas (Bustamante et al., 2011; Need e Goldstein, 2009) e, levando-se em conta que, até hoje, a maioria dos estudos do tipo GWAS de malária focalizou-se na África, onde existe a predominância de *P. falciparum*, cujo padrão da infecção é bastante diferente do *P. vivax*.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é verificar a validade dos resultados encontrados por Ferreira (2008) e La Luna (2007), analisando outra população (Monte Negro) e com uma abordagem distinta (estudos de associação do tipo caso-controle). Mais especificamente, o presente estudo tem como finalidade verificar a existência de possíveis regiões e/ou genes no cromossomo 4 e concomitantemente no resto do genoma, atuando no número de episódios de malária relatados e, que possa ser comum às diferentes populações da Amazônia ocidental brasileira estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MONTE NEGRO

Monte Negro (10°15'35"S, 63°18'06"W) é um município localizado no estado de Rondônia com pouco mais de 14 mil habitantes, distando cerca de 260 km da capital, Porto Velho (IBGE, 2011). No ano de 2005 estava entre os 12 municípios de maior IPA de malária do estado de Rondônia, chegando este a ser maior que 50 casos/1000 habitantes (Brasil, 2006).

Grande parte da população adulta deste município é originária de estados do sul e sudeste brasileiros, com alguma mistura com populações locais, que chegaram a Rondônia no início do século, durante o chamado "boom da borracha", ou mesmo antes (Camargo et al., 2002)

Um estudo conduzido em 1998, por Krieger e colaboradores entrevistou e realizou exames clínicos em 924 indivíduos desse município, o equivalente a 7% da população na época. As informações coletadas, como idade, sexo, histórico de doenças crônicas e infecciosas e exame clínico, em conjunto com a coleta de sangue serviram de base para estudos posteriores. A sorologia para HIV, HBC e tipagem de antígenos eritrocitários também foi realizada (Camargo et al., 2002; Ferreira, 2008).

É importante mencionar que a contribuição gênica na formação dessa população, medida pela presente amostra, é de aproximadamente 0,63 de europeus, 0,25 de africanos e 0,12 de ameríndios (Ferreira et al., 2002).

4.2 SELEÇÃO DOS GRUPOS CASO-CONTROLE

A partir da amostra original composta por 924 indivíduos pertencentes ao município de Monte Negro, os grupos caso e controle foram selecionados por intermédio de análises de regressão utilizando como ferramenta o programa SPSS (LEAD Technologies, versão 13.0). O número individual de episódios de malária foi transformado em logaritmo do número de malárias + 1 a fim de reduzir a variância dos números relatados. Essa variável foi denominada Nm.

Em seguida, a partir dos dados de sexo e idade foram calculadas outras variáveis: idade², sexo*idade e idade²*sexo. Todas foram utilizadas como variáveis independentes na regressão múltipla escalonada e, o número esperado de episódios de malária (Nm_e) foi calculado a partir dessa regressão conforme a equação 4.1. O valor de número de malárias corrigido (Nm_c) foi calculado pela diferença entre Nm e o esperado de modo a se obter o desvio do número de malárias de cada um dos indivíduos em relação ao esperado teórico, como descrito na equação 4.2.

Equação 4.1 - Equação da regressão.

$$Nm_e = 0.1054 + [(I * 0.0304) - (G * 0.1206) - (I^2 * 0.0003) + (IG * 0.0128) - (I^2G * 0.0001)]$$

Onde: I = Idade e G = Gênero.

Equação 4.2 - Número corrigido de episódios de malária.

$$Nm_c = Nm - Nm_e$$

Em seguida o Nm_c foi dividido pelo desvio padrão dessa variável (d.p.=0,45687) para a padronização dos valores obtidos, ou seja, o número de malárias padronizado (Nm_p).

A figura 4.3 mostra a variável obtida Nm_p=(Nm-Nm_c)/dp em relação à frequência dos indivíduos com cada um desses valores.

Deve-se salientar que o número de episódios de malária, bem como a variável obtida Nm_p mostraram-se indicadores confiáveis de resistência/suscetibilidade à malária, uma vez que o Nm está intimamente relacionado ao antígeno Duffy nessa população, de acordo com Ferreira et al. (2012) (em fase de elaboração)¹.

¹ Ferreira RMG, et al. São Paulo, 2012.

Figura 4.3 - Distribuição do valor padronizado de episódios de malária (Nm_p).

FONTE: Pescarini (2012).

Finalmente foram selecionados os indivíduos pertencentes às caudas de ± 1 desvio padrão (d.p.) da curva normal obtida após os procedimentos anteriores. Assim foi denominado o grupo caso aquele contendo os indivíduos com valores acima de 1 d.p. da média (144 indivíduos) e o grupo controle com aqueles indivíduos com um valor abaixo de -1 d.p (133 indivíduos).

Foram excluídos indivíduos de ambos os grupos que pertenciam a uma mesma família, restando após esse procedimento 76 casos e 88 controles. Alguns indivíduos, ainda, não possuíam sangue total armazenado no banco de material biológico para ser utilizado para a extração do DNA e realização dos ensaios de biologia molecular, assim, esses também foram excluídos do estudo.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA dos indivíduos selecionados para o estudo foi extraído a partir de amostras de sangue total coletadas em 1998 (Camargo et al., 2002) e, que estavam armazenados em freezer – 20 °C até o presente estudo.

Devido à dificuldade da extração de DNA a partir de amostras antigas, optou-se pela utilização do kit GenomiPhi V2 Amplification Kit[®] (GenomiPhi V2 Amplification Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) que utiliza a enzima Phi29 DNA-polimerase para amplificar o DNA genômico presente nas amostras de maneira a obter uma quantidade maior de DNA para ser estudada.

Assim, foi utilizado o protocolo ilustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit para amplificação de DNA a partir de sangue total.

Primeiramente o sangue foi lisado com solução de KOH/ EDTA/DTT (400:10:100mM), seguido da neutralização com tampão composto de HCl e Tris-HCl pH 7,5 (400:600mM).

Seguiu-se com a reação de amplificação do DNA presente no lisado com a enzima Phi29 DNA-polimerase. Após a amplificação do DNA, este foi precipitado com Álcool Isopropílico e Acetato de Sódio 3 M a temperatura ambiente. A precipitação foi seguida de dupla lavagem com etanol 70% e a ressuspensão do DNA em 50 µL de água Milli-Q. O DNA obtido foi quantificado no NanoDrop[®] (Nano Drop 2000c, Thermo Cientific, Wilmington, DE, USA) e armazenado à – 20 °C até sua utilização.

4.4 GENOTIPAGEM DE SNP PRESENTE NO GENE TLR1

A genotipagem do polimorfismo único S602I (1805G>T) presente no gene TLR1 foi realizada em 140 indivíduos (70 casos e 70 controles) por meio da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism).

Para a realização deste experimento, um fragmento de 280 pb do gene TLR1 foi amplificado a partir do DNA dos indivíduos pela reação da polimerase em cadeia (PCR). Essa reação foi padronizada para o experimento conforme a tabela 4.4.1, utilizando-se de iniciadores específicos descritos por Leoratti (2008), produzidos pela empresa BIONEER® (Bioneer, Alameda, CA, USA).

- TLR1 Forward: GGA AAG TTA TAG AGG AAC CCT
- TLR1 Reverse: CTT CAC CCA GAA AGA ATC GTG CC

Tabela 4.4 - Padronização da reação de polimerase em cadeia utilizada.

 Materiais	Volume	Concentração
Água Ultrapure	*	qsp. 20 µl
Buffer	2 µL	--
MgCl₂	1,2 µL	1.5 mM
Primers TLR1	1 µL	10 mM
dNTP	0,5 µL	40 mM
DNA	*	50 ng
Taq polimerase	1 µL	5U/µL
Total	20 µl	--

* Dependentes da concentração de DNA em cada amostra para a perfeita diluição.
 FONTE: Pescarini (2012).

A confirmação da presença do DNA amplificado nas amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando 2 µL de cada PCR.

Os géis foram corados com solução de Brometo de etídio (0,5 mg/mL) para a visualização do DNA em câmara fechada com lâmpada Ultravioleta (UV). Os géis foram fotografados e analisados.

Em seguida foi realizada a digestão do fragmento amplificado do gene TLR1. A enzima *Alu1* tem como temperatura ótima 37 °C, assim, a padronização do tempo da digestão foi realizada baseada nessa temperatura e o tempo fixado em 1,5 horas.

Na presença da variante G, quando o aminoácido serina (S) é codificado, a enzima *Alu1* digere o fragmento de 280 pb em dois de aproximadamente 130 pb e 150 pb. Na presença da variante T, quando é codificado o aminoácido isoleucina (I), a enzima *Alu1* não é capaz de reconhecer a seqüência e assim não irá digerir o fragmento de 280 pb.

O conteúdo digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 4% por aproximadamente 1,5 horas à 150 Volts e o gel corado com solução de Brometo de etídio (0,5 mg/mL). Os genótipos puderam então ser diferenciados entre os 3 existentes: homozigotos S/S, I/I e heterozigotos S/I, conforme a disposição das bandas observadas no gel.

É importante salientar que a visualização das bandas foi visivelmente aprimorada após submeter o conteúdo das digestões à 55 °C por 20 minutos em banho seco antes das mesmas serem aplicadas no gel de agarose.

4.5 GENOTIPAGEM POR MICROARRANJOS DE DNA

A genotipagem dos indivíduos foi realizada utilizando o microarranjo Affymetrix® GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), que possibilita a genotipagem de cerca de 261 mil SNPs em um único experimento.

Todos os procedimentos realizados foram aqueles constantes no manual GeneChip® 500K Assay Manual (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) e descritos na figura 4.5. O primeiro procedimento realizado foi a digestão do DNA genômico de cada indivíduo com a enzima de restrição *NspI* a fim de se obter fragmentos de DNA de menor complexidade para a amplificação e genotipagem de regiões específicas do genoma. Para a digestão, partiu-se de 250 ng de DNA de cada amostra.

O segundo passo foi a ligação do adaptador *NspI* nas extremidades dos DNAs digeridos com o uso da enzima T4 DNA ligase. O DNA ligado é então diluído para a realização do terceiro passo, a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde esse DNA é amplificado com o uso do kit TITANIUM™ DNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). Cada amostra é feita em triplicata para obtenção de uma maior quantidade de DNA amplificado ao final dessa etapa.

Após a amplificação do DNA, uma amostra do produto de cada uma das reações foi testada com o uso de eletroforese em gel de agarose 2%. Neste passo espera-se que os fragmentos de DNA amplificados estejam entre 250 e 1100 pb. O próximo passo foi a purificação do produto da PCR com o uso do

DNA Amplification Clean-Up Kit (Clontech), seguido da quantificação dos mesmos no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Cada amostra de DNA purificada, contendo 2500 ng de DNA, foi então submetida à fragmentação com DNase I e em seguida o tamanho dos fragmentos foi observado por intermédio de eletroforese em gel de agarose 4%. Os mesmos deveriam ser menores que 180 pb.

Após a fragmentação as amostras foram marcadas com o GeneChip[®] DNA Labeling Reagent (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), que utiliza a enzima TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) para transferir um nucleotídeo biotinilado para as extremidades 3' do DNA.

O DNA marcado foi então hibridizado com as sondas presentes no Genechip[®] 250 K Nsp I durante 16 á 18 horas no GeneChip[®] Hybridization Oven 645 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). No GeneChip[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) os microarranjos foram lavados com os tampões Wash A (6X SSPE, 0,01% Tween 20) e Wash B (0,6X SSPE, 0,01% Tween 20) para a retirada de sondas hibridizadas inespecificamente e a detecção das sonda hibridizadas com o sistema biotina-estreptavidina-ficoeritrina. Em seguida os chips foram lidos no GeneChip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Figura 4.5 - Resumo dos procedimentos para a genotipagem por microchips de DNA.

1- Digestão; 2- Ligação; 3- Diluição; 4- PCR; 5- Purificação; 6- Fragmentação; 7- Marcação/ Desnaturação; 8- Hibridação; 9- Lavagem; 10- Coloração; 11- Leitura.
 FONTE: Pescarini (2012).

Utilizando os dados de intensidade gerados pela leitura dos microarranjos, os genótipos dos indivíduos foram gerados no programa Affymetrix® Genotyping Console™ Software (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) e os mesmos foram exportados para o programa *PLINK* (Purcell et al., 2007), onde procedeu-se com as análises estatísticas. A tabela 4.6 resume os procedimentos e o local da realização para a preparação dos chips. É importante salientar que alguns dos procedimentos foram realizados em sala limpa, para evitar a contaminação das amostras em etapas cruciais do protocolo.

Tabela 4.6 - Local e procedimentos realizados para a obtenção dos microarranjos de DNA.

Procedimento		Local
1.	Digestão	Sala limpa
2.	Ligação	Sala limpa
3.	Reação de polimerase em cadeia (PCR) Gel de checagem da PCR	Sala limpa / Laboratório
4.	Purificação	Laboratório
5.	Fragmentação Gel de checagem da fragmentação	Laboratório
6.	Marcação	Laboratório
7.	Hibridação	Forno
8.	Lavagem	Estação fluídica
9.	Escaneamento	Scanner

FONTE: Pescarini (2012).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.6.1 Relação do fenótipo ao antígeno Duffy

Utilizando os dados disponíveis da análise do antígeno Duffy descritos por Ferreira (2008), foi realizado um teste de Qui-quadrado para verificar se os indivíduos selecionados para a genotipagem por microarranjos de DNA, caso e controle, continuavam intimamente relacionados ao fenótipo Fy-Fy-, como mostrado por Ferreira (2008).

4.6.2 Teste de associação para os polimorfismos 602 do gene TLR1

Os genótipos dos polimorfismos contidos no gene TLR1, obtidos para cada um dos indivíduos, foram inseridos na planilha do SPSS e testados para verificar possível associação entre este polimorfismo e o fenótipo estudado. Foram realizadas as análises de associação S x I e S/S x S/I x I/I, calculando os valores de Qui-quadrado para 1 e 2 graus de liberdade, respectivamente e,

os valores de p para cada um dos testes, sendo considerado significantes os valores de p inferiores a 0,05.

4.6.3 Verificação de Heterogeneidade entre os grupos caso e controle

Diferentes testes de hipótese foram empregados para a verificação de presença/ ausência de heterogeneidade entre os grupos caso e controle, selecionados para genotipagem pela técnica de varredura genômica. As variáveis ancestralidade (Ameríndia, Européia e Africana), gênero e idade foram testadas.

O teste T para análise de ancestralidade foi realizada por Santos (2011) (comunicação pessoal)² a partir das informações a cerca dos antígenos eritrocitários identificados nos indivíduos de Monte Negro, obtidos por Ferreira et al. (2002). A análise da variável gênero, utilizando o teste do Qui-quadrado de Pearson e, a análise da variável idade, pela metodologia de Kruskal-wallis, foram realizadas no presente trabalho.

Utilizando os dados dos 96 indivíduos selecionados para a genotipagem por meio da técnica de varredura genômica (48 indivíduos do grupo caso e os 48 indivíduos do grupo controle), foi verificada ausência de heterogeneidade ($p < 0,05$) entre os grupos no que se refere à ancestralidade (Ameríndia, Européia e Africana), gênero e idade, como mostrado nas tabelas 4.7.

Tabela 4.7 - Análise de heterogeneidade entre os casos e controles genotipados pela técnica de microarranjos de DNA.

Variável		Ca	Co	Metodologia	N	g.l.	X ²	p
Ancestralidade	Europeu	0.79	0.54	Teste T	92	1	1.12	n.s
	Ameríndio	0.18	0.17		92	1	0.09	n.s
	Africano	0.28	0.04		92	1	1.78	n.s
Gênero	Fem (0)	0.27	0.29	Qui-quadrado	96	1	0.05	n.s.
	Masc (1)	0.73	0.71					
Idade		35.27*	37.31*	Kruskal-wallis	96	45	40.4	n.s

Ca – grupo caso; Co – grupo controle; * Médias
 FONTE: Pescarini, 2012.

² Santos FAB. São Paulo, 2011.

4.6.4 Análises utilizando dados de varredura genômica

Os arquivos gerados pela leitura dos microarranjos foram genotipados no programa Genotyping Console 4.1 (Affymetrix) e em seguida os dados foram analisados utilizando como ferramenta o pacote do programa PLINK (Purcell et al., 2007).

Primeiramente foi realizada a análise de associação alélica (D x d), que consiste em comparar a frequência alélica de cada um dos alelos entre os grupos caso e controle, utilizando o teste do Qui-quadrado, verificando a possível existência de associação entre o polimorfismo e a característica estudada.

Exclusão de indivíduos Duffy negativos da amostra

As análises de associação alélica foram repetidas excluindo os indivíduos Duffy negativos da amostra, utilizando os dados de identificação dos antígenos eritrocitários realizada por Ferreira (2008). Essas análises tiveram como objetivo excluir a possibilidade das possíveis associações encontradas terem sido ocasionadas por uma distribuição não homogênea de indivíduos Duffy negativos entre os casos e controles.

Para as análises do tipo GWAS foram utilizados filtros como critério de seleção de SNPs e indivíduos. Os filtros estão descritos a seguir:

- a) equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW): Em uma amostra randômica de determinada população, espera-se que desvios do EHW sejam atribuídos a erros de genotipagem ou seleção. A exclusão de SNPs com um valor de p inferior a 0.001 indicam um grande desvio desse equilíbrio, e são excluídos da análise, podendo ser analisados separadamente (Zeggini e Morris, 2011);
- b) “Call rate” ou taxa de genotipagem: Esse tipo de filtro é utilizado para detectar SNP com baixa qualidade de genotipagem, sendo excluídos SNPs com menos de 95% de genotipagem no caso de polimorfismos comuns (Zeggini e Morris, 2011);
- c) frequência alélica mínima (MAF): Polimorfismos raros são mais suscetíveis a erros de genotipagem e, por isso, é utilizada uma taxa de

MAF entre 1% (mais comum) e 5% (Zeggini e Morris, 2011; Ziegler et al., 2008);

d) taxa de genotipagem de indivíduos: esse tipo de controle de qualidade varia entre 97 e 90%, uma vez que depende da amostra utilizada (Ziegler et al., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 RELAÇÃO DO FENÓTIPO AO ANTÍGENO DUFFY

A análise foi realizada a partir dos dados sobre o antígeno Duffy dos 96 indivíduos selecionados para a genotipagem pela técnica de microarranjos de DNA (48 casos e 48 controles). A tabela 5.1 mostra os valores obtidos dos testes de Qui-quadrado e o valor de p , sendo em destaque os valores com significância de 95%.

Tabela 5.1 - Análise da relação entre o fenótipo estudado e o antígeno Duffy.

Fenótipo	g. l.	N	χ^2	p	p (Yates)
Fy- x Fya/Fyb/FyaFyb	1 g.l.	96	4,9	< 0,05	0.06
Fy- x Fya x Fyb x FyaFyb	3 g.l.	96	5,4	n.s.	--

FONTE: Pescarini (2012).

5.2 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO S602I DO GENE TLR1

Os genótipos dos 140 indivíduos foram obtidos por meio de análise em eletroforese em gel de agarose 4%, como ilustrado na figura 5.2.

Figura 5.2 - Gel de agarose (4%) mostrando os diferentes genótipos do polimorfismo S602I.

Colunas 1 e 8 – *Ladder*; Colunas 2 á 4 - indivíduos S/I; Coluna 5 – Indivíduos S/S;
Colunas 6 e 7 - Indivíduos I/I.
FONTE: Pescarini (2012).

Os dados da genotipagem do polimorfismo S602I dos indivíduos foram contabilizados e o teste do Qui quadrado (tabela 5.3) mostrou ausência de associação entre o fenótipo estudado e o polimorfismo S602I no gene TLR1.

Tabela 5.3 - Análise de associação entre os genótipos do polimorfismo S602I do gene TLR1 e o fenótipo.

Genótipo	Graus de liberdade	N	Chi-quadrado	<i>p</i>
I x S	1 g.l.	135	0,175	n.s.
I/I x I/S x S/S	2 g.l.	135	0,038	n.s.

FONTE: Pescarini (2012).

5.3 MICROARRANJOS DE DNA

Para a realização da genotipagem pela técnica de microarranjos de DNA, foram escolhidos 96 indivíduos (48 casos e 48 controles) da amostra inicialmente selecionada, que possuíam quantidade de DNA suficiente para ser trabalhada. Não foi feita qualquer outra distinção para a seleção desses indivíduos.

5.3.1 Análise de associação alélica do cromossomo 4

A fim de verificar, na população de Monte Negro, a sugestão de Ferreira (2008), que mostrou um indício de ligação entre uma região do cromossomo 4 e o número de episódios de malária, partiu-se primeiramente para a análise dos SNPs presentes neste cromossomo.

Assim, a partir dos dados de genotipagem dos 96 indivíduos por meio da técnica de microarranjos de DNA, foram selecionados todos os SNPs presentes no cromossomo 4, efetivamente genotipados em todos os indivíduos, que se apresentavam em EHW ($p < 0,001$) e com MAF de 1%.

Com isso 25 SNPs distribuídos ao longo do cromossomo 4 foram selecionados. O valor de *p* obtido nesse estudo para um nível de 5% significância deve ser multiplicado pelo número de SNPs avaliados, de acordo com a correção de Bonferroni para testes múltiplos.

A representação gráfica da associação entre os polimorfismos e a característica estudada pode ser visualizada no “Manhattan Plot” (Figura 5.4), onde os pontos vermelhos representam os SNPs, com seus respectivos valores de $-\log(p)$ no eixo Y e, a posição no cromossomo 4 no eixo X.

Figura 5.4 - Visualização gráfica dos SNPs ao longo do cromossomo 4.

FONTE: Pescarini (2012).

Somente um SNP, o rs17527389 ($\chi^2 = 12.22$; $p_{corr} = 0.012$) foi considerado significativamente associado ao número de episódios de malária relatado pelos indivíduos.

5.3.2 Análise de associação alélica do genoma completo

Para essa análise foram selecionados somente indivíduos com mais de 85% de genotipagem devido á baixa qualidade do DNA na amostra, o que impossibilitaria uma seleção mais restrigente. Porém, foram selecionados SNPs genotipados em 95% dos indivíduos, com MAF de 1% e, dentro do EHW ($p > 0.001$).

Foram selecionados 72.225 SNPs. Nesse caso, o valor de p corrigido por Bonferroni é $p < 0,05/72.225 \text{ SNPs} = 6,9 \times 10^{-7}$. Novamente verificou-se

que nenhum SNP ultrapassou o limiar determinado pela correção de Bonferroni, apesar do número de SNPs selecionados ter sido menor. No entanto 52 SNPs obtiveram um valor de $p < 1 \times 10^{-3}$ (ANEXO A, Página 68) podendo estar eventualmente associados ao número de episódios de malária em Monte Negro.

A representação gráfica da associação entre os polimorfismos e a característica estudada pode ser novamente visualizada no Manhattan Plot abaixo (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Manhattan Plot na análise de associação alélica do genoma completo.

FONTE: Pescarini (2012).

Análise de polimorfismos presentes na região do gene DARC (Duffy)

Utilizando os dados a análise de associação alélica anterior e, de maneira a complementar a mesma, verificou-se quais eram os valores de p para os polimorfismos na região do gene DARC, presente no cromossomo1, região 1q21-q22. Observou-se que o gene DARC/ Duffy não possui nenhum polimorfismo dentro do gene, porém está coberto por dois polimorfismos, sendo

um deles a 13 Kb do início do mesmo (downstream) e o outro a 23 Kb após o fim do gene (upstream). Os números dos polimorfismos, posição, distâncias em relação ao gene e valores de p encontrados nesta análise estão listados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Polimorfismos na região do gene Darc/Duffy.

Marcador	Posição	Distância - DARC	Valor de p
rs862989	157427903	13kb	0,4137 (n.s.)
rs10489848	157461036	23kb	0,3165 (n.s.)

FONTE: Pescarini (2012).

5.3.3 Análise de associação alélica sem indivíduos Duffy negativos

A exclusão de indivíduos Duffy negativos da amostra genotipada pela técnica de microarranjos de DNA culminou na exclusão de 1 controle e 7 casos, restando 88 indivíduos (47 casos e 41 controles) para esta análise.

Análise de associação alélica do cromossomo 4

Para essa análise foram considerados os mesmos critérios de seleção de SNPs utilizados no item 5.3.1, a fim de comparar os resultados obtidos com a análise com indivíduos Duffy negativos na amostra.

A utilização dos filtros para SNPs de MAF de 1%, taxa de genotipagem de 100% e que estavam em Equilíbrio de Hardy Weinberg ($p > 0,001$), selecionaram 44 polimorfismos. Para esse número de testes simultâneos era esperado um valor de p inferior a 0,001 (0,05/44), segundo a correção de Bonferroni. Sendo assim, nessa análise não foram obtidos polimorfismos significantes, associados ao fenótipo estudado.

Análise de associação alélica do genoma completo

A análise de associação alélica do tipo GWAS foi realizada com os mesmos critérios de seleção de SNPs e indivíduos utilizados no item 5.3.2, a fim de comparar os resultados desta análise com contendo indivíduos Duffy negativos na amostra.

Os filtros para seleção de indivíduos (taxa de genotipagem individual de 85%) e de SNPs (MAF de 1%, taxa de genotipagem de 95% e EHW ($p > 0,001$)), selecionaram 77.747 polimorfismos distribuídos pelo genoma. O valor de p corrigido por Bonferroni para essa análise é $p < 0,05/77.747 \text{ SNPs} = 6,4 \times 10^{-7}$.

Novamente não foram observados polimorfismos com o valor de p abaixo do estipulado pela correção de Bonferroni. No entanto 65 SNPs obtiveram o valor de p abaixo do limiar de 1×10^{-3} (ANEXO B, página 69).

A representação gráfica dos SNPs analisados está na figura 5.3.3A. No eixo X estão representados os cromossomos e no eixo Y o logaritmo negativo dos valores de p obtidos na análise.

Figura 5.7 - Manhattan plot da análise de associação alélica sem indivíduos duffy negativos.

FONTE: Pescarini (2012).

5.3.4 Análise comparativa das análises de associação alélica de genoma com e sem indivíduos Duffy negativos

Mediante comparação entre os resultados obtidos nas análises com e sem indivíduos Duffy negativos na amostra, 31 polimorfismos apareceram em ambas, sendo relacionados na tabela 5.8.

Considerando somente polimorfismos que tiveram seu valor de p diminuído ou praticamente mantido após a exclusão de indivíduos Duffy negativos da análise, 17 SNPs tiveram seu valor de p diminuído ou muito próximo na segunda análise (sem indivíduos Duffy negativos). Esses foram destacados em negrito na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Marcadores selecionados a partir das análises com e sem indivíduos Duffy negativos na amostra. (continua)

	Marcador	Chr	Posição	Valor de p (total)	Valor de p (sem Duffy)	Localização
1.	rs6426015	1	37543210	$6,346 \times 10^{-4}$	$8,789 \times 10^{-4}$	*
2.	rs7551462	1	117639138	$7,843 \times 10^{-5}$	$9,788 \times 10^{-4}$	*
3.	rs3796504	1	158847173	$7,861 \times 10^{-4}$	$4,034 \times 10^{-4}$	SLAMF1
4.	rs17518475	2	53701239	$5,672 \times 10^{-4}$	$1,529 \times 10^{-4}$	ASB3
5.	rs17251018	2	169296441	$3,488 \times 10^{-4}$	$1,959 \times 10^{-4}$	CERS6
6.	rs610118	3	27311217	$4,284 \times 10^{-5}$	$6,377 \times 10^{-5}$	NEK10
7.	rs12695132	3	107395968	$9,486 \times 10^{-5}$	$2,144 \times 10^{-4}$	*
8.	rs7627904	3	140362628	$3,414 \times 10^{-4}$	$1,043 \times 10^{-4}$	MRPS22
9.	rs17527389	4	40817259	$1,419 \times 10^{-4}$	$2,936 \times 10^{-4}$	APBB2
10.	rs17660753	4	40898762	$2,596 \times 10^{-4}$	$4,843 \times 10^{-4}$	APBB2
11.	rs4280691	4	165946521	$3,752 \times 10^{-4}$	$6,597 \times 10^{-4}$	*
12.	rs697614	5	67889445	$8,557 \times 10^{-4}$	$4,881 \times 10^{-4}$	ENSR00001410288
13.	rs6885946	5	114131215	$5,422 \times 10^{-4}$	$2,287 \times 10^{-4}$	*
14.	rs12526074	6	130749113	$5,566 \times 10^{-4}$	$4,433 \times 10^{-4}$	TMEM200A
15.	rs2633951	6	141456535	$3,903 \times 10^{-4}$	$7,971 \times 10^{-4}$	*
16.	rs221188	7	28979588	$6,96 \times 10^{-5}$	$5,181 \times 10^{-6}$	TRIL / CPVL
17.	rs12668127	7	127148632	$7,627 \times 10^{-4}$	$6,257 \times 10^{-4}$	*
18.	rs11782622	8	18693453	$1,95 \times 10^{-4}$	$6,724 \times 10^{-4}$	PSD3
19.	rs2491398	9	100247246	$8,729 \times 10^{-4}$	$5,998 \times 10^{-4}$	GABBR2
20.	rs9329290	10	2532751	$2,714 \times 10^{-4}$	$6,201 \times 10^{-4}$	*

Tabela 5.8 - Marcadores selecionados a partir das análises com e sem indivíduos Duffy negativos na amostra. (conclusão)

21.	rs7918405	10	114495455	$2,31 \times 10^{-4}$	$2,386 \times 10^{-4}$	VTI1A
22.	rs7068695	10	114506363	$6,813 \times 10^{-4}$	$1,721 \times 10^{-4}$	VTI1A
23.	rs12772424	10	114870541	$7,691 \times 10^{-4}$	$7,211 \times 10^{-4}$	TCF7L2
24.	rs633687	11	87575672	$4,153 \times 10^{-4}$	$5,094 \times 10^{-4}$	RAB38
25.	rs648519	11	98972936	$1,638 \times 10^{-4}$	$2,327 \times 10^{-4}$	CNTN5
26.	rs874199	13	98415108	$4,51 \times 10^{-4}$	$1,156 \times 10^{-4}$	DOCK9
27.	rs1741240	14	94431794	$6,17 \times 10^{-5}$	$5,799 \times 10^{-5}$	*
28.	rs16962583	15	47600407	$3,485 \times 10^{-4}$	$6,222 \times 10^{-4}$	FGF7 / C15orf33
29.	rs1423988	16	63305970	$1,708 \times 10^{-4}$	$5,998 \times 10^{-4}$	*
30.	rs8098517	18	68856361	$8,557 \times 10^{-4}$	$2,009 \times 10^{-4}$	*
31.	rs6083320	20	23839641	$8,054 \times 10^{-4}$	$4,228 \times 10^{-4}$	CST5

* Somente foram selecionadas genes distantes a menos de 50kb downstream ou upstream dos polimorfismos listados. Genes e RNAs putativos e pseudogenes não foram considerados.

FONTE: Pescarini (2012).

6 DISCUSSÃO

O município de Monte Negro é composto por uma população miscigenada e de origem recente, como mostrado por Camargo et al. (2002). Devido ao fato de existir uma mistura de genes recente promovida pela migração de grupos de diferentes procedências para essa região, os quais já possuíam composição étnica variada, é lógico imaginar que o tempo de permanência dessa população em Monte Negro é insuficiente para gerar seleção de genes relacionados à resistência a malária nessa população.

Ferreira (2008) demonstrou a relação clara entre o número individual de episódios relatados e o fenótipo Fy⁻ na população de Monte Negro, que existe um gene principal determinante deste fenótipo, ainda que o Duffy não seja o gene principal determinante dessa característica.

Assim a análise do Fy com os indivíduos selecionados para o presente estudo foi necessária para testar a existência da relação do número individual de episódios de malária relatados nessa população após a seleção dos grupos caso e controle.

Como mostrado na tabela 5.1, a relação entre Duffy negativos e o fenótipo continuou existente, ainda que não significativamente após a aplicação da correção de Yates.

A escolha da localização do gene candidato se deu por meio da indicação de Ferreira (2008), que relacionou ao braço curto do cromossomo 4 ao logaritmo do número de episódios de malária relatados e corrigidos para sexo e idade e, principalmente dos resultados de Leoratti et al. (2008) e Casseb (2010), que deixam clara a relação do polimorfismo S602I do gene TLR1 (4p14) e diferentes fenótipos da malária em populações brasileiras.

Os dados de Leoratti (2008) e Casseb (2010) não foram confirmados para esse fenótipo e população, descartando a hipótese desse polimorfismo ser o mesmo apontado por Ferreira (2008) para o fenótipo estudado nesse trabalho.

O gene TLR1 encontra-se flanqueado por outros dois Toll like Receptors (TLR10 e TLR6), porém essa região apresenta baixo desequilíbrio de ligação (LD) em populações africanas (Flicek, 2011). Devido ao fato da população de Monte Negro possuir mistura étnica, com presença de indivíduos com origem

européia, africana e ameríndia e, de origem relativamente recente (inferior a 100 anos), não se conhece o LD entre a região TLR6/TLR1/TLR10. Assim, não é possível descartar a presença de algum outro SNP candidato em potencial nessa região relacionado ao número de episódios de malária corrigido (fenótipo estudado) nessa população.

A partir desses resultados optou-se por realizar uma nova abordagem, utilizando o ensaio de varredura genômica, uma vez que esta é capaz de realizar um grande número de testes simultâneos e possui uma grande cobertura do cromossomo 4 e do genoma.

Por meio da análise do cromossomo 4, foi possível identificar o polimorfismo rs17527389 como um possível marcador associado ao fenótipo estudado em Monte Negro, convergindo com o trabalho de Ferreira (2008). No entanto, a segunda análise do cromossomo 4, excluindo os indivíduos Duffy negativos da amostra, não obteve o mesmo resultado, uma vez que não identificou polimorfismos associados ao mesmo fenótipo. Assim, foi descartada a hipótese desse polimorfismo estar associado ao fenótipo de malária estudado.

Após a análise do cromossomo 4, os dados de varredura genômica obtidos pela utilização dos microarranjos de DNA foram utilizados a fim de verificar a possível existência de outras regiões no genoma associadas ao fenótipo de malária estudado.

Os ensaios de varredura genômica utilizam múltiplos testes simultâneos e por isso, para serem considerados associados a um determinado fenótipo precisam atingir um limiar de exigência mais elevado, ou seja, um valor de p mais baixo, que pode ser determinado pelo nível de significância esperado de 0,05 para um teste único dividido pelo número de testes realizados. Essa correção, denominada correção de Bonferroni deve ser aplicada em ensaios do tipo GWAS e por isso, foi calculado o valor mínimo de p de 2×10^{-7} para que os polimorfismos estudados no GWAS sem filtros sejam considerados significantes e o valor de $6,9 \times 10^{-7}$ no GWAS com filtros.

Esse tipo de correção para múltiplos testes requer limiares do valor de p muito rigorosos para serem considerados estatisticamente significantes, sendo considerada conservadora e assumindo que cada SNP no chip é independente, o que é inapropriado, já que devemos considerar o LD entre os diferentes

polimorfismos no mesmo. Por isso, os estudos do tipo GWA requerem um ou mais conjuntos de replicações decorrentes do estudo inicial utilizando os polimorfismos com maior significância encontrados neste, que pode ser da ordem de 10^{-6} , 10^{-5} ou mesmo 10^{-4} a fim de minimizar as perdas decorrentes de resultados falsos negativos e identificar possíveis falsos positivos (Manolio, 2010; Ziegler et al., 2008).

Jallow et al. (2009) determinam o limiar de 1×10^{-3} como os polimorfismos potencialmente candidatos a uma associação verdadeira. Sendo assim, uma vez que o limiar de p sugerido pela correção de Bonferroni não foi atingido, o limiar 1×10^{-3} foi determinado a fim de sugerir polimorfismos potencialmente associados ao fenótipo estudado e que, pudessem ser replicados em estudos posteriores.

Outro ponto importante em análises do tipo GWAS é a utilização de filtros como critério de seleção de SNPs, que são amplamente utilizados para melhorar a qualidade de genotipagem e evitar assim, resultados falsos positivos (Jallow et al., 2009; Ziegler et al., 2008).

Na análise utilizando os dados obtidos no ensaio de varredura genômica, 52 polimorfismos possuíam valores de p abaixo do limiar estipulado de 1×10^{-3} , como mostrado no ANEXO A (Pág. 68), enquanto que na análise excluindo os indivíduos Duffy negativos, 65 SNP estavam abaixo desse limiar. Foram obtidos 31 SNPs concordantes nas duas análises, ou seja, que obtiveram um valor de p inferior a 1×10^{-3} em ambas as análises. Esses SNPs foram listados na tabela 5.8.

Apesar do fenótipo Duffy negativo estar intimamente relacionado ao fenótipo estudado e, este fator ter sido considerado para a exclusão de indivíduos Fy^+Fy^- na segunda análise, os polimorfismos mais próximos de gene DARC não apresentaram valores de p indicativos de associação. Tal fato pode ser devido à ausência de desequilíbrio de ligação na região desse gene na população estudada.

A análise de GWAS excluindo indivíduos Duffy negativos da amostra foi importante para demonstrar que, sem esse indivíduos, alguns dos polimorfismos que já tinham, na análise inicial, aparecido com valores de p inferiores a 1×10^{-3} , tiveram seu valor de p diminuído, aumentando o indício de associação entre esses SNPs e o fenótipo estudado.

Observando o Manhattan plot das análises com e sem indivíduos Duffy negativos na amostra, é possível destacar alguns marcadores presentes em genes possivelmente relacionados à característica estudada. São esses os marcadores presentes nos genes SLAMF1 (rs3796504), ASB3 (rs17518475), APBB2 (rs17527389/rs17660753), TRIL (rs221188) e VT11A (rs7918405/rs7068695).

O gene SLAMF1 (Signaling Lymphocyte Activation Molecule), também conhecido como CDw150, pertence à superfamília dos genes das imunoglobulinas é expresso em células T de memória, clones de células T, timócitos imaturos, algumas células B e rapidamente induzido em células T jovens após sua ativação (Cocks et al., 1995) e, possui um papel importante no desenvolvimento das células T do tipo Natural Killer (NK), uma vez que os níveis de SLAMF1 são inversamente proporcionais ao número de células T NK (Jordan et al., 2011).

Foi visto que em células B ativadas, a glicoproteína SLAMF1 ou SLAM é encontrada ligada a membrana da célula e sob a forma solúvel no citoplasma dessas células, induzindo a produção de IgM, IgG e IgA. Ainda foi sugerida que ligações SLAM-SLAM por meio de interações de células B-B e B-T aumentam a expansão e diferenciação de células B ativadas (Punnonen et al., 1997). Além disso, também foi verificado que SLAMF1 é utilizado como receptor por cepas do vírus do sarampo (Tatsuo et al., 2000).

As funções descritas para SLAMF1 mostraram a) Uma relação clara entre SLAMF1 e a ativação da resposta imune e a produção de imunoglobulinas, que poderia ser importante no fenótipo estudado uma vez que células T NK e T possuem papel importante no desenvolvimento de uma resposta imune adequada ao *Plasmodium*; b) O papel de SLAMF1 como receptora de células virais. Essas relações indicando um possível papel entre o marcador presente nesse gene e fenótipo de malária aqui estudado.

O gene ASB3 é um membro da família dos SOCS (Suppressor of cytokine signaling), cuja expressão ocorre em diferentes tecidos, sendo induzida por citocinas de forma a regular negativamente a transdução de sinal (Kile et al., 2000). Por sua vez, ASB3 regula negativamente as respostas celulares mediadas por TNF-R2 em resposta ao TNF-alfa (Chung et al., 2005).

O gene APBB2 (APBB2 amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2) ou também denominada FE65L1 possui dois domínios do tipo PTB (phosphotyrosine binding domain), que são capazes de se ligar á proteínas APP (amyloid beta precursor protein), funcionando possivelmente como um mecanismo na transdução de sinal na célula (McLoughlin e Miller, 1996; Online Mendelian Inheritance in Man, 2011).

A proteína FE65L1, quando superexpressa, está presente no núcleo e afeta a regulação de timidilato sintetase durante o ciclo celular, bloqueando a progressão do mesmo. Estudos também sugeriram a presença de domínios anti-apoptóticos do tipo TR2L na região C-terminal das proteínas da família FE65-like, a que pertence a FE65L1. Esses domínios protegem a célula da morte celular programada ou apoptose, por meio do bloqueio aos efeitos citotóxicos do TNF- α (fator de necrose tumoral) de maneira caspase-independente (Bruni et al., 2002; Cao et al., 2000; Lange et al., 2005).

Devido ao fato de ser observado um aumento de TNF- α em formas mais severas da malária e, de polimorfismos no TNF- α estarem relacionados a diferentes fenótipos de malária (Basu et al., 2010; Sinha et al., 2008), a proteína FE65L1, descrita como uma espécie de “protetora” aos efeitos do TNF- α e o gene ASB3, que regula negativamente o TNF-R2, tiveram seus marcadores indicados como potencialmente relacionados ao fenótipo estudado.

O TRIL (TLR4 Interactor with leucine repeats) é uma proteína localizada na membrana celular dos endossomos e, que faz parte do complexo do TLR4, interagindo com este principalmente quando estimulado por LPS. O componente TRIL também pode interagir com LPS e possivelmente com dsRNAs. Este gene, quando silenciado, diminui a estimulação de TLR4 em células murinas e humanas (Carpenter et al., 2009, 2011).

A estimulação de TLR4 é por GPI de *P. falciparum* é conhecida e importante na infecção malárica. Apesar das infecções maláricas nas Américas serem, em sua maioria, decorrentes da infecção por *P. vivax*, é importante citar o papel que esse marcador ou gene pode ter no número de episódios de malária.

O VTI1A (Vesicle Transport through Interaction with t-SNAREs homolog 1A) faz parte, em conjunto com VAMP7, de um SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors). Os

complexos SNAREs constituem a maquinaria central para a fusão de membranas, sendo essencial para o transporte intracelular por meio de vesículas. A VT11A age no transporte de vesículas entre o Complexo de Golgi e a membrana plasmática em células neuronais e não neuronais bem como na regulação da fusão espontânea de vesículas (Flowerdew e Burgoyne, 2009; Ramirez et al., 2012).

Os marcadores presentes nesse gene se mostram bons candidatos uma vez que o desenvolvimento do *Plasmodium* no eritrócito é realizado dentro de vacúolos parasitóforos e, o *Plasmodium* requer o transporte de várias proteínas codificadas por ele para locais como o citosol e a membrana da célula infectada, que se dá através do vacúolo parasitóforo (Sijwali e Rosenthal, 2010).

Tendo em vista a necessidade da utilização de um valor de p mínimo para a seleção de polimorfismos e a replicação dos mesmos em amostras independentes, sugere-se a replicação dos polimorfismos com valores de p abaixo de 10^{-3} , comuns às análises com e sem indivíduos Duffy negativos, tal como descrito na tabela 5.8, mas principalmente aqueles que estão presentes perto ou dentro de genes potencialmente relacionados a característica estudada e discutidas neste item.

Deve-se ficar atento para o fato da existência de resultados conflitantes para os marcadores do cromossomo 4 nas análises com e sem indivíduos Fy negativos. Pode ser aventada a hipótese de uma interação entre Fy e o marcador do cromossomo 4 (rs17527389).

7 CONCLUSÕES

- Este trabalho constata que o fenótipo de malária estudado está intimamente relacionado ao antígeno Duffy negativo (Fy-Fy-), apesar dos polimorfismos adjacentes ao gene não estarem associados ao fenótipo.
- Foi verificado que o polimorfismo S602I no gene TLR1, presente no braço curto do cromossomo 4, não apresentou associação com o fenótipo de malária estudado. Portanto, esse polimorfismo não é o mesmo que originou a busca no cromossomo 4 pela indicação de Ferreira (2008), apesar de não ser possível descartar a região a qual pertence o polimorfismo e o gene estudado, devido ao baixo LD dessa região.
- A partir dos dados de varredura genômica foi verificado que a busca específica do cromossomo 4 foi importante, já que limitou o número de polimorfismos avaliados, evidenciando a presença de um polimorfismo associado ao fenótipo estudado.
- A exclusão dos indivíduos Duffy negativos da análise de varredura genômica mostrou a importância de eliminar eventuais fatores de confusão, por meio da retirada ou da análise separada de indivíduos com genótipos relevantes ao fenótipo a ser estudado.
- A análise comparativa de todos os indivíduos vs. indivíduos duffy positivos se mostrou eficaz uma vez que sugeriu marcadores em genes potencialmente associados ao fenótipo estudado, presentes em ambos os estudos.
- Este trabalho indica a necessidade de replicação dos 31 polimorfismos selecionados a partir do valor de p abaixo de 10^{-3} em uma amostra independente, compondo um grupo de SNPs candidatos, com possibilidade de apresentarem uma associação real com a resistência à malária.
- Análises conjuntas de marcadores candidatos e os fenótipos de Fy podem ser informativos de interações gênicas inéditas.

REFERÊNCIAS*

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.

Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J*. 1954 Feb 6;1(4857):290-4.

Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):641-8.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010 Jan 13;9:13.

Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*. 2009 May;25(5):220-7.

Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In Vitro Evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1795-802.

Basu M, Maji AK, Chakraborty A, Banerjee R, Mullick S, Saha P, *et al.* Genetic association of Toll-like-receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with *Plasmodium falciparum* blood infection levels. *Infect Genet Evol*. 2010 Jul;10(5):686-96.

Bienzle U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet*. 1972 Jan 15;1(7742):107-10.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da saúde. Malária: conhecendo mais sobre a Malária. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31082&janela=1>. [2012 jan. 31].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação: Rondônia / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 24 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Notificação de casos: malária. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21400. [2011 dez. 20].

Bruni P, Minopoli G, Brancaccio T, Napolitano M, Faraonio R, Zambrano N, et al. Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. *J Biol Chem*. 2002 Sep;277(38):35481-8.

Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis*. Oct 2006;6(10):653–63.

Bustamante CD, Burchard EG, De la Vega FM. Genomics for the world. *Nature*. 2011 Jul 13;475(7355):163-5.

Camargo LM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Basano SA, da Silva LH, et al. A rural community in a Brazilian Western Amazonian Region: some demographic and epidemiological patterns. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Mar;97(2):193-5.

Cao H, Pratt N, Mattison J, Zhao Y, and Chang NS. Characterization of an Apoptosis Inhibitory Domain at the C-Termini of FE65-like Protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Oct 5;276(3):843-50.

Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):64-74.

Carpenter S, Carlson T, Dellacasagrande J, Garcia A, Gibbons S, Hertzog P, Lyons A, Lin LL, Lynch M, Monie T, Murphy C, Seidl KJ, Wells C, Dunne A, O'Neill LA. TRIL, a functional component of the TLR4 signaling complex, highly expressed in brain. *J Immunol*. 2009 Sep 15;183(6):3989-95.

Carpenter S, Wochal P, Dunne A, O'Neill LA. Toll-like receptor 3 (TLR3) signaling requires TLR4 Interactor with leucine-rich REPeats (TRIL). *J Biol Chem*. 2011 Nov 4;286(44):38795-804.

Casseb AA. Distribuição de marcadores genéticos em área endêmica de malária: estudo genético epidemiológico em comunidades ribeirinhas de Porto Velho/RO. Tese (Doutorado em Biologia Experimental). Porto Velho: Núcleo de Saúde, Fundação Universidade de Rondônia; 2010.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Malaria Biology. Available from: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>. [2011 dez. 14].

Chung AS, Guan YJ, Yuan ZL, Albina JE, Chin YE. Ankyrin repeat and SOCS box 3 (ASB3) mediates ubiquitination and degradation of tumor necrosis factor receptor II. *Mol Cell Biol*. 2005 Jun;25(11):4716-26.

Clark TG, Fry AE, Auburn S, Campino S, Diakite M, Green A, et al. Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. *Eur J Hum Genet*. 2009 Aug;17(8):1080-5.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. 1995 Jul 20;376(6537):260-3.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15;46(2):165-71.

Davila S, Hibberd ML. Genome-wide association studies are coming for human infectious diseases. *Genome Med*. 2009 Feb 10;1(2):19.

Eid NA, Hussein AA, Elzein AM, Mohamed HS, Rockett KA, Kwiatkowski DP, Ibrahim ME. Candidate malaria susceptibility/protective SNPs in hospital and population-based studies: the effect of sub-structuring. *Malar J*. 2010 May 8;9:119.

Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science*. 2007 Aug 17;317(5840):944-7.

Feitosa MF, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Pereira da Silva LH, et al. Major Genetic Mechanism Involved in Resistance to Malaria in Western Amazonia. *Int J Hum Genet*. 2002;2(2):77-80.

Ferreira RGM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LMA, et al. Ethnic Admixture Composition of Two Western Amazonian Populations. *Human Biology*. 2002 Aug;74(4):607-13.

Ferreira RGM. Genética epidemiológica de malária em Rondônia. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, et al. Ensembl 2011. *Nucleic Acids Research*. 2011;39 Suppl 1:D800-6.

Flowerdew SE, Burgoyne RD. A VAMP7/Vti1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels. *Biochem J*. 2009 Mar 15;418(3):529-40.

Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med.* 2007 Mar;4(3):e66.

Hamann L, Bedu-Addo G, Eggelte TA, Schumann RR, Mockenhaupt FP. The toll-like receptor 1 variant S248N influences placental malaria. *Infect Genet Evol.* 2010 Aug;10(6):785-9.

Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis.* 2004 Jun;4(6):327-36. Review.

Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NT, Quy HT, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol.* 2007 Aug;37(8):2280-9.

Hedrick PW. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity.* 2011 Oct;107(4):283-304.

Hobbs C, Duffy P. Drugs for malaria: something old, something new, something borrowed. *F1000 Biol Rep.* 2011;3:24.

Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun.* 2011;2:266.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Demográfico 2010. Municípios: Rondônia. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ro#>>. [2011 dez. 21].

Jallow M, Teo YY, Small KS, Rockett KA, Deloukas P, Clark TG, et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat Genet.* 2009 Jun;41(6):657-65.

Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. Cutting Edge: Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but protects against Leprosy. *J. Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7520-4.

Jordan MA, Fletcher JM, Jose R, Chowdhury S, Gerlach N, Allison J, et al. Role of SLAM in NKT cell development revealed by transgenic complementation in NOD mice. *J Immunol.* 2011 Apr 1;186(7):3953-65.

Kile BT, Viney EM, Willson TA, Brodnicki TC, Cancilla MR, Herlihy AS, et al. Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4. *Gene.* 2000 Nov 27;258(1-2):31-41.

Körner H, McMorran B, Schlüter D, Fromm P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol.* 2010 Jul;40(8):879-88.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8606-16.

Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 1990 Nov 17;336(8725):1201-4.

Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012 Jan 9;11(1):12.

La Luna A. Estudo genético-epidemiológico do número de episódios de malária em uma amostra de Monte Negro, RO. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Lange A, Thon L, Mathieu S, Adam D. The apoptosis inhibitory domain of FE65-like protein 1 regulates both apoptotic and caspase-independent programmed cell death mediated by tumor necrosis factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 23;335(2):575-83.

Leoratti FMS, Farias L, Alves FP, Suarez-Múti MC, Coura JR, Kalil J, et al. Variants in the Toll-Like Receptor Signaling Pathway and Clinical Outcomes of Malaria. *J Infect Dis*. 2008 Sep 1;198(5):772-80.

López C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene*. 2010 Nov 1;467(1-2):1-12.

Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*. 2010 Jul 8;363(2):166-76. Review.

May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, Thye T, et al. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe *falciparum* malaria. *JAMA*. 2007 May 23;297(20):2220-6.

McLoughlin DM, Miller CC. The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett*. 1996 Nov 18;397(2-3):197-200.

Milet J, Nuel G, Watier L, Courtin D, Slaoui Y, Senghor P, et al. Genome wide linkage study, using a 250K SNP map, of *Plasmodium falciparum* infection and mild malaria attack in a Senegalese population. *PLoS One*. 2010 Jul 15;5(7):e11616.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976 Aug 5;295(6):302-4.

Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*. 1975 Aug 15;189(4202):561-3.

Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, et al. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *J Commun Dis*. 2006 Mar;38(3):230-45

Need AC, Goldstein DB. Next generation disparities in human genomics: concerns and remedies. *Trends Genet*. 2009 Nov;25(11):489-94.

Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci*. 2010 Dec;340(6):492-8.

Nkoghe D, Akue JP, Gonzalez JP, Leroy EM. Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic rural Gabonese populations. *Malar J*. 2011 Feb 9;10(1):33.

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [database]. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>>. Cited from: 2012 dez. 12.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13766-71.

Pan American Health Organization (PAHO/WHO), Interactive Maps- Brazil. 2011. Available from: <www.paho.org/malaria/>. [2011 dez. 17].

Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al.. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 6;104(6):1919-24.

Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol*. 2000 Apr;37(2):122-9.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet*. 2007 Sep;81(3):559-75.

Punnonen J, Cocks BG, Carballido JM, Bennett B, Peterson D, Aversa G, et al. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med*. 1997 Mar 17;185(6):993-1004.

Ramirez DM, Khvotchev M, Trauterman B, Kavalali ET. Vti1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission. *Neuron*. 2012 Jan 12;73(1):121-34.

Randall LM, Kenangalem E, Lampah DA, Tjitra E, Mwaikambo ED, Handojo T, et al. A study of the TNF/LTA/LTB locus and susceptibility to severe malaria in highland papuan children and adults. *Malar J*. 2010 Oct 29;9:302.

Rey L. *Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos acidentais*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 5;102(27):9577-82.

Sakuntabhai A, Ndiaye R, Casadémont I, Peerapittayamongkol C, Rogier C, Tortevoeye P, et al. Genetic determination and linkage mapping of *Plasmodium falciparum* malaria related traits in Senegal. *PLoS One*. 2008 Apr 23;3(4):e2000.

Scotto G. Malaria: an update. *Infez Med*. 2010 Dec 1;18(4):213-34.

Segal S, Hill AV. Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol*. 2003 Sep;11(9):445-8. Review.

Sijwali PS, Rosenthal PJ. Functional evaluation of *Plasmodium* export signals in *Plasmodium berghei* suggests multiple modes of protein export. *PLoS One*. 2010 Apr 19;5(4):e10227.

Sikora M, Ferrer-Admetlla A, Laayouni H, Menendez C, Mayor A, Bardaji A, et al. A variant in the gene FUT9 is associated with susceptibility to placental malaria infection. *Hum Mol Genet*. 2009 Aug 15;18(16):3136-44.

Sikora M, Laayouni H, Menendez C, Mayor A, Bardaji A, Sigauque B, et al. A targeted association study of immunity genes and networks suggests novel associations with placental malaria infection. *PLoS One*. 2011;6(9):e24996.

Sellami MH, Kaabi H, Midouni B, Dridi A, Mojaat N, Boukef MK, Hmida S. Duffy blood group system genotyping in an urban Tunisian population. *Ann Hum Biol*. 2008 Jul-Aug;35(4):406-15.

Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al. Indian Genome Variation Consortium, Venkatesh V, Habib S. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of *falciparum* malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J*. 2008 Jan 14;7:13.

Tapping RI, Omueti KO, Johnson CM. Genetic polymorphisms within the human Toll-like receptor 2 subfamily. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1445-8.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*. 2000;406:893-7.

Timmann C, Evans JA, König IR, Kleensang A, Rüschendorf F, Lenzen J, et al. Genome-wide linkage analysis of malaria infection intensity and mild disease. *PLoS Genet*. 2007 Mar 23;3(3):e48.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*. 2008 Jun 17;5(6):e128.

Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Kim CLV. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene in Duffy-negative individuals. *Nat Genet*. 1995 Jun;10(2):224-8.

Uciechowski P, Imhoff H, Lange C, Meyer CG, Browne EN, Kirsten DK, et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J Leukoc Biol*. 2011 Aug;90(2):377-88.

Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Sep;84(9):712-25.

World Health Organization (WHO). Global Malaria Programme. World malaria report: 2010. Available from: <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html>. [2011 dez. 17].

Zakeri S, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND. Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients. *Malar J*. 2011 Apr 4;10:77.

Zeggini E, Morris A, editors. Analysis of complex disease association studies: a practical guide. Londres: Elsevier; 2011. 331 p.

Ziegler A, König IR, Thompson JR. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J*. 2008 Feb;50(1):8-28.

Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, et al. Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13973-7.

ANEXOS

Anexo A - Tabela A1 Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica (vide item 5.3.2).

	Marcador	Chr	Valor de p	OR		Marcador	Chr	Valor de p	OR		Marcador	Chr	Valor de p	OR
1.	rs4519763	4	$2,834 \times 10^{-5}$	6.062	19.	rs17251018	2	$3,488 \times 10^{-4}$	0.2737	37.	rs12668127	7	$7,627 \times 10^{-4}$	3.606
2.	rs16995415	20	$3,981 \times 10^{-5}$	12.96	20.	rs6470746	8	$3,561 \times 10^{-4}$	0.1281	38.	rs12772424	10	$7,691 \times 10^{-4}$	3.122
3.	rs610118	3	$4,284 \times 10^{-5}$	7.944	21.	rs4280691	4	$3,752 \times 10^{-4}$	0.2909	39.	rs3796504	1	$7,861 \times 10^{-4}$	0.0
4.	rs1741240	14	$6,17 \times 10^{-5}$	3.952	22.	rs2633951	6	$3,903 \times 10^{-4}$	0.2681	40.	rs6083320	20	$8,054 \times 10^{-4}$	0.3185
5.	rs221188	7	$6,69 \times 10^{-5}$	0.1074	23.	rs633687	11	$4,153 \times 10^{-4}$	4.236	41.	rs10885814	10	$8,097 \times 10^{-4}$	3.107
6.	rs7551462	1	$7,843 \times 10^{-5}$	0.1297	24.	rs11118121	1	$4,382 \times 10^{-4}$	5.077	42.	rs4619385	16	$8,54 \times 10^{-4}$	6.9
7.	rs12695132	3	$9,486 \times 10^{-5}$	0.2121	25.	rs874199	13	$4,51 \times 10^{-4}$	3.333	43.	rs697614	5	$8,557 \times 10^{-4}$	3.658
8.	rs8049088	16	$1,077 \times 10^{-4}$	0.0	26.	rs6885946	5	$5,422 \times 10^{-4}$	4.308	44.	rs8098517	18	$8,557 \times 10^{-4}$	3.658
9.	rs17527389	4	$1,419 \times 10^{-4}$	0.0	27.	rs12526074	6	$5,566 \times 10^{-4}$	0.135	45.	rs2491398	9	$8,729 \times 10^{-4}$	3.954
10.	rs648519	11	$1,638 \times 10^{-4}$	0.2107	28.	rs17518475	2	$5,672 \times 10^{-4}$	0.2286	46.	rs10782039	18	$8,729 \times 10^{-4}$	3.954
11.	rs1423988	16	$1,708 \times 10^{-4}$	4.844	29.	rs1978414	2	$5,847 \times 10^{-4}$	9.475	47.	rs4856831	3	$9,068 \times 10^{-4}$	15.0
12.	rs11782622	8	$1,95 \times 10^{-4}$	0.2233	30.	rs2735409	16	$5,902 \times 10^{-4}$	0.1367	48.	rs9872358	3	$9,076 \times 10^{-4}$	0.3051
13.	rs7918405	10	$2,31 \times 10^{-4}$	0.2742	31.	rs249084	2	$6,097 \times 10^{-4}$	7.192	49.	rs1877465	1	$9,159 \times 10^{-4}$	0.2695
14.	rs17660753	4	$2,596 \times 10^{-4}$	0.05524	32.	rs6426015	1	$6,346 \times 10^{-4}$	0.1839	50.	rs263890	5	$9,223 \times 10^{-4}$	3.086
15.	rs9329290	10	$2,714 \times 10^{-4}$	3.453	33.	rs7068695	10	$6,813 \times 10^{-4}$	0.3075	51.	rs37060	16	$9,329 \times 10^{-4}$	0.2917
16.	rs2612180	4	$3,18 \times 10^{-4}$	0.1865	34.	rs6676981	1	$7,033 \times 10^{-4}$	5.246	52.	rs4924066	15	$9,708 \times 10^{-4}$	3.056
17.	rs7627904	3	$3,414 \times 10^{-4}$	0.2545	35.	rs17837793	7	$7,313 \times 10^{-4}$	15.53					
18.	rs16962583	15	$3,485 \times 10^{-4}$	-	36.	rs12411137	1	$7,613 \times 10^{-4}$	5.895					

FONTE: Pescarini, 2012.

Anexo B – Tabela B1 Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica (vide item 5.3.3). (continua)

Marcador	Chr	Valor de p	OR	Marcador	Chr	Valor de p	OR
1. rs221188	7	5.181×10^{-6}	0.06117	21. rs6083320	20	4.228×10^{-4}	0.284
2. rs1741240	14	5.799×10^{-5}	4.235	22. rs12526074	6	4.433×10^{-4}	0.1288
3. rs610118	3	6.377×10^{-5}	9.277	23. rs4355227	3	4.843×10^{-4}	0.05936
4. rs16826240	3	9.88×10^{-5}	0.0	24. rs17660753	4	4.843×10^{-4}	0.05936
5. rs7627904	3	1.043×10^{-4}	0.2076	25. rs697614	5	4.881×10^{-4}	4.21
6. rs874199	13	1.156×10^{-4}	4.016	26. rs11977734	7	5.041×10^{-4}	0.0
7. rs17518475	2	1.529×10^{-4}	0.1961	27. rs633687	11	5.094×10^{-4}	4.402
8. rs7068695	10	1.721×10^{-4}	0.2556	28. rs10493905	1	5.165×10^{-4}	9.667
9. rs17251018	2	1.959×10^{-4}	0.2459	29. rs1424651	2	5.255×10^{-4}	0.2825
10. rs8098517	18	2.009×10^{-4}	5.089	30. rs6896924	5	5.602×10^{-4}	0.102
11. rs12695132	3	2.144×10^{-4}	0.221	31. rs2491398	9	5.998×10^{-4}	4.583
12. rs6885946	5	2.287×10^{-4}	5.413	32. rs1423988	16	5.998×10^{-4}	4.583
13. rs648519	11	2.327×10^{-4}	0.2127	33. rs8062258	16	6.093×10^{-4}	0.18
14. rs7918405	10	2.386×10^{-4}	0.2613	34. rs9329290	10	6.201×10^{-4}	3.347
15. rs4932554	15	2.476×10^{-4}	3.718	35. rs16962583	15	6.222×10^{-4}	NaN
16. rs17527389	4	2.936×10^{-4}	0.0	36. rs12668127	7	6.257×10^{-4}	4.121
17. rs4724067	7	3.044×10^{-4}	3.6	37. rs4280691	4	6.597×10^{-4}	0.2922
18. rs6468620	8	3.339×10^{-4}	3.82	38. rs7615670	3	6.692×10^{-4}	0.2561
19. rs3796504	1	4.034×10^{-4}	0.0	39. rs11782622	8	6.724×10^{-4}	0.2437
20. rs4558646	20	4.083×10^{-4}	0.2838	40. rs10020201	4	6.882×10^{-4}	15.73

Anexo B – Tabela B1 Análise de associação obtida a partir dos dados de varredura genômica (vide item 5.3.3). (conclusão)

	Marcador	Chr	Valor de p	OR		Marcador	Chr	Valor de p	OR
41.	rs263881	5	7.096×10^{-4}	3.333	54.	rs1954511	9	8.571×10^{-4}	3.382
42.	rs12772424	10	7.211×10^{-4}	3.307	55.	rs1886644	1	8.711×10^{-4}	0.268
43.	rs803919	9	7.446×10^{-4}	5.262	56.	rs6426015	1	8.789×10^{-4}	0.1864
44.	rs29881	7	7.531×10^{-4}	0.106	57.	rs1241939	11	8.856×10^{-4}	0.1667
45.	rs12076644	1	7.533×10^{-4}	3.576	58.	rs6888688	5	9.227×10^{-4}	0.3057
46.	rs2140146	4	7.734×10^{-4}	3.448	59.	rs12429402	13	9.228×10^{-4}	15.0
47.	rs290481	10	7.749×10^{-4}	5.907	60.	rs12190505	6	9.382×10^{-4}	0.3013
48.	rs2633951	6	7.971×10^{-4}	0.276	61.	rs7253446	19	9.384×10^{-4}	8.947
49.	rs10926019	1	8.081×10^{-4}	5.855	62.	rs7199856	16	9.542×10^{-4}	0.2891
50.	rs4637130	2	8.164×10^{-4}	3.285	63.	rs7551462	1	9.788×10^{-4}	0.1667
51.	rs802324	16	8.199×10^{-4}	0.2525	64.	rs785639	1	9.971×10^{-4}	3.527
52.	rs4538203	2	8.423×10^{-4}	3.253	65.	rs619964	11	9.998×10^{-4}	0.2893
53.	rs17489092	1	8.544×10^{-4}	4.417					

FONTE: Pescarini, 2012.