Wilson Domingues

Polimorfismos genéticos de citocinas em indivíduos de área endêmica da Amazônia Legal brasileira com as formas sintomática e assintomática de malária.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo

2013

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Domingues, Wilson

Polimorfismos genéticos de citocinas em indivíduos de área endêmica da Amazônia Legal brasileira com as formas sintomática e assintomática de malária / Wilson Domingues. – São Paulo, 2013.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Thelma Suely Okay

Descritores: 1. MALÁRIA. 2. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE. 3. CITOCINAS. 4. PARASITEMIA. 5. POLIMORFISMO GENÉTICO. 6. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

USP/IMTSP/BIB-09/2013.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias devemos, ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lamma

Dedicatória

Á Deus e aos meus orisás,

por me guiar pelo caminho certo, não deixando
com que me perdesse nesta caminhada.

A **minha amada mãe** Elizabeth Godoy Domingues pelo seu amor infinito e por me ensinar que na vida tudo vale a pena, quando se tem amor, respeito e determinação. Apesar de todas as dificuldades encontradas na caminhada da vida. Dedico este grande esforço e realização de um sonho.

Ao **meu amado** Pedro Domingos Leite Junior pela grande dedicação de anos de convivência e carinho, sempre me incentivando e me dando forças para nunca desistir de meus sonhos, apesar de todas as dificuldades encontradas. Dedico à realização deste sonho.

“É surpreendente como mudamos nossas vidas, por forças das descobertas e das realizações. Foi como se tivéssemos sido tocados por uma mão divina que, nos concedendo um dom diferenciado, a inteligência, ampliou nossas possibilidades e habilidades, tornando-nos capazes de grandes realizações manipulando conhecimento e realizando o que não imaginávamos.”

Ozires Silva

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão Valdir Domingues por estar sempre presente em minha vida, apesar das adversidades ao longo do caminhar da vida.

Ao meu querido Mauricio Cotugno que apesar de não ser meu pai biológico, não deixa de ser meu pai. Pelo carinho e dedicação, e por estar sempre torcendo pela minha vitória.

À minha orientadora Professora Dra. Thelma Suely Okay pela dedicação e paciência na elaboração deste trabalho, acreditando em minha capacidade.

À minha querida Dra. Sandra do Lago Moraes por ter aberto as portas do IMT-SP, pela doação de todo material necessário para que fosse possível a realização deste sonho, e por acreditar em meu esforço e dedicação.

À minha grande e querida amiga Dra. Fabiana Maria de Souza Leoratti pelos ensinamentos ao longo desta caminhada, mesmo que a distância, nunca me desamparando.

À Dra. Dra Amanda Farage Frade e Léa Campos de Oliveira por transmitirem seus conhecimentos com o teste de equilíbrio de Hardy Weinberg.

Aos meus amigos de laboratório Jonatas Cristian Rodrigues, Júlio Rente Ferreira Filho, Dra. Kelly Aparecida Kanunfre, Leandro Emídio Teixeira, Lidia Yamamoto, Lília Spaleta Targa e Paulo Tadashi Shimokawa por me auxiliarem e estarem sempre ao meu lado no desenvolvimento deste maravilhoso sonho de vida.

Aos membros da banca do exame de qualificação Professor Doutor Gustavo Arantes Rosa Maciel e Dra Karin Kirchgater pelas sugestões construtivas.

A todos do laboratório de Soroepidemiologia-Imunobiologia pela boa convivência e pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos e irmãos Daniel Vitro, e Janaina Gonçalves, pelo incentivo e pelas palavras de carinho nas horas difíceis.

Às minhas amigas, Angélica Martins dos Santos Sorato, e Neila Duarte por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada, ajudando com que este sonho fosse realizado.

À Eliane, secretária da CPG e à Sônia da biblioteca, por toda paciência, prestatividade e colaboração para a realização desse trabalho.

A todos que de certa forma me incentivaram e acreditaram na realização deste grande sonho.

Muito obrigado.

RESUMO

Domingues W. Polimorfismos genéticos de citocinas em indivíduos de área endêmica da Amazônia Legal brasileira com as formas sintomática e assintomática de malária (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

Dentre todas as doenças infecciosas, a malária é a que exerce maior impacto sobre a mortalidade, sobretudo a infantil, em áreas endêmicas. O fato de apenas uma pequena porcentagem de indivíduos que vivem em áreas endêmicas desenvolverem complicações sugere que fatores genéticos do hospedeiro possam exercer papel fundamental. A identificação de polimorfismos genéticos de nucleotídeo único (SNP), associados à suscetibilidade ou proteção contra as formas sintomáticas de malária poderia auxiliar na elaboração de estratégias vacinais. O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de polimorfismos de citocinas pró e anti-inflamatórias em indivíduos moradores de uma área endêmica da Amazônia Legal brasileira. Foram investigados cinco SNP em cinco citocinas: IL-6 (-174) e IL-12p40 (+1188), IL-4 (+33), IL-10 (-3575), TGF β 1 (+869) por meio de PCR-RFLP. Foram realizadas comparações entre as frequências genotípicas e alélicas desses SNP em dois grupos de indivíduos, com malária sintomática e assintomática e verificada a existência de associação entre os SNP de citocinas e os níveis de parasitemia. Foram recrutados 104 indivíduos com malária sintomática, porém não complicada, e 37 indivíduos assintomáticos que permaneceram desta forma por um período mínimo de 60 dias. As amostras de sangue foram colhidas em 1995 e 1996, época em que a transmissão de malária na região era perene. O

diagnóstico laboratorial de malária foi realizado pelo teste da gota espessa e/ou semi-nested PCR. O teste do χ^2 foi aplicado para a comparação entre os grupos. A frequência do genótipo TT (selvagem) na posição -3575 foi maior no grupo AS em relação ao grupo MS [$\chi^2=3,716$; $p=0,0269$; OR=0,4249, $pc=0,0424$]. Também houve diferenças quando comparamos o genótipo TT em relação aos genótipos AA e AT agrupados [$\chi^2=3,747$; $p=0,0264$; OR=0,4053; $pc=0,0264$]. Na análise por alelo, a frequência do alelo T também foi maior no grupo AS em relação ao MS [$\chi^2=4,506$; $p=0,0169$; OR=0,4570; $pc=0,0250$]. Na análise da parasitemia os indivíduos foram divididos em dois grupos: parasitemia não detectável (ND), $n=80$, ou detectável, $n=61$. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes apenas em relação ao polimorfismo IL-12p40 +1188 com 36 indivíduos no grupo ND (45%) e 18 no grupo com parasitemias detectáveis (29,50%) [$\chi^2=4,725$; $p=0,0149$; OR=2,235; $pc=0,0232$]. Ademais, quando os sujeitos de pesquisa com genótipo AA (selvagem) foram comparados aos indivíduos com genótipo AC e CC nos dois grupos, mais uma vez foram encontradas diferenças estatisticamente significantes [$\chi^2=3,515$; $p=0,0304$; OR=1,955; $pc=0,0446$]. Em relação aos cinco SNP investigados, todas as distribuições genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Concluindo, as cinco PCR-RFLP para a detecção de polimorfismos da IL6 (-174), IL12p40 (+1188), IL4 (+33), IL10 (-3575) e TGF β 1 (+869) foram padronizadas com sucesso. Apenas para o polimorfismo da IL10 -3575 T $\rightarrow$ A foram encontradas frequências mais elevadas do alelo selvagem T e dos genótipos TT e TA nos indivíduos assintomáticos em relação aos sintomáticos, sugerindo um possível papel protetor do alelo selvagem. Em relação ao polimorfismo da IL-12p40 +1188, foi observada frequência mais elevada do genótipo selvagem AA entre indivíduos com parasitemia indetectável pela gota espessa.

Descritores: Malária. Reação em Cadeia por Polimerase. Citocinas. Parasitemia. Polimorfismo genético. Enzimas de restrição.

ABSTRACT

Wilson D. Cytokine gene polymorphisms in subjects from an endemic area of the Brazilian Amazon with symptomatic and asymptomatic forms of malaria. (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

Among all infectious diseases, malaria is the one that exerts greater impact on mortality, especially among children in endemic areas. The fact that only a small percentage of individuals living in endemic areas develop complications suggests that host genetic factors may play a fundamental role. The identification of genetic polymorphisms associated with increased susceptibility or protection against symptomatic forms of malaria could help to develop vaccine strategies. This study aimed to determine the frequency of genetic polymorphisms of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in subjects living in an endemic area of the Brazilian Legal Amazon. Five polymorphisms of IL-6 (-174), IL-12p40 (+1188), IL-4 (+33), IL-10 (-3575) and TGF- β 1 (+869) were investigated by PCR-RFLP. Genotypic and allelic frequencies of these polymorphisms were compared in two groups of individuals, with symptomatic and asymptomatic malaria. We also verified the existence of any association between cytokine polymorphisms and parasitemia levels. We recruited 104 subjects with uncomplicated symptomatic malaria (MS), and 37 asymptomatic ones (AS) who remained this way for a minimum of 60 days. Blood samples were collected in 1995 and 1996, a time when malaria transmission was perennial in this region. Laboratory diagnosis of malaria was assessed by the

thick blood smear and/or by a semi-nested PCR. The χ^2 test was applied for comparison between groups. The frequency of the wild type genotype TT at the IL-10 -3575 SNP was higher in the AS group compared to MS [$\chi^2= 3.716$, $p = 0.0269$, OR = 0.4249, $pc = 0.0424$]. This difference was also significant when the TT genotype was compared to the AA and AT genotypes grouped [$\chi^2= 3.747$, $p = 0.0264$, OR = 0.4053, $pc = 0.0264$]. Analyzing by allele, the frequency of the T allele was also higher in the AS group compared to MS [$\chi^2= 4.506$, $p = 0.0169$, OR = 0.4570, $pc = 0.0250$]. Studied subjects were redistributed in two groups according to the parasitemia determined by the thick blood smear: non detectable (ND), $n = 80$, or detectable, $n = 61$. Concerning the IL-12p40 +1188 polymorphism, we found 36 individuals with genotype AA in the ND group (45%) and 18 in the detectable one (29.50%) [$\chi^2=4,725$, $p=0.0149$, OR=2.235, $pc=0.0232$]. Furthermore, when the analysis compared the genotype AA with AC and CC together in both parasitemia groups, once again statistically significant differences were found [$\chi^2=3,515$, $p=0.0304$; OR=1.955, $pc =0.0446$]. Regarding the five polymorphisms, all genotype distributions were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. In conclusion, the five PCR-RFLP for the detection of IL-6 (-174), IL-12p40 (+1188), IL-4 (+33), IL-10 (-3575) and TGF- β 1 (+869) were successfully standardized. Only for IL-10 -3575 T $\rightarrow$ A higher frequencies of the wild type T allele and also of the genotypes TT and TA were found in asymptomatic individuals with respect to the symptomatic ones, suggesting a possible protective role of the wild-type allele. Regarding the IL-12p40 +1188, a higher frequency of the wild type genotype AA was found among individuals with undetectable parasitemia by the thick blood smear.

Descriptors: Malaria. Polymerase Chain Reaction. Cytokines. Parasitemia. Genetic polymorphism. Restriction enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição Global da Malária	20
Figura 2	Risco de Transmissão no Brasil	22
Figura 3	Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i> infectantes ao homem	24
Figura 4	Esquema da resposta imune inata na malária.	33
Figura 5	Exemplo da digestão enzimática em gel de agarose.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Polimorfismos genéticos de citocinas em indivíduos de área endêmica da Amazônia Legal brasileira, sequência de primers e referências bibliográficas.	55
Tabela 2	Condições de amplificação e de restrição enzimática (RFLP) para cada polimorfismo estudado.	58
Tabela 3	Características dos indivíduos dos dois grupos (sintomáticos e assintomáticos) de acordo com a idade, gênero e espécies de <i>Plasmodium</i> encontradas na gota espessa e/ou semi-nested PCR.	61
Tabela 4	Características dos indivíduos dos dois grupos (sintomáticos e assintomáticos) distribuídos de acordo com a faixa etária, gênero e parasitemias encontradas na gota espessa (ND, baixa, moderada, intensa).	62
Tabela 5	Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de IL-6 -174; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-10 -3575; TGFβ1+869 dos indivíduos com malária sintomática (MS) e assintomática (AS).	64
Tabela 6	Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos IL-6 -174; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-10 -3575; TGFβ1 +869 nos sujeitos de pesquisa de acordo com o grau de parasitemia observado na gota espessa: não detectável (ND) versus baixa (<1.000 parasitas/mm ³ de sangue), moderada (1.000 a 10.000 parasitas/mm ³ de sangue) e intensa (>10.000 parasitas/mm ³ de sangue). O grupo ND foi diagnosticado por PCR.	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B _{reg}	Células B regulatórias
°C	Graus Celsius
CSA	Condroitina sulfato A
CpG	Sequências de DNA contendo o dinucleotídeo citosina-guanina
DNA	do inglês “desoxyribonucleic acid”
dNTP	Mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
EDTA	do inglês “Ethylene diamine tetracetic acid”
EPO	Produção deficiente de eritropoietina
et al.	e outros
HO-1	Heme oxigenase 1
IPA	Incidência parasitária anual
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12

<i>Knobs</i>	Protuberâncias
LPS	Lipopolissacarídeos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MA	Malária Assintomática
MS	Malária Sintomática
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Não detectável
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
ng	Nanogramas
OMS	Organizaçãoa Mundial da Saúde
PfEMP1	Plasmodium <i>falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
pb	Pares de base
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”
pM	Picomol
RFLP	do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RTS/S/AS01	Candidato à vacina contra malária
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TLR	Toll Like Receptor
T $\gamma\delta$	T gama-delta
T _{reg}	Células T regulatórias
TGF- β	Fator de Transformador Crescimento - β
U	Unidades
UV	Ultravioleta
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Histórico da malária	19
1.2 Aspectos gerais da malária humana	19
1.3 Agente etiológico	21
1.4 Ciclo biológico da malária	23
1.5 Principais diferenças entre <i>P.vivax</i> e <i>P. falciparum</i> e associação com a gravidade da infecção.....	24
1.6 Suscetibilidade à malária	29
1.7 Imunidade na malária	30
1.7.1 Imunidade inata	32
1.7.2 Imunidade adaptativa.....	33
1.8 Vacinas contra a malária: testes pré-clínicos	34
1.9 Polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism - SNP)	35
1.9.1 Polimorfismos de citocinas que participam da resposta imune à malária	37
1.9.2 Citocinas pró-inflamatórias.....	37
1.9.3 Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6)	37
1.9.4 TNF - α (Fator de Necrose Tumoral alfa)	37
1.9.5 Interleucina 12 (IL-12)	40
1.9.6 Citocinas anti-inflamatórias	40
1.9.7 Interleucina 4 (IL-4)	41
1.9.8 Interleucina 10 (IL-10)	41
1.9.9 Fator Transformador de Crescimento (TGF β 1)	44
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVOS	49

3.1 Objetivo geral.....	49
3.2 Objetivos específicos	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Área de estudo	51
4.2 Casuística	51
4.3 Critérios de inclusão	52
4.3.1 Grupo de indivíduos com malária sintomática	52
4.3.2 Grupo de indivíduos com malária assintomática	53
4.4 Aspectos éticos da pesquisa.....	53
4.5 Extração de DNA genômico com fenol/clorofórmio	54
4.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	54
4.7 Etapas desenvolvidas no estudo.....	56
4.8 Detecção de amplificadores – eletroforese em gel de agarose	57
4.9 Análise estatística	59
5. RESULTADOS	61
5.1 Dados da casuística	61
5.2 Polimorfismos de citocinas envolvidas na resposta imune à malária	63
5.2.1 Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos de citocinas.....	63
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A.....	105
ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 - HISTÓRICO DA MALÁRIA

A infecção malárica acompanha os seres humanos à aproximadamente 50 mil anos e surgiu em primatas, ancestrais do homem na África, na região onde se encontra atualmente a Etiópia. Do Nilo, a malária se espalhou para a região do mediterrâneo e, em seguida, para a Ásia e norte da Europa. No início do século XIX a malária já se encontrava distribuída por todos os continentes (Neghina et al., 2010).

O padrão de febre, associado à esplenomegalia e a tendência epidêmica da infecção malárica foram descritos 2.700 anos antes de Cristo por chineses, e mais tarde, pelas civilizações suméria, assíria, babilônica, egípcia, indiana, grega, romana e árabe. Hipócrates (460-377 a. C.) foi o primeiro a descrever os sinais e sintomas da malária incluindo calafrios, febre e sudorese, e as diferentes formas clínicas da doença de acordo com a periodicidade da febre (Neghina et al., 2010).

A etimologia da palavra “malária” vem do termo italiano medieval “mal’aria” que significa “ar ruim”. Essa expressão foi utilizada fora da Itália para descrever uma doença caracterizada pela ocorrência de febre nos meses de verão, e que era muitas vezes fatal. Horace Walpole descreveu o termo italiano que significava “um mal chamado mal’aria, horrível para quem vem a Roma todos os verões matando um”. Somente no século XX a palavra malária, sem apóstrofo, tornou-se conhecida como o nome dado à doença (Scotto, 2010).

1.2 - ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA HUMANA

A malária é uma das doenças infecciosas mais importantes das regiões tropicais e subtropicais, constituindo problema grave de saúde pública no mundo. Aproximadamente 40% da população mundial vivem em áreas de transmissão estando expostas ao risco de contrair a infecção. A incidência da malária é de 300 a 500 milhões de novos casos por ano, com mais de um milhão de mortes, das quais 90% acometem crianças com menos de cinco anos de idade na África sub-saariana (WHO, 2009).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA MALÁRIA

FONTE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010.

No Brasil, a infecção é endêmica na Amazônia Legal, onde se concentram 99% dos casos de malária no Brasil. Em 2011, foram relatados 267.049 casos, sendo que em 2010, foram registrados 334.709 casos, representando menos 67.660 pessoas infectadas em 2011, uma redução de aproximadamente 20% decorrente do trabalho conjunto entre o Ministério da Saúde e gestores locais. Em 2011, as

internações também diminuíram em comparação a 2010, com redução de aproximadamente 10%. O número de internações passou de 5.474 em 2010 a 4.920 em 2011. Esta diminuição do número de casos foi verificada na maior parte dos Estados da Amazônia Legal (Ministério da Saúde 2013).

1.3 - AGENTE ETIOLÓGICO

Mais de 100 espécies de *Plasmodium* infectam numerosas espécies de animais, tais como répteis, aves, mamíferos, e quatro espécies de *Plasmodium* podem infectar o homem em condições naturais: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* (revisto por Tujera, 2007). Estudos recentes relataram a existência de uma quinta espécie de *Plasmodium* que pode infectar o homem, *P. knowlesi*, espécie conhecida por infectar macacos *Rhesus* no continente africano (Tang et al, 2010).

Dos casos clínicos de malária anualmente notificados na região Amazônica, *P. vivax* é a espécie de maior prevalência responsável por 83,7% dos casos registrados em 2009, *P. falciparum* responsável por 16,3% dos casos, sendo o *Plasmodium malariae* raramente observado (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Guerra e colaboradores (2010) mostraram que em 2009 aproximadamente 2,85 milhões de pessoas no mundo moravam em áreas de risco de transmissão de *P. vivax*.

FIGURA 2 - RISCO DE TRANSMISSÃO DA MALÁRIA NO BRASIL.

Situação epidemiológica da malária na Amazônia, 2010. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde SVS/MS.

Apesar da infecção causada por *P. vivax* ser a mais prevalente nas Américas e na Ásia, é ainda pouco estudada possivelmente pelo fato da espécie *vivax* ser considerada menos patogênica que a *falciparum*, e também pela dificuldade de seu cultivo contínuo. No entanto, em pesquisa recente realizada em Papua Nova Guiné, os autores questionaram o paradigma que a infecção por *P. vivax* é sempre benigna (Tjitra et al, 2008). Neste estudo, foram analisadas crianças com menos de cinco anos de idade, tendo sido observados 23% de infecções graves causadas por *P. vivax*, das quais 80% apresentavam anemia grave com hemoglobina menor que 5g/dL. No mesmo ano, Genton e colaboradores mostraram que em Papua Nova Guiné 9% das crianças com menos de cinco anos diagnosticadas com infecção por

P. vivax evoluíram com quadro clínico de malária grave. No Brasil, foi relatado aumento do número de casos graves em pacientes infectados por *P. vivax* (Araujo et al., 2008). Estes estudos mostraram que entre 1998 e 2008, cerca de 230 mortes notificadas na Amazônia legal foram relacionadas à infecção por *P. vivax* (Oliveira - Ferreira et al., 2010).

1.4 - CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado se inicia pela inoculação de esporozoítos por intermédio da picada de mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Nos hepatócitos, ocorre a esquizogonia, um ciclo assexuado de reprodução em que os esporozoítos se desenvolvem e originam os esquizontes, os quais amadurecem e liberam milhares de merozoítos na corrente sanguínea (ciclo hepático). Nas infecções por *P. vivax* e por *P. ovale*, alguns esporozoítos permanecem em estágio latente no fígado por semanas a anos, quando são chamados hipnozoítos, podendo ser reativados e provocar recidivas da doença.

Os merozoítos liberados na circulação invadem as hemácias e iniciam nova esquizogonia, transformando-se em trofozoítos, que amadurecem e se dividem, gerando esquizontes. Os esquizontes amadurecidos rompem os eritrócitos e liberam merozoítos que invadem novos eritrócitos, podendo alguns deles se diferenciar em gametócitos macho e fêmea. Estes, quando ingeridos pelo mosquito *Anopheles* no repasto sanguíneo, sofrem um ciclo sexuado no intestino do mosquito, com a fusão dos gametas para formação dos oocinetos que penetram na parede intestinal gerando oocistos. Os oocistos se dividem por esporogonia, originando milhares de esporozoítos que chegam à glândula salivar do mosquito. Quando a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* carregando esporozoítos nas

glândulas salivares for se alimentar novamente, irá infectar outro hospedeiro vertebrado, iniciando um novo ciclo (Bruce-Chwatt, 1985).

Figura 3 - Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infectantes ao homem

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

1.5 - PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE INFECÇÃO POR *P. VIVAX* E *P. FALCIPARUM* E ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE DA INFECÇÃO

Em sua forma mais frequente, a malária não grave, o quadro clínico dos indivíduos infectados costuma incluir febre de início abrupto, sem sinais de localização. O aparecimento de febre é justificado pela ruptura de hemácias por esquizontes eritrocíticos. Este paroxismo acontece em consequência à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interferon gama (IFN- γ), que são

associadas aos quadros de febre alta e calafrios característicos da infecção malárica (Anstey et al., 2009).

A malária grave, responsável pelo maior número de mortes nas regiões tropicais, tem sido alvo de muitos estudos, principalmente as infecções causadas por *P. falciparum*, espécie mais patogênica. No entanto, podem ser observadas diferenças nas manifestações da doença, com apenas uma parcela de indivíduos infectados desenvolvendo complicações graves, sendo as razões para esta diversidade de manifestações pouco esclarecidas (Clark et al., 2010). Alguns estudos têm demonstrado que fatores do parasito tais como a patogenicidade da cepa, além de fatores relacionados ao hospedeiro, tais como a idade e características genéticas podem estar associadas ao aumento da susceptibilidade e/ou resistência ao desenvolvimento de complicações da infecção malárica, acompanhadas ou não de alterações hematológicas mais graves (Randall et al., 2010).

No que diz respeito ao parasito, além da patogenicidade da cepa, pode-se destacar sua capacidade de multiplicação no hospedeiro vertebrado, pois para cada esporozoíto de *P. falciparum* que invade um hepatócito, 10.000 novos merozoítos são produzidos (revisto por Anstey et al., 2009). Podemos destacar ainda os mecanismos de invasão utilizados pelos plasmódios para infectar as células sanguíneas. Nesta invasão, são observadas diferenças entre a infecção causada por *P. vivax* e por *P. falciparum* quanto ao tipo de célula do hospedeiro a ser infectada, e as interações ligante-receptor utilizadas na invasão.

O *P. vivax* parece invadir preferencialmente reticulócitos (eritrócitos jovens), podendo este fato contribuir para as cargas parasitárias mais baixas observadas na infecção por essa espécie de parasito (revisto por Anstey et al., 2009). Por outro lado, o *P. falciparum*, invade tanto eritrócitos jovens quanto eritrócitos maduros (Pasvol, et al., 1980), e é capaz de invadir estas células por cinco vias diferentes

(revisado por Haldar e Mohandas, 2009). Pode-se destacar a capacidade do parasito de causar cito-aderência, mecanismo patognomônico da infecção por plasmódios, podendo levar às manifestações mais graves da doença tais como a malária cerebral. Este mecanismo complexo de cito-aderência ocorre devido à formação de protuberâncias (*knobs*) na superfície das hemácias a partir de variantes antigênicas do parasito tais como a proteína PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Quando ocorre a interação entre a PfEMP1 e as proteínas de adesão celular presentes na superfície das células endoteliais humanas, tais como ICAM-1 e CD36, o resultado é a obstrução de capilares de importantes órgãos como cérebro, pulmões, fígado e rins, causando redução ou interrupção da oxigenação tecidual, contribuindo para o desencadeamento da malária grave (Clark et al., 2006; Van der Heyde et al., 2006). No entanto, os eventos que levam às complicações e a morte por *P. falciparum* são multifatoriais e envolvem alteração da homeostase, inflamação sistêmica e lesão neuronal (Rao et al., 2010).

Pouco se conhece a respeito dos mecanismos envolvidos na forma grave de infecção causada pelo *P. vivax* (Muller et al., 2009). É sabido que, no caso da infecção por esta espécie de parasito, a formação de *knobs* não ocorre, o que a princípio sugere sua incapacidade de aderência ao endotélio microvascular. Entretanto, Kim e colaboradores (2006), mostraram que os eritrócitos infectados por *P. vivax* são capazes de aderir *in vitro* ao receptor CSA (condroitina sulfato A), expresso em células de pulmão e placenta. Anstey e colaboradores (2007) também encontraram evidências indiretas em experimentos *in vitro* de que a adesão em órgãos tais como os pulmões, pode ocorrer nesta espécie. Em um trabalho recente, Carvalho e colaboradores (2010), mostraram que eritrócitos infectados por *P. vivax* são capazes de aderir *in vitro* às células endoteliais do hospedeiro vertebrado. No

entando, a cito-aderência e o sequestro das formas eritrocitárias maduras na microvasculatura pelo *P. vivax* ainda são pouco conhecidos.

Os poucos estudos que investigaram a patogenia da malária causada por *P. vivax* mostraram que a infecção por esta espécie de parasito induz uma resposta inflamatória mais intensa que a induzida pelo *P. falciparum* (Anstey et al., 2009; Yeo et al., 2010), associada à produção de citocinas pró-inflamatórias, de forma diretamente proporcional à gravidade da doença (Andrade et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de ácidos nucleicos ligados a proteínas, formando complexos, em estimular a resposta inata (Parroche et al., 2007; Wu et al., 2010). Dentre os receptores especializados em reconhecer o complexo composto por ácidos nucleicos-proteínas estão os receptores do tipo *Toll Like* (TLR), mais especificamente TLR9 e TLR2 (Franklin et al., 2009). Em *P. falciparum* as moléculas de glicosil fosfatidil inositol (GPI) também podem estimular os TLR e levar ao “paroxismo malárico”, estágio da doença no qual os sintomas se manifestam com maior intensidade (Boutlis et al., 2005). Entretanto, estudos desta natureza ainda não foram conduzidos com *P. vivax*.

Alguns autores têm especulado sobre os fatores que podem contribuir para a produção de uma resposta inflamatória mais exuberante na infecção por *P. vivax*. Em 2008, Carlton e colaboradores mostraram que o DNA de *P. vivax* apresenta um alto conteúdo de CpG, maior que o de *P. falciparum*. Os CpG são sequências de DNA contendo o dinucleotídeo citosina-guanina não metilado. Essas sequências são encontradas no genoma de vários protozoários, bactérias e fungos e são responsáveis pela ativação dos receptores TLR9 (Leichtle et al., 2011).

Em 2006, Hemmer e colaboradores mostraram que as concentrações de TNF- α , citocina pró-inflamatória envolvida na gravidade da malária, foram mais elevadas durante o paroxismo na infecção por *P. vivax* quando comparado à infecção por *P. falciparum*. Diante disso, uma resposta inflamatória mais exuberante durante a

infecção por *P. vivax* em comparação com *P. falciparum* pode ser desencadeada por inúmeros fatores (Karunaweera et al., 2007).

Algumas investigações têm proposto que uma desregulação na resposta imunológica do hospedeiro pode contribuir para a supressão da eritropoiese durante a infecção malárica (Hunt and Grau, 2003). Por outro lado, a produção deficiente de eritropoietina (EPO) parece não ser responsável pelo quadro de anemia grave (Chang and Stevenson, 2004). Em 2011, Lamikanra e colaboradores observaram que a supressão da eritropoiese foi provocada tanto pela presença de fatores do hospedeiro, tais como a capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como por fatores do parasito tais como a hemozoína, indicando que a supressão da eritropoiese é um fenômeno multifatorial. Além disso, estudos de malarioterapia mostraram que para cada eritrócito infectado destruído durante a infecção por *P. vivax*, 32 eritrócitos não infectados também são removidos da circulação sanguínea. Já na infecção por *P. falciparum*, essa destruição é menos acentuada (um eritrócito infectado para cada oito não infectados), de acordo com Anstey et al., (2009).

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

A infecção malárica pode se manifestar com outras apresentações clínicas, desde formas assintomáticas até infecções que evoluem para a cronicidade. Estudos em diversas localidades endêmicas de malária mostraram a presença de uma taxa de 14% de indivíduos assintomáticos em vilarejos na África subsaariana, e de até 21% em populações ribeirinhas na Amazônia Legal brasileira (Alves et al., 2002; Nkoghe et al., 2011).

1.6 - SUSCETIBILIDADE À MALÁRIA

A maior parte das picadas de mosquitos infectados não produz infecção aparente, isto é, sintomatologia clássica incluindo febre, cefaleia, entre outros. Dentre as crianças expostas às picadas, 25% permanecem assintomáticas, e outras 25% apresentam infecção sem gravidade. Só em casos raros é que crianças desenvolvem manifestações de malária grave com anemia intensa, sintomas de malária cerebral, podendo evoluir a coma e óbito (Machado et al., 2010). Greenwood e colaboradores estimaram que em áreas de elevada transmissão, dentre 400 picadas potencialmente infectantes, apenas 200 resultam em infecção aparente, e destas, apenas duas darão origem a casos de malária grave, podendo um caso evoluir a óbito (Greenwood et al., 1991).

Os fatores que determinam o desenvolvimento de infecção ou de doença são importantes e devem ser esclarecidos. Diversos aspectos parecem estar interligados: taxa de inoculação do mosquito, dose infectante de esporozoítos, imunidade adquirida de infecções anteriores, patogenicidade do parasito, polimorfismos genéticos do hospedeiro humano, estado nutricional do indivíduo infectado, condições ambientais e o acesso ao sistema de saúde para ser diagnosticado e receber tratamento (Flint et al., 1986).

Quando a base genética de algumas anomalias eritrocitárias foi inicialmente investigada, foram encontradas elevadas frequências de mutações deletérias em algumas populações. A talassemia, por exemplo, é muito frequente em determinadas regiões do Mediterrâneo, Oriente Médio, África e sudoeste da Ásia. Em 1949, Haldane propôs que um determinado alelo mutado associado à talassemia foi mantido com frequência elevada em uma dada população, não por meio de uma taxa de mutação excepcionalmente alta, e sim por constituir uma

vantagem seletiva contra a malária causada por *P. falciparum*, cuja distribuição coincide com a da talassemia em algumas regiões.

No Gâmbia, para avaliar a suscetibilidade genética à malária sintomática, foi feito um estudo longitudinal com pares de gêmeos onde se observou que existe maior probabilidade de gêmeos monozigóticos desenvolverem febre provocada pela malária em relação a gêmeos dizigóticos, sugerindo a existência de fatores genéticos do hospedeiro envolvidos no desenvolvimento da doença. Em outro estudo realizado no Sri-Lanka, estimou-se que o fator hereditariedade seria responsável por 15% de infecções sintomáticas por *P. falciparum*, e aproximadamente 10% da intensidade dos sintomas clínicos (Machado et al., 2010). A seguir, em estudo realizado no Quênia, duas coortes de crianças foram monitoradas quanto à frequência de malária clínica complicada e admissões hospitalares devido à malária. Em ambos os casos, foi estimado que 25% dos casos complicados e internações estavam associados a fatores genéticos do hospedeiro e, destes, a hemoglobina S, responsável pela anemia falciforme, constituiria o fator genético de resistência à malária mais conhecido, porém responsável por apenas 2% da variação total, sugerindo a existência de muitos outros genes protetores ainda não conhecidos (Machado et al., 2010).

1.7 - IMUNIDADE NA MALÁRIA

A dinâmica da imunidade na malária é complexa e envolve mecanismos que são espécie/estágio específicos. A aquisição e a manutenção da imunidade protetora capaz de conferir proteção contra as formas sintomáticas mais graves requerem infecções repetidas durante o período de vida do indivíduo. Na malária, a imunidade adquirida relacionada à infecção por *P. falciparum* é um processo

complexo ainda pouco compreendido, diferente da imunidade a infecções virais, que é adquirida após um único episódio infeccioso, e possui geralmente longa duração. Na malária, a aquisição de imunidade constitui um processo que depende de fatores como frequência e intensidade de transmissão da infecção, idade do indivíduo infectado, tempo de exposição prévia ao parasito, e parece haver dependência tanto da imunidade inata do hospedeiro, quanto da adquirida culminando em processos adaptativos a infecções precedentes que são característicos de cada indivíduo (Struik; Riley, 2004). No entanto, estes mecanismos que são capazes de limitar o pico de parasitemia, reduzindo a carga de eritrócitos infectados circulantes e prevenindo o desenvolvimento de doença grave, não são capazes de promover uma imunidade esterilizante contra o parasito (Stoute et al., 1997; Stevenson; Riley, 2004).

Alguns indivíduos de áreas endêmicas de malária podem se tornar assintomáticos após exposição prolongada ao parasito. Ou seja, estes indivíduos se tornam “imunes” aos sintomas da infecção apesar de continuarem a apresentar parasitemias baixas, frequentemente abaixo do limite de detecção microscópica (teste da gota espessa), mas que podem persistir por meses ou anos. Essa proteção em indivíduo assintomático parece acontecer após re-infecções, estando, todavia, condicionada a outros fatores, além de apresentar natureza temporária, desaparecendo quando o indivíduo se afasta da região endêmica por um longo período, com perda da imunidade adquirida que impedia o aparecimento de sintomas (Struik; Riley, 2004).

Estão envolvidas no processo de aquisição de imunidade contra a malária tanto a resposta imune humoral quanto a celular, tendo como principais componentes: macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), células $T\gamma\delta$ (células T gama-delta), neutrófilos, linfócitos e monócitos (Artavanis-Tsakonas et al., 2003).

1.7.1 - IMUNIDADE INATA

Alguns estudos clínicos realizados em seres humanos e trabalhos experimentais em camundongos mostraram que a resposta imune inata é essencial para limitar a fase inicial de replicação dos plasmódios, controlando o aumento da parasitemia até que o hospedeiro desenvolva uma resposta imune adaptativa capaz de suprimir a infecção causada pelo parasito. Assim, a imunidade inata diminui a probabilidade de morte do indivíduo infectado, porém aumenta a chance de transmissão do parasito a outro hospedeiro, o que sob o aspecto evolucionário é vantajoso tanto para o hospedeiro quanto para o parasito (Stevenson e Riley, 2004).

Estudos *in vitro* mostraram que eritrócitos humanos parasitados induziram células mononucleares do sangue periférico de doadores *naïve* a produzirem $\text{TNF}\alpha$, IL-12 e $\text{IFN-}\gamma$ num período de 10 horas. Estes dados foram confirmados pelos resultados de um estudo realizado em voluntários *naïve* que foram infectados por *P. falciparum* (Scragg et al., 1999). Na fase inicial da infecção, os voluntários apresentaram aumento das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{IFN-}\gamma$, IL-12p40 e IL-8, que coincidiu com o momento em que os parasitos foram detectados nos eritrócitos (Hermesen, 2003). Um modelo matemático baseado em observações de populações expostas a infecções maláricas repetidas permitiu que se concluísse que os mecanismos da imunidade inata foram desencadeados quando a densidade parasitária alcançou um limiar pré-definido (Bruce e Day, 2003). As densidades de parasitos no sangue oscilam entre níveis mais baixos nos quais as respostas imunes não são induzidas, e níveis mais altos quando se induz os mecanismos efetores inatos e ocorre o clareamento parcial das células infectadas. Desta forma, os mecanismos imunes inatos limitam o incremento da

densidade parasitária, mas gradualmente os mecanismos adaptativos são requeridos para a completa eliminação dos parasitos (Ritchie, 1988; Maitland et al., 1997).

Figura 4 - Esquema da resposta imune inata na malária

Fonte: Korbel et al., 2004.

1.7.2 - IMUNIDADE ADAPTATIVA

A malária não pode ser controlada somente com os mecanismos efetores da imunidade inata, sendo necessária a participação da resposta imune adaptativa que envolve células T e B.

Antígenos da fase hepática são processados e apresentados a linfócitos CD8 utilizando moléculas de classe I do MHC (complexo principal de histocompatibilidade). Essa apresentação leva a ativação dessas células T CD8⁺ citotóxicas e morte da célula infectada pela liberação de granzima e perforina e/ou pela ativação de células T CD4⁺ que auxiliam a resposta imune por meio da

secreção de citocinas tais como IFN- γ , inibindo o crescimento do parasito (Kwiatkowski, 1995).

Em relação ao estágio eritrocítico, as células T CD4⁺ exercem funções regulatórias e efectoras. A malária induz tanto a estimulação de linfócitos com perfil Th1 quanto Th2, com distinta produção de citocinas. As células Th1 contribuem para o clareamento da parasitemia, enquanto as células Th2 induzem a diferenciação de células B, culminando com a produção de anticorpos específicos, além de inibirem o desenvolvimento e proliferação de células Th1. O equilíbrio das citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 é de suma importância na caracterização da infecção, determinando se o quadro será assintomático ou sintomático, e ainda a gravidade da malária (Perlmann e Björkman, 2000; Wipasa et al., 2002).

As células T regulatórias (T_{reg}) (Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺) suprimem a resposta imune por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10, TGF- β ou pela interação célula-célula. A secreção de TGF- β induz apoptose *in vitro* (Wassmer et al., 2006), e IL-10 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias (Torre et al, 2002). Essas duas citocinas podem manter o equilíbrio entre o controle e a progressão da infecção.

1.8 - VACINAS CONTRA A MALÁRIA: TESTES PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS

Os esforços para o desenvolvimento de vacinas contra a malária tiveram início em 1980 e têm sido quase que exclusivamente focados em *P. falciparum* (WHO, 2008).

Em meio a tantos estudos em andamento, a RTS/S/AS01 é uma possibilidade real que se encontra em estudos clínicos de fase III (Agnandji et al., 2011). Esta vacina é fruto de uma parceria público-privada, contando com o apoio da Fundação Bill & Melinda Gates. Os primeiros testes realizados com a RTS, S/AS01, de março de 2009 a janeiro de 2011, analisaram 15.460 crianças divididas em dois grupos de acordo com a idade: até 4 meses e de 5 a 17 meses. Os recém-nascidos foram excluídos do estudo por possuírem anticorpos maternos. Na primeira etapa, parte das crianças de ambos os grupos recebeu a vacina RTS, S/AS01. A primeira avaliação sobre a eficácia contra a malária aconteceu nos primeiros 12 meses após a vacinação de 6.000 crianças de 5 a 17 meses de idade, que receberam as três doses de acordo com o protocolo. Os primeiros resultados revelaram que as três doses protegeram aproximadamente 47% das crianças da malária grave. Este índice de proteção foi considerado insuficiente para a liberação da vacina, que requer índices de pelo menos 90%. Mas neste caso específico, mesmo que esta proteção seja relativa, já seria suficiente para salvar milhões de vidas ao longo de uma década, tendo em vista que 250 crianças haviam apresentado malária grave antes do início dos testes com a vacina (Agnandji et al., 2011).

1.9 - POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM - SNP)

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são alterações que ocorrem em determinados locais do genoma onde a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população (ao menos 1%) difere em uma única base em relação a maior parte da população (De Nardin, 2009). A base de dados de SNP do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) conta com mais de 11 milhões de SNP

identificados em humanos, porém a maior parte dos polimorfismos causa pequeno impacto na saúde. Vários estudos têm demonstrado que variantes alélicas contendo determinados SNP podem influenciar a suscetibilidade a doenças (Chorley et al., 2008). Dessa forma, nos últimos anos, pesquisas envolvendo SNP funcionais encontraram associação entre a ocorrência de SNP e a suscetibilidade a diversas doenças, incluindo algumas infecções, doenças auto-imunes e inflamatórias (Dutra et al., 2009; Kubistova et al., 2009; Gregersen; Olsson, 2009).

A sobreposição de áreas geográficas com alta prevalência de malária e de polimorfismos genéticos relacionados à proteção ou suscetibilidade à malária resultou de evolução seletiva (Flint et al., 1986). Polimorfismos de genes que controlam a expressão de constituintes das hemácias também parecem alterar a penetração de merozoítos, ou mesmo o crescimento dos parasitos no interior dessas células (Miller e Carter, 1976).

Os fatores genéticos do hospedeiro humano contribuem significativamente para a diversidade observada na malária. Em uma mesma população, existe um grau elevado de variação entre indivíduos com relação aos genótipos que conferem suscetibilidade à malária, associação a cargas parasitárias mais expressivas, gravidade da infecção e tipo de resposta imune aos antígenos da malária (Machado et al., 2010).

Vários estudos relataram que características genéticas do hospedeiro são fortes determinantes na suscetibilidade às infecções. Variações individuais na expressão de citocinas também parecem ser influenciadas por fatores genéticos, e os indivíduos podem apresentar resposta inflamatória fraca, moderada ou intensa. O controle eficiente da infecção por *Plasmodium* exercida pelo hospedeiro implica a presença de uma resposta imune muito equilibrada, forte o bastante para conter o parasito, porém sem causar danos ao hospedeiro (Leoratti et al., 2011).

1.9.1 - POLIMORFISMOS DE CITOCINAS QUE PARTICIPAM DA RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA:

1.9.2 - CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

1.9.3 - INTERLEUCINA 1 (IL-1) E INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória cuja síntese está diretamente associada a IL-1 e ao TNF- α . Como ocorre com a IL-1, a IL-6 também se encontra elevada nos picos febris da malária, assim como na fase aguda de outras doenças infecciosas (Clark e Chaudhri, 1988). Seguindo os critérios da OMS para a caracterização da malária grave e da forma não complicada, estudo realizado em crianças africanas com malária grave causada por *P. falciparum* comprovou que a IL-6 apresenta concentrações séricas elevadas na forma cerebral da malária, não ocorrendo o mesmo nos casos de malária não complicada (Lyke et al., 2004). As concentrações séricas de IL-6 são determinadas em parte por fatores genéticos. O polimorfismo na região 5' do gene que codifica a IL-6, na posição -174 (-174 G $\rightarrow$ C) resulta em supressão da transcrição da citocina em resposta a estímulos inflamatórios tais como lipopolissacarídeos (LPS), ou IL -1 (Frade et al., 2011).

1.9.4 - TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa)

O fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), foi descrito como umas das principais citocinas relacionadas ao processo inflamatório e à resposta imune (Carswell et al., 1975). A descrição desta citocina levou a descoberta da

superfamília de TNF e seus receptores (revisado por Parameswaran e Patial, 2010). O TNF- α participa na defesa do hospedeiro contra infecções, causando incremento da expressão de moléculas de adesão, aumentando a circulação de células no local da infecção, estimulando macrófagos e neutrófilos a realizarem fagocitose, assim como a liberarem outras citocinas e mediadores inflamatórios. A exacerbada produção de TNF- α tem sido associada à patogénia de diversas doenças, como artrite reumatoide, doença de Crohn, arterio-esclerose e sepse (Revisado por Parameswaran e Patial, 2010). Na malária, o TNF- α foi a primeira citocina para a qual houve comprovação de níveis elevados em soro de pacientes com malária grave por *P. falciparum* (Grau et al., 1989).

Os principais tipos celulares produtores de TNF- α são os macrófagos, células T e B, monócitos e fibroblastos. A expressão do gene que codifica o TNF- α acontece por meio de inúmeras vias de sinalização celular na maior parte das células, sem que haja uma estimulação prévia, sendo necessário que a célula seja exposta a estímulos como lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (Falvo et al., 2000; Tsai et al., 2000).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação transcricional do gene que codifica o TNF- α (Pociot et al., 1993), dentre eles, estudos de polimorfismos (SNP) na região promotora do gene, posição -308 G $\rightarrow$ A e -1031 T $\rightarrow$ C (Sohail et al., 2008), por estarem associados à expressão alterada do gene durante a resposta inflamatória em vários modelos de doenças. Além disso, esses polimorfismos foram associados a complicações cerebrais da malária causada por *P. falciparum* (Sinha et al., 2008), e ao risco aumentado de desenvolvimento de anemia grave em crianças recém-nascidas do Quênia que foram infectadas por *P. falciparum* (Aidoo et al., 2001).

O polimorfismo na posição -308, no qual ocorre uma substituição do nucleotídeo guanina (G) por uma adenina (A), está relacionado a um aumento na

produção de TNF- α (Hajeer and Hutchinson, 2001), o mesmo ocorrendo no polimorfismo -1031, no qual ocorre troca de uma timina (T) por uma citosina (C). Os dados são escassos em relação à associação de TNF- α e malária por *P. vivax*. Sohail e colaboradores (2008) demonstraram a existência de associação dos polimorfismos -308 G $\rightarrow$ A e -1031 T $\rightarrow$ C com infecção sintomática por *P. vivax* em 40 pacientes na Índia. Recentemente, Kuesap et al (2010) buscaram uma associação de haplótipos do gene do TNF, posições -1031/-857/-308/-238 com a suscetibilidade à malária. Porém, os resultados não mostraram associação entre a heme oxigenase 1 (HO-1) e os polimorfismos do TNF que compõem este haplótipo, incluindo o efeito do cádmio e a patogenicidade/gravidade da malária, devido ao número restrito de amostras analisadas. Sendo assim, o papel dos polimorfismos do gene que codifica o TNF- α e a infecção por *P. vivax* permanece pouco compreendido.

A associação entre polimorfismos de TNF- α e diferentes fenótipos de malária mostrou resultados diferentes de acordo com a população estudada. Na Índia, os polimorfismos -1031 T $\rightarrow$ C e -863 C $\rightarrow$ A foram associados à malária grave e a elevada parasitemia na infecção por *P. falciparum*. Também se constatou associação do haplótipos de TNF-1031/-857/-308/-238 e elevada parasitemia (Basu et al., 2010; Sinha et al., 2008). Em algumas populações da Oceania e África, os polimorfismos do gene do TNF- α -238 G $\rightarrow$ A e -376 G $\rightarrow$ A parecem estar associados a diferentes fenótipos de malária (Eid et al., 2010; Randall et al., 2010).

No contexto da malária em pacientes brasileiros, os polimorfismos -238 G $\rightarrow$ A e -308 G $\rightarrow$ A no gene que codifica o TNF- α foram estudados pelo grupo de pesquisa da Dra Sandra do Lago Moraes no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, na tese de doutorado de Fabiana Leoratti, não tendo sido observadas associações com presença ou ausência de manifestações clínicas de malária, ou

com os níveis de parasitemia em pacientes sintomáticos ou assintomáticos (comunicação pessoal da Dra. Fabiana Leoratti).

1.9.5 - INTERLEUCINA 12 (IL-12)

É uma citocina envolvida na regulação entre as respostas Th1 e Th2, intensificando a resposta Th1. Uma redução da capacidade de produzir esta citocina pode levar ao desenvolvimento de resposta Th2 exacerbada (Zedan et al, 2010).

IL-12 é uma citocina heterodimérica composta de duas subunidades (IL-12p35 e IL-12p40), secretada principalmente por macrófagos e células dendríticas. Trata-se de um potente indutor de secreção de IFN- γ por células T CD4⁺ mesmo em presença de células T regulatórias (T_{reg}) (King e Segal, 2005). IL-12 também aumenta a secreção de outras citocinas, assim como o potencial citotóxico de células NK e células T CD8⁺ (Trinchieri, 2003). A produção de IL-12 é rapidamente induzida tanto em sistema nervoso central (SNC), quanto no periférico, no contexto de uma série de infecções (Coutelier et al, 1995; Novelli e Cassanova, 2004; Parra et al, 1997; Trinchieri, 2003). Diversos SNP foram identificados no gene que codifica a IL-12, incluindo um polimorfismo na região 3' não traduzida, onde ocorre troca de A→C na posição +1188. Estudos anteriores revelaram a associação deste polimorfismo com o aumento da produção de IL-12, elevada mortalidade e produção reduzida de óxido nítrico periférico (NO) em crianças tanzanianas com malária cerebral (Ong'echa et al., 2011).

1.9.6 - CITOCINAS ANTI- INFLAMATÓRIAS

1.9.7 - INTERLEUCINA 4 (IL- 4)

É uma citocina produzida por células Th2 e basófilos/mastócitos ativados. Induz a mudança da resposta imune de Th1 para Th2, inibindo a resposta Th1, diminuindo a produção e atividade de IFN- γ e também regulando a produção de anticorpos (Richards, 1997; Torre et al., 2002).

O gene que codifica a IL-4 está localizado na região 5q31-33 (Garcia et al., 1998; Rihet et al., 1998) e vários SNP foram descritos, quatro deles localizados na região promotora do gene (Nakayama et al., 2000).

Polimorfismos na região promotora do gene da IL-4, especialmente o SNP na posição +33 C→T, parecem regular a atividade desta citocina e os níveis de IgE (Basehore et al., 2004). Esse polimorfismo têm sido associado à asma, (Beghé et al., 2003), artrite reumatóide (Pawlik et al., 2005), e também à malária grave (Verra et al., 2004).

Alguns desses SNP foram implicados na regulação da produção de IgE total (Marsh et al., 1995; Suzuki et al., 2000). No Gana, crianças com malária cerebral apresentaram elevada frequência do genótipo B1B1 no intron 3 do gene que codifica a IL-4, nas posições +33 C→T e -590 C→T e estas crianças apresentavam concentrações elevadas de IgE total quando comparadas aos grupos sem esses SNP (Gyan et al., 2004).

1.9.8 - INTERLEUCINA 10 (IL-10)

Em 1990, Moore e colaboradores descreveram a interleucina 10 (IL10), que constitui um dos membros da família IL10. Trata-se de citocina anti-inflamatória produzida por monócitos e linfócitos, com efeitos pleiotrópicos (Ouyang et al.,

2011), exercendo papel central na regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, auxiliando na contenção da resposta inflamatória (Buruiana et al., 2010). A ausência de IL-10 em modelos animais leva a dano tissular, auto-imunidade, ou infecção crônica na dependência do tipo de doença.

A IL-10 é produzida por muitas células imunes tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos Th1, Th2 e Th17. Inibe a produção de interferon gama (citocina pró-inflamatória) e aumenta a diferenciação de células T regulatórias.

O gene que codifica a IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32 e é altamente polimórfico, apresentando mais de 27 SNPs na região 5' e na região promotora (Giordani et al., 2003). A IL-10 exerce suas ações por meio de um receptor heterodimérico específico no qual a cadeia 1 é responsável pela elevada afinidade de ligação (Oliveira et al., 2011). Baixas concentrações de IL-10 e TNF- α foram associadas à malária cerebral e anemia grave em casos de malária por *P. falciparum* (Kurtzhals et al., 1998; Othoro et al., 1999; May et al., 2001).

Em 2010, Huebinger et al, estudando pacientes que haviam sofrido queimaduras, mostraram que indivíduos com o SNP -819 C→T apresentaram menor risco de vida. Este mesmo polimorfismo foi associado à resposta imune de menor intensidade em algumas doenças auto-imunes e inflamatórias (Sun et al., 2010). Estudos mostraram que o genótipo GG, relacionado ao polimorfismo na posição -1082 G→A do gene da IL-10 foi associado à elevada produção da citocina, aparentemente protegendo o trato gastro-intestinal (Sun et al., 2010).

Com relação ao SNP -3575 T→A alguns autores relataram a associação do alelo T à produção de altas concentrações de IL-10. Rothman et al. (2006), demonstraram a associação dos genótipos AA ou TA (homozigoto mutado ou heterozigoto, respectivamente), nessa mesma posição, ao risco aumentado de

desenvolvimento de linfoma não Hodgkin. Contrariamente, estudo realizado por Domènech et al. (2007), sugeriu o genótipo -3575 AA da IL-10 como um marcador de sobrevida aumentada em indivíduos com linfoma.

Moraes et al. (2004), verificaram em uma população brasileira com hanseníase que o haplótipo formado pelos SNP -3575A/-2849C/-2763C da região promotora distal da IL-10 estaria associado à proteção contra a hanseníase, enquanto que o haplótipo -3575T/-2849A/-2763C foi associado à suscetibilidade à doença, porém sem a comprovação de associação dos haplótipos com as formas clínicas. Em um estudo realizado na Índia, o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C da IL-10 pareceu conferir resistência à hanseníase, enquanto o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A foi associado à forma multibacilar (Malhotra et al., 2005).

Até o presente, não existem estudos sobre polimorfismos do gene da IL-10 na posição -3575 em pacientes com malária no Brasil e no mundo.

A citocina IL-10 está associada à produção aumentada de IgG (imunoglobulina G) *in vitro* por células B ativadas após estímulo com antígenos plasmodiais ou ativadores policlonais (Afrid et al., 2012). Células B reguladoras (B_{reg}) produzem anticorpos de classes IgG e IgA e citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10 e TGF β . Estudos conduzidos em modelos murinos de doenças auto-imunes e doenças infecciosas demonstraram que as células B_{reg} são especificamente ativadas em processos infecciosos, controlando a progressão da resposta imune por meio da secreção de IL-10 e TGF β , e ainda pela neutralização de fatores solúveis, exercida por IgG e IgA, culminando com a redução da ativação de células dendríticas e macrófagos por intermédio da interação das IgG com o receptor Fc γ RIIB (Mizoguchi & Baham, 2006)

1.9.9 – FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO - TGF- β 1

O gene que codifica o fator transformador de crescimento β 1 foi mapeado no cromossomo 19q13.1-13.3. Esse gene é expresso em células endoteliais, hematopoéticas e células de tecidos relacionados. O gene do TGF β 1 codifica a proteína de mesmo nome que faz parte da família de fatores de crescimento e diferenciação que exercem inúmeras funções em uma variedade de órgãos e sistemas. A proteína TGF β 1 é notável por sua capacidade de modular uma variedade de funções celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação e apoptose *in vivo* e *in vitro*. Tanto a baixa como a alta expressão desta proteína pode causar alterações no trato respiratório.

TGF- β 1 é uma citocina que está diretamente envolvida na desativação de monócitos/macrófagos resultando na inibição da produção de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio que exercem atividade microbica contra *Plasmodium* spp. TGF- β 1 também inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ produzida por linfócitos, levando a resposta imune ao perfil Th2 (Frade et al., 2011). De interesse particular no estudo da malária, pode-se destacar que as plaquetas ativadas liberam TGF β 1 que pode desencadear apoptose de células endoteliais levando a graves complicações na malária cerebral (Wassmer et al., 2006).

Existem dois polimorfismos funcionais muito estudados no gene que codifica o TGF β 1. O SNP na região promotora -509 C $\rightarrow$ T, onde a troca do alelo C pelo alelo T modifica uma sequência consenso YY1 associada a uma desregulação na transcrição do gene. Em outro polimorfismo do gene que codifica o TGF β 1 na posição +869 T $\rightarrow$ C, existe troca do alelo T pelo alelo C, acarretando a mudança do

aminoácido leucina por prolina, e aumento nos níveis séricos de TGF β 1 (Gantt et al., 2003).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Entre todas as doenças infecciosas, a malária é a que exerce maior impacto sobre a mortalidade, sobretudo a infantil, em áreas endêmicas, e até o presente, não existem vacinas eficazes para a prevenção. Estamos ainda muito longe do entendimento das causas que levam alguns pacientes a óbito, enquanto outros permanecem assintomáticos ou desenvolvem formas não complicadas de malária. O fato de apenas uma pequena porcentagem de indivíduos que vivem em áreas endêmicas desenvolverem complicações sugere a existência de fatores genéticos do hospedeiro que poderiam exercer papel fundamental, além da ação dos fatores ambientais, e outros ligados ao parasito propriamente dito. A identificação de polimorfismos genéticos associados à maior suscetibilidade ou a proteção contra as formas sintomáticas de malária poderia auxiliar na elaboração de estratégias vacinais de maior eficácia. A importância do estudo de polimorfismos genéticos de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e IL-12 e anti-inflamatórias tais como IL-4, IL-10 e TGF- β 1 constitui área de pesquisa ainda pouco explorada no contexto da malária, notadamente em nosso meio, mas que poderia contribuir para o entendimento das razões que levam alguns pacientes a desenvolverem as formas mais graves de malária.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral:

Determinar a frequência de polimorfismos genéticos de citocinas pró e anti-inflamatórias em indivíduos de área endêmica da Amazônia Legal brasileira com as formas sintomática e assintomática de malária.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Padronizar técnicas de PCR-RFLP para a detecção de polimorfismos genéticos das seguintes citocinas: IL-6 (-174), IL-12p40 (+1188), IL-4 (+33), IL-10 (-3575), TGF- β 1 (+869);
- 2) Determinar e comparar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos genéticos das citocinas selecionadas nos dois grupos de pacientes, isto é, com as formas sintomática e assintomática de infecção malárica;
- 3) Verificar a existência de associação entre os polimorfismos de citocinas e os níveis de parasitemia encontrados nos sujeitos de pesquisa, determinados pelo teste da gota espessa.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - ÁREA DE ESTUDO

As amostras de sangue foram colhidas na cidade de Peixoto de Azevedo, localizada na região norte do Estado do Mato Grosso, a 700 km de Cuiabá, com 29.237 habitantes, de acordo com o censo de 1996. Na época em que as amostras foram colhidas (1995-1996) a transmissão de malária naquela região era considerada perene, com aumento de transmissão na estação chuvosa. Com o surgimento dos garimpos nas décadas de 1970 e 1980 ocorreram intensos fluxos migratórios para a região, levando a aumento do número de casos de malária.

Mato Grosso notificou 59.089 casos de malária em 1995 e 1996, ocupando o primeiro lugar no Brasil em índice de lâminas positivas (40,3%) no teste da gota espessa. Em 1996, mais de 32.000 lâminas foram examinadas em Peixoto de Azevedo e Matupá, das quais 7.641 foram positivas para malária (24%). A espécie predominante nos municípios foi o *P. vivax* (56,3%), seguida de *P. falciparum* (44,3%) e apenas 0,3% de malárias mistas. O principal transmissor de *P. falciparum* era o mosquito *Anopheles darlingi*, que apresentava índice de picadas/ homem/ hora de 13,5 nas regiões de garimpo, e de 3,1 na região peri-urbana.

4.2 – CASUÍSTICA

A casuística da presente pesquisa foi determinada pelo número de amostras de sangue total de indivíduos sintomáticos e assintomáticos remanescentes no biorrepositório do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Trata-se, portanto, de uma casuística de conveniência. Por se tratar de pacientes que viviam em áreas endêmicas, existiu um contingente muito maior de indivíduos infectados e sintomáticos, em relação a

infectados assintomáticos, pois estes últimos não procuravam os serviços de saúde.

4.3 - Critérios de inclusão: foram admitidos pacientes com diagnóstico laboratorial de malária realizado pelo teste da gota espessa e/ou por técnica de semi-nested PCR nos indivíduos com gota espessa negativa. Ambos os testes (gota espessa e semi-nested PCR) são capazes de determinar gênero e espécie. A semi-nested PCR foi realizada de acordo com protocolo previamente descrito (Kimura et al., 1997). Os resultados da parasitemia detectada pela gota espessa foram expressos como: parasitemia baixa (<1.000 parasitos/ mm^3 de sangue); moderada (1.000 a 10.000 parasitos/ mm^3 de sangue); intensa (>10.000 parasitos/ mm^3 de sangue). Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para a colheita das amostras de sangue foram obtidos em pesquisa anterior (CAPPesq processo 968/06).

4.3.1 - Grupo de indivíduos com malária sintomática. O grupo de estudo foi composto por 104 indivíduos não aparentados, com malária por *Plasmodium* spp, forma sintomática não grave. Eram todos moradores de uma área endêmica de malária da Amazônia Legal brasileira (comunidade de Peixoto de Azevedo, Mato Grosso), e procuraram o Posto de Saúde da Fundação Nacional de Saúde por apresentarem sintomas de infecção malárica (febre, calafrios, mal estar, dores musculares, cefaleia). Esses pacientes foram recrutados durante o período de 1995 a 1996, e não estavam em tratamento no momento da colheita da amostra de sangue. Neste período (1995-1996), a cidade de Peixoto Azevedo apresentava elevada endemicidade para malária, uma vez que havia exploração de garimpos na região. O clima da área de origem dos indivíduos é caracterizado por período de chuva que vai de outubro a abril, e estiagem de maio a setembro. A temperatura ambiente varia de 15 a 38°C , com umidade relativa de 90%. Em 2005, no Estado

do Mato Grosso, a incidência parasitária anual (IPA) foi de 4,3 por 1.000 habitantes (MS/SIVEP-MALÁRIA).

4.3.2 - Grupo de indivíduos com malária assintomática. Este grupo foi composto por 37 indivíduos não aparentados, infectados, porém assintomáticos, que foram positivos apenas por semi-nested PCR (gota espessa negativa). Estes indivíduos permaneceram assintomáticos por 60 dias a partir da coleta de sangue, parâmetro valorizado para o recrutamento de sujeitos de pesquisa para este grupo. Para o recrutamento desses indivíduos assintomáticos, os pesquisadores realizaram uma busca ativa, isto é, percorreram vários bairros e moradias da mesma cidade solicitando a indivíduos assintomáticos, porém com o mesmo nível de exposição dos sintomáticos, que participassem da pesquisa. A complexidade de realização desta “busca ativa”, e o fato da cidade escolhida para a pesquisa fazer parte de área reconhecidamente endêmica para malária na época (1995-1996) determinou o número mais baixo de indivíduos incluídos neste grupo.

4.4 - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

As amostras de sangue foram colhidas em projeto anterior, aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas (protocolo CAPPesq 968/06). A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), tendo recebido o protocolo de número 0633/10. No presente estudo, foi garantida preservação rigorosa do anonimato dos sujeitos de pesquisa.

4.5 - EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO COM FENOL/CLOROFÓRMIO

O DNA de cada amostra de sangue foi extraído em pesquisa anterior com técnica de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo descrito por Snounou et al. (1993), modificado por Ferreira et al. (1998). As amostras de DNA foram congeladas a -20°C e armazenadas em biorrepositório do laboratório.

4.6 - *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Após etapa de padronização durante a qual foram testadas várias concentrações de cada um dos reagentes, a amplificação dos SNP foi realizada com 100 ng de DNA genômico em volume total de 25 µl, contendo 1U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), em tampão com 100 mM de Tris-HCL (pH 8,3) e 500 mM KCL; 1,5 mM de MgCl₂, 40mM de dNTP, e 0,25 pM de cada primer (forward e reverse). Os primers utilizados na presente pesquisa foram previamente descritos (Tabela 1).

Tabela 1 - Polimorfismos genéticos de citocinas em indivíduos de área endêmica da Amazônia Legal brasileira, sequência de primers e referências bibliográficas.

CITOCINA	POLIMORFISMO	PRIMER	REFERÊNCIA
IL-6	-174 G→C (rs1800795)	F: TGACTTCAGCTTTACTCTTGT R: CTGATTGGACTTATTAAG	Sainz et al., 2008
IL-12p40	+1188 A→C (rs3212227)	F: CTGATCCAGGATGAAAATTTGG R: CCCATGGCAACTTGAGAGCTGG	Hegazy et al., 2008
IL-4	+33 C→T (rs2070874)	F: CTCATTTTCCCTCGGTTTCAGC R: GAAGCAGTTGGGAGGTGAGA	Shibata et al.,2002
IL-10	-3575 T→A (rs1800890)	F: GGTTCCTTCATTTCAGC R: AACTGTGAGCTTCTTGAGG	Moraes et al., 2003
TGFβ1	+869 T→C (rs1800470)	F: GTGCCGGGGGGCGCCGCTCCCCATGCCTCCCTC R: CAGCACCAGTAGCCACAGCAGCGG TAGCCGCAGC	Wong et al., 2003

F=forward R= Reverse

4.7 - ETAPAS DESENVOLVIDAS NO ESTUDO

4.8 - DETECÇÃO DE AMPLIFICADOS - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Foram utilizadas concentrações de agarose variando de 2 a 5% de acordo com o peso molecular dos amplificadores (Invitrogen-UltraPure/Cambrex-Nusieve GTG). A agarose foi dissolvida em tampão de corrida TAE 1x (Tris acetato 40 mM, EDTA 2 mM). Para os SNP da IL-6 e IL-12p40 a concentração de agarose foi 2%, enquanto para os SNP da IL-4, IL-10 e TGF β 1 a concentração de agarose foi 5%. Os padrões de peso molecular utilizados foram o 100 bp ou o 50 bp DNA *Ladder* (Fermentas) que foram preparados em tampão de amostra de DNA contendo 0,5% de azul de bromofenol, 0,5% de xileno cianol, 100 mM EDTA e 50% glicerol. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (50 μ g/mL) durante 15 minutos ao abrigo de luz. O padrão de bandas obtido foi analisado em transluminador com luz UV e fotografado (UVP Benchtop - UV transilluminator).

As condições de amplificação e de restrição enzimática para cada SNP estudado foram padronizadas e detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de amplificação e de restrição enzimática (RFLP) para cada polimorfismo estudado.

CITOCINA	SNP	AMPLIFICAÇÃO	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	TEMPERATURA INCUBAÇÃO	ALELO/FRAGMENTO (PB)
IL-6	-174	95°C 5min 35x 95°C 30s 51°C 30s 72° C 30s 72° C 5min	2U NlaIII enzima cliva o alelo selvagem e o mutado	37°C/ 3h	GG= (selvagem): 198pb clivado em 167 e 31pb CC=(mutado): 122, 45, 31pb GC= (heterozigoto): 167, 122, 45, 31pb
IL-12p40	+1188	94°C 4min 35x 94°C 30s 58° C 30s 72° C 30s 72° C 5min	2U TaqI	37°C/ 3h	AA= (selvagem): 226pb CC= (mutado): 185 e 41pb AC= (heterozigoto): 226, 185,41pb
IL-4	+33	94°C 5min 40x 95°C 30s 60° C30s 72° C30s 72° C 15min	3U MnlI	37°C/ 3 h	TT (selvagem): 150pb CC (mutado): 97 e 53pb TC: (heterozigoto): 150, 97 e 53pb
IL-10	-3575	95°C 5min 35x 95°C 30s 62° C 30s 72° C 30s 72° C 7min	2,5U Apol	50°C/ 3h	TT= (selvagem): 121 e 107pb AA= (mutado): 228pb AT = (heterozigoto): 228, 121, 107pb
TGFβ1	+869	94°C 5min 35x 94°C 30s 60° C 30s 72° C 30s 72° C 10min	2U NotI	37°C/ 3h	TT= (selvagem): 199pb CC= (mutado): 179 e 20pb TC= (heterozigoto): 199,179, 20pb

Figura 5 - Gel de agarose a 5% com a restrição enzimática de fragmento amplificado do SNP IL-10 -3575. Neste SNP, indivíduos com genótipo selvagem (TT), após a RFLP com a enzima Apol, apresentam dois fragmentos, de 121 e 107 bp, enquanto o amplificado do indivíduo homozigoto polimórfico/ mutado (AA) não sofre clivagem (228 pb). Os heterozigotos (TA) apresentam três fragmentos de 228, 121 e 107 bp.

PM (peso molecular); C1 Amostra não digerida (228 pb); C2 Amostra digerida (121 e 107 pb); C3 Amostra digerida (228/121/107 pb); amostra 1: genótipo AA homozigoto polimórfico/mutado (228 pb); amostras 2 e 3 genótipo TT homozigoto selvagem (121/107 pb); amostra 4: genótipo TA heterozigoto (228/121/107 pb).

4.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o Programa Sigma Stat 3.5 (Advisory Statistics for Scientists) e Prism (Graph Pad 3.0). As comparações entre as frequências e proporções de diferentes parâmetros entre os dois grupos (indivíduos sintomáticos e assintomáticos, ou indivíduos de acordo com a parasitemia) foram feitas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher (para comparações com $n \leq 5$). As probabilidades dos testes consideraram intervalo de confiança de 95%, e significantes valores de $p \leq 0,05$. Sempre que foi encontrado valor de $p \leq 0,05$ foi aplicado o teste do qui-quadrado ou exato de Fisher com correção de Yates (p corrigido - p_c), e para considerar este último significativo, o valor de p_c teria que ser maior ou igual ao valor de p .

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 – DADOS DA CASUÍSTICA

Na tabela 3 foram apresentados os sujeitos de pesquisa dos dois grupos (sintomáticos e assintomáticos), de acordo com a idade, gênero, e as espécies de *Plasmodium* detectadas pela gota espessa e/ou pelo semi-nested-PCR.

Tabela 3 - Características dos indivíduos dos dois grupos (sintomáticos e assintomáticos) de acordo com a idade, gênero e espécies de *Plasmodium* encontradas na gota espessa e/ou semi-nested PCR.

		Casuística		
		Total	Sintomáticos	Assintomáticos
Número de indivíduos		141	104	37
Idade em anos (mediana)		30	30	30
Idade em anos (min.- máx.)		2-71	2-71	11-67
Gênero	M	105	75	30
	F	36	29	07
Agente etiológico				
<i>P. falciparum</i>		32	26	06
<i>P. vivax</i>		32	18	14
<i>P. malariae</i>		01	00	01
<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> *		61	48	13
<i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i> *		01	01	00
<i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> *		01	01	00
<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> *		13	10	03

* Infecções mistas

Os sujeitos de pesquisa foram alocados em dois grupos (sintomáticos ou assintomáticos) e analisados de acordo com a faixa etária, gênero e nível de parasitemia encontrado na gota espessa (não detectável, baixa, moderada, intensa). Os resultados foram apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Características dos indivíduos dos dois grupos (sintomáticos e assintomáticos) distribuídos de acordo com a faixa etária, gênero e parasitemias encontradas na gota espessa (ND, baixa, moderada, intensa).

Faixa etária (anos)	Gênero		Parasitemia – sintomáticos			
	M	F	ND	Baixa	Moderada	Intensa
2 a 11	04	02	00	04	00	02
12 a 17	04	02	01	01	03	01
18 a 45	57	23	37	28	08	07
46 a 59	05	03	03	04	01	00
> 60	04	00	02	01	01	00
Total	74	30	43	38	13	10

Faixa etária (anos)	Gênero		Parasitemia – assintomáticos			
	M	F	ND	Baixa	Moderada	Intensa
2 a 11	01	00	01	00	00	00
12 a 17	00	00	00	00	00	00
18 a 45	25	05	30	00	00	00
46 a 59	03	01	04	00	00	00
> 60	01	01	02	00	00	00
Total	30	07	37	00	00	00

ND= não detectável pelo teste da gota espessa

Na tabela 4 é possível observar que a casuística da presente pesquisa foi constituída de uma maioria de indivíduos adultos jovens (18-45 anos) tanto no grupo de indivíduos sintomáticos (80/104 ou 76,92%), quanto no de assintomáticos (30/37 ou 81,08%). Todavia, havia 12 crianças/adolescentes no grupo sintomático (12/104 ou 11,54%), e destas,

03 apresentaram parasitemia intensa. No grupo de assintomáticos havia apenas uma criança com parasitemia indetectável. Também é importante salientar que no grupo de sintomáticos havia 04 indivíduos com mais de 60 anos, e no grupo de assintomáticos, 02 com mais de 60 anos, porém nenhum deles, em qualquer dos grupos, apresentou parasitemia intensa.

5.2 - POLIMORFISMOS DE CITOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA

5.2.1 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS DE CITOCINAS

Foram analisados por PCR-RFLP os polimorfismos das seguintes citocinas: IL-10 -3575; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-6 -174; TGF β 1 +869 de indivíduos infectados por *Plasmodium spp.* (tabela 4).

Quando os polimorfismos de citocinas de todos os indivíduos incluídos na pesquisa foram analisados em relação à presença ou não de sintomas, foram observadas diferenças estatisticamente significantes apenas para o polimorfismo de IL-10 -3575. O teste do χ^2 foi aplicado para a comparação entre os grupos sintomático (MS) e assintomático (AS). A frequência do genótipo TT na posição -3575 (T é o alelo selvagem) foi maior no grupo AS em relação ao grupo MS [$\chi^2=3,716$; $p=0,0269$; OR=0,4249, $pc=0,0424$]. Esta diferença foi igualmente significativa quando comparamos o genótipo TT em relação aos genótipos AA e AT agrupados, isto é, todos os indivíduos com genótipo selvagem versus aqueles com genótipo mutado somados aos heterozigotos, resultando em [$\chi^2=3,747$; $p=0,0269$; OR=0,4053; $pc=0,0264$]. Na análise realizada por alelo, a frequência do alelo T foi maior no grupo AS em relação ao MS [$\chi^2=4,506$; $p=0,0169$; OR=0,4570; $pc=0,0250$], com significância estatística ainda maior.

Tabela 5 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de IL-6 -174; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-10 -3575; TGFβ1 +869 dos indivíduos com malária sintomática (MS) e assintomática (AS).

POLIMORFISMO		MS N (%)	AS N (%)	TOTAL	χ^2 p	OR [IC 95%]	χ^2 pc
IL-6 -174							
Genótipo	GG	48 (46,15)	21 (56,75)	69	0,9222 0,1684	0,6857 [0,31-1,48]	NC
	CC	06 (5,76)	01 (2,70)	07			
	GC	50 (48,07)	15 (40,54)	65			
	Total	104	37	141			
Genótipo	GG	48 (46,15)	21 (56,75)	69	1,228	0,6531	NC
	GC+CC	56 (53,84)	16 (43,24)	72	0,1339	[0,30-1,39]	
Alelo	G	146 (70,19)	57 (77,02)	203	1,264 0,1304	0,7023 [0,37-1,30]	NC
	C	62 (29,80)	17 (22,97)	79			
	Total	208	74	282			
IL-12p40 +1188							
Genótipo	AA	37 (35,57)	17 (45,94)	54	0,9701 0,1623	0,6727 [0,30-1,48]	NC
	CC	12 (11,53)	03 (8,10)	15			
	AC	55 (52,88)	17 (45,94)	72			
	Total	104	37	141			
Genótipo	AA	37 (35,57)	17 (45,94)	54	0,1242	0,6497	NC
	AC+CC	67 (64,42)	20 (54,05)	87	0,1326	[0,30-1,39]	
Alelo	A	129 (62,01)	51 (68,91)	180	1,125 0,1444	0,7364 [0,41-1,29]	NC
	C	79 (37,98)	23 (31,08)	102			
	Total	208	74	282			
IL-4 +33							
Genótipo	CC	45 (43,26)	14 (37,83)	59	0,0480 0,4133	0,9084 [0,38-2,14]	NC
	TT	13 (12,5)	10 (27,02)	23			
	CT	46 (44,23)	13 (35,13)	59			
	Total	104	37	141			
Genótipo	CC	45 (43,26)	14 (37,83)	59	0,3308	1,253	NC
	CT+TT	59 (56,73)	23 (62,16)	82	0,2826	[0,58-2,70]	
Alelo	C	136 (65,38)	41 (55,40)	177	2,326 0,0636	1,520 [0,88-2,60]	NC
	T	72 (34,61)	33 (44,59)	105			
	Total	208	74	282			
IL-10 -3575							
Genótipo	TT	58 (55,76)	28 (75,67)	86	3,716 0,0269	0,4249 [0,17-1,02]	2,971 0,0424
	AA	07 (6,73)	01 (2,70)	08			
	TA	39 (37,5)	08 (21,62)	47			
	Total	104	37	141			
Genótipo	TT	58 (55,76)	28 (75,67)	86	4,545	0,4053	0,3747
	AT+AA	46 (44,23)	09 (24,32)	55	0,0165	[0,17-0,94]	0,0264
Alelo	T	155 (74,51)	64 (86,48)	219	4,506 0,0169	0,4570 [0,21-0,95]	3,842 0,0250
	A	53 (25,48)	10 (13,51)	63			
	Total	208	74	282			

Na IL-6 -174, o alelo G é o selvagem; IL-12p40 +1188, o alelo A é o selvagem; IL-4 +33, o alelo C é o selvagem; IL-10 -3575, o alelo T é o selvagem. *p*: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher; *pc*: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher com correção de Yates; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; NC= não calculado.

Continuação da tabela 5.

<i>Polimorfismo</i>		MS N (%)	AS N (%)	TOTAL	χ^2 p	OR [IC 95%]	χ^2 pc
<i>TGFβ1 +869</i>							
Genótipo	TT	44 (42,30)	16 (43,24)	60			
	CC	23 (2,11)	08 (21,62)	31	0,00624	0,9662	
	TC	37 (35,57)	13 (35,13)	50	0,4685	[0,41-2,26]	NC
	Total	104	37	141			
Genótipo	TT	44 (42,30)	16 (43,24)	60	0,00977	0,9625	
	TC+CC	60 (57,69)	21 (56,75)	81	0,4606	[0,45-2,05]	NC
Alelo	T	125 (60,09)	45 (60,81)	170			
	C	83 (39,90)	29 (39,18)	112	0,01164	0,9705	NC
	Total	208	74	282	0,4570	[0,56-1,67]	

No TGF-β1 +869, o alelo T é o selvagem. *p*: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher; *pc*: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher com correção de Yates; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; NC= não calculado.

Também foi analisada a frequência genotípica e alélica dos indivíduos estudados com relação aos cinco polimorfismos de citocinas IL-6 -174; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-10 -3575; TGFβ1 +869, com o intuito de verificar a existência de associações com os níveis de parasitemia. Tendo em vista que o diagnóstico nas áreas endêmicas é realizado por meio do teste da gota espessa, os sujeitos de pesquisa foram redistribuídos de acordo com o resultado deste teste, formando dois novos grupos de análise: o primeiro com parasitemia não detectável (n=80 indivíduos) versus o grupo formado por indivíduos com parasitemia baixa, moderada e intensa (n=61 indivíduos). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes somente para o polimorfismo de IL-12p40 +1188. Quando a frequência dos sujeitos de pesquisa portadores do genótipo selvagem AA foi analisada nos dois grupos (ND versus parasitemias detectáveis pela gota espessa), foram encontrados 36 indivíduos no grupo ND (45%) e 18 no grupo com parasitemias detectáveis (29,50%), e esta diferença foi estatisticamente significativa [$\chi^2=4,725$; $p=0,0149$; OR=2,235; $pc=0,0232$]. Além disso, quando os sujeitos de pesquisa foram analisados confrontando os AA com os AC e CC nos dois grupos

(ND e parasitemias detectáveis), também foram encontradas diferenças estatisticamente significantes [$\chi^2=3,515$; $p=0,0304$; OR=1,955; $pc=0,0446$].

A análise de todos os SNP em relação à parasitemia nos grupos ND e com parasitemias detectáveis pelo teste da gota espessa se encontra na tabela 5.

Tabela 6 - Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos IL-6 -174; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-10 -3575; TGF β 1 +869 nos sujeitos de pesquisa de acordo com o grau de parasitemia observado na gota espessa: não detectável (ND) versus baixa (<1.000 parasitas/mm³ de sangue), moderada (1.000 a 10.000 parasitas/mm³ de sangue) e intensa (>10.000 parasitas/mm³ de sangue). O grupo ND foi diagnosticado por PCR.

POLIMORFISMO		ND N%	BAIXA+MODERADA+INTENSA N%	χ^2 <i>p</i>	OR [IC 95%]	χ^2 <i>pc</i>
IL-6 -174						
Genótipo	GG	39(48,75)	30(49,18)	0,00219 0,4813	0,9838 [0,49-1,95]	NC
	CC	04(5,0)	03(4,91)			
	GC	37(46,25)	28(45,90)			
	Total	80	61			
Genótipo	GG	39(48,75)	30(49,18)	0,00256 0,4798	0,9829 [0,50-1,91]	NC
	GC+CC	41(51,25)	31(50,81)			
Alelo	G	115(71,87)	88(72,13)	0.00225 0,4811	0,9874 [0,58-1,66]	NC
	C	45(28,12)	34(27,86)			
	Total	160	122			
IL-12p40 +1188						
Genótipo	AA	36(45,0)	18(29,50)	4,725 0,0149	2,235 [1,07-4,64]	3,970 0,0232
	CC	10(12,5)	05(8,19)			
	AC	34(42,5)	38(62,30)			
	Total	80	61			
Genótipo	AA+AC	70(87,5)	56(91,80)	0,6742	0,6250	NC
	CC	10(12,5)	05(8,19)	0,2058	[0,20-1,93]	
Genótipo	AA	36(45,0)	18(29,50)	3,515 0,0304	1,955 [0,96-3,95]	0,2890 0,0446
	AC+CC	44(55,0)	43(70,49)			
Alelo	A	106(66,25)	74(60,65)	0,9383 0,1664	1,273 [0,78-2,07]	NC
	C	54(33,75)	48(39,34)			
	Total	160	122			

p: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher; *pc*: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher com correção de Yates; OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; NC= não calculado.

Continuação da tabela 6.

<i>Polimorfismo</i>		ND N%	BAIXA+MODERADA+INTENSA N%	χ^2 p	OR [IC 95%]	χ^2 pc
IL-4 +33						
Genótipo	CC	35(43,75)	24(39,34)			
	TT	14(17,5)	09(14,75)	0,5501	1,317	
	CT	31(38,75)	28(45,90)	0,2291	[0,63-2,73]	NC
	Total	80	61			
Genótipo	CC	35(43,75)	24(39,34)	0,2761	1,199	
	CT+TT	45(56,25)	37(60,65)	0,2996	[0,60-2,36]	NC
Alelo	C	101(63,12)	76(62,29)	0,0204	1,036	
	T	59(36,87)	46(37,70)	0,4432	[0,63-1,68]	NC
	Total	160	122			
IL-10 -3575						
Genótipo	TT	47(58,75)	34(55,73)			
	AA	03(3,75)	05(8,19)	0,0014	1,014	
	TA	30(37,5)	22(36,06)	0,4849	[0,50-2,05]	NC
	Total	80	61			
Genótipo	TT	47(58,75)	34(55,73)	0,1285	1,131	
	TA+AA	33(41,25)	27(44,26)	0,3600	[0,57-2,21]	NC
Alelo	T	124(77,5)	90(73,77)	0,5261	1,225	
	A	36(22,5)	32(26,22)	0,2341	[0,70-2,11]	NC
	Total	160	122			
TGFβ1 +869						
Genótipo	TT	37(46,25)	23(37,70)			
	CC	15(18,75)	16(26,22)	0,3623	1,264	
	TC	28(35,0)	22(36,06)	0,2736	[0,58-2,71]	NC
	Total	80	61			
Genótipo	TT	37(46,25)	23(37,70)	1,034	1,422	
	TC+CC	43(53,75)	38(62,29)	0,1546	[0,72-2,80]	NC
Alelo	T	102(63,75)	68(55,73)	1,856	1,397	
	C	58(36,25)	54(44,26)	0,0865	[0,86-2,26]	NC
	Total	160	122			

p: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher; pc: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher com correção de Yates; OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; NC= não calculado.

A distribuição genotípica encontrada para os cinco polimorfismos estudados foi analisada para saber se elas respeitavam ou não o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta análise foi realizada com o auxílio de uma equação que se encontra disponível no sítio <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>. Para tanto, foram consideradas as distribuições genotípicas encontradas no grupo de indivíduos sintomáticos (MS) e nos assintomáticos (AS). Todos os cinco polimorfismos se encontravam em equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE), inclusive o SNP IL-10 -3575

para o qual encontramos diferenças entre os dois grupos. Os cálculos das frequências esperadas e encontradas são apresentados no anexo B.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A malária é uma das doenças infecciosas mais prevalentes em regiões tropicais e subtropicais, constituindo importante problema de saúde pública no mundo. Os casos de malária grave são responsáveis pelo maior número de mortes nestas regiões, principalmente em crianças com menos de cinco anos de idade. Infelizmente, até o momento não dispomos de uma vacina eficaz. Sendo assim, a busca de informações sobre a resposta imune na malária, bem como de fatores genéticos do hospedeiro que possam influenciar esta resposta fazem parte dos esforços para o desenvolvimento de vacinas contra a malária (WHO, 2009).

As manifestações clínicas da malária variam desde infecções assintomáticas até infecções graves e complicadas, podendo até mesmo evoluir a óbito, sendo as razões para esta diversidade de manifestações pouco conhecidas. Além de fatores intrínsecos do parasito e fatores ambientais, a genética do hospedeiro parece desempenhar papel fundamental nas diferenças individuais de manifestações clínicas da doença (Machado *et al.*, 2010)

A relevância de fatores genéticos do hospedeiro na malária foi proposta há mais de 50 anos, quando se observou que a presença de talassemia atuava como fator de proteção contra a malária, e que a talassemia havia sofrido modificação de seu perfil epidemiológico em áreas endêmicas de malária (Haldane, 1948). Além de várias desordens genéticas que estão associadas com a suscetibilidade à malária, existem inúmeros polimorfismos nos genes que codificam mediadores da resposta imune, tanto inata, caso dos TLR, quanto adquirida, tais como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-6, IL-4, IL-1 que têm sido descritos em pacientes com malária (Azad *et al.*, 2012).

Para a sobrevivência do hospedeiro contra patógenos invasores e o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz contra os mesmos, a capacidade inata do hospedeiro de

reconhecer patógenos é fundamental. Na infecção malárica existe rápida produção de citocinas inflamatórias no âmbito da resposta inata que auxilia o controle da parasitemia até que o hospedeiro humano seja capaz de gerar uma imunidade adaptativa para eliminar o parasito. Juntamente com o desencadeamento da imunidade inata, existe ativação celular e produção de citocinas que são fundamentais no combate ao parasito, no entanto, uma resposta exacerbada poderia acarretar efeitos deletérios ao hospedeiro. Sendo assim, o equilíbrio entre os mecanismos efetores da resposta imune é crucial (Artavanis-Tsakonas et al., 2003).

Para a resposta imune inata desempenhar seu papel, ela depende de vários PRR (Receptores de Reconhecimento de Padrão), expressos em uma grande variedade de células. Estes PRR desencadeiam um processo de ativação e de sinalização nas células do hospedeiro humano, para que estas células produzam citocinas, e para que ocorra a ativação da resposta imune adaptativa que culminará com a ampliação da resposta imune (Akira et al., 2006).

No presente estudo a frequência de polimorfismos de citocinas que atuam na resposta inflamatória contra a malária foram investigados em uma população de área endêmica da Amazônia Legal brasileira composta por indivíduos sintomáticos e assintomáticos para a malária, com o intuito de investigar se existem associações entre polimorfismos e a presença ou não de sintomas, em indivíduos com heranças genéticas semelhantes, considerando a existência de fatores genéticos relacionados à etnicidade que poderiam exercer papel na suscetibilidade a doenças infecciosas, incluindo a malária. Tendo em vista que na época em que foram colhidas as amostras de sangue a região estudada apresentava elevada transmissão de malária, foi difícil encontrar indivíduos assintomáticos por no mínimo 60 dias, uma vez que existia exposição diária a inúmeras picadas de mosquitos infectados, tanto na área de garimpo, quanto na periurbana. Este fato justifica o número mais restrito de indivíduos alocados no grupo de

assintomáticos, porém, devido aos objetivos da presente pesquisa, não poderíamos utilizar outro tipo de grupo controle formado, por exemplo, por doadores de banco de sangue da cidade de São Paulo.

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da interação do *Plasmodium* com o hospedeiro humano na produção dos quadros clínicos mais ou menos graves associados ao maior ou menor controle da parasitemia, por intermédio da produção de citocinas (Gomes et al., 2011). A maior parte dos estudos realiza comparações entre pacientes com malária grave (forma cerebral, associada ou não a anemia intensa) em relação a indivíduos assintomáticos ou sem malária, porém, devido ao fato da malária grave ser felizmente pouco frequente em nosso meio, optamos pela comparação de pacientes sintomáticos, porém apresentando malária não grave e não complicada, em relação a indivíduos com malária assintomática.

No presente estudo, no que se refere às citocinas pró-inflamatórias, investigamos SNP dos genes que codificam a IL-6 (posição -174) e a IL-12p40 (posição +1188), supondo que estes SNP pudessem estar envolvidos na suscetibilidade à infecção por plasmódios. Também investigamos SNP dos genes que codificam citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-4 (posição +33); IL-10 (posição -3575) e o TGF- β 1 (posição +869). A seleção das citocinas e dos SNP a serem analisados nesta pesquisa foi feita com base em estudos anteriores realizados pelas doutoras Sandra do Lago Moraes, Fabiana Leoratti, e Amanda Farage Frade. Ademais, procuramos selecionar citocinas pró e anti-inflamatórias, delimitando àquelas para as quais existem poucos dados, ou não existem dados disponíveis na literatura em relação à malária.

Alguns estudos encontraram associações entre o SNP da IL-6 -174 e o risco de câncer de próstata, colorretal e pulmonar. Já outros estudos verificaram associação deste SNP (presença do alelo polimórfico C em lugar do G) com pior prognóstico no câncer de mama, bexiga e câncer de próstata. Em estudo realizado em 2009 com a

investigação do SNP IL-6 -174, os genótipos GC (heterozigoto) e GG (selvagem) foram associados à redução da mortalidade de pacientes com câncer oral e de hipofaringe. Além disso, os mesmo genótipos foram associados a maior sobrevida no câncer de laringe. É importante salientar que homozigotos GG (genótipo selvagem) apresentaram níveis séricos de IL-6 mais elevados quando comparados aos heterozigotos GC ou aos homozigotos mutados CC, portanto neste caso a presença do alelo polimórfico estaria associada à redução da produção de IL-6, que é uma citocina pró-inflamatória (López et al., 2011). Nestes modelos de neoplasia acima citados, existiu associação entre produção mais elevada de IL-6 que ocorre nos portadores de genótipo selvagem e nos heterozigotos, com melhor prognóstico. Este fato poderia ser devido à produção de uma resposta inflamatória/imune mais eficaz nos indivíduos com o alelo selvagem.

Contrariamente, outros relatos corroboraram que os portadores do alelo G, tanto GG quanto GC na posição - 174 produzem níveis mais elevados de IL-6, porém, neste modelo, as concentrações mais elevadas de IL-6 atuariam como fator predisponente ao desenvolvimento de doença renal terminal em pacientes com câncer. Nestes estudos, os portadores do genótipo CC apresentaram menor frequência de doença renal, portanto nesta situação a presença do polimorfismo foi benéfica (Ryu and Kim, 2012).

Com relação ao SNP IL-6 -174, o presente estudo não encontrou diferenças entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos moradores de área com alta endemicidade para a malária.

A seguir, um polimorfismo do gene da IL-12p40 foi investigado. A IL-12 é uma citocina relacionada à resposta Th1 que desempenha um papel importante tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Estudos em pacientes com brucelose observaram níveis elevados de IL-12p40 em pacientes com infecção ativa em comparação a indivíduos saudáveis. Neste estudo, verificou-se no SNP IL-12p40 posição +1188 que o genótipo CC (homozigoto mutado) foi mais frequente no grupo de

indivíduos saudáveis em relação aos pacientes com infecção ativa, portanto o SNP neste caso atuaria como fator de proteção. Para reforçar este dado, o genótipo AA (selvagem) foi mais frequente em pacientes com infecção ativa em relação aos indivíduos saudáveis. Foi também sugerido que o alelo C estaria associado a uma menor produção de IL-12, que é uma citocina pró-inflamatória, conferindo proteção contra a brucelose muito provavelmente por intermédio do controle do processo inflamatório que seria deletério aos pacientes, caso fosse excessivo (Eskandari-Nasab, 2013).

Outros pesquisadores estudaram polimorfismos de IL-12p40 em pacientes tunisianos com carcinoma da nasofaringe. A comparação foi feita entre indivíduos saudáveis e pacientes com carcinoma. Os pacientes com carcinoma apresentaram frequência mais elevada do alelo C e do genótipo CC em relação aos indivíduos saudáveis, sugerindo que o alelo polimórfico C estaria associado à suscetibilidade ao câncer de nasofaringe. Testes adicionais mostraram que o genótipo homozigoto mutado CC estaria também associado aos estágios avançados do tumor, e estes pacientes apresentariam baixas concentrações de IL-12p40. Sendo assim, no caso do câncer de nasofaringe, a presença do alelo mutado sob forma homozigota estaria associada à maior suscetibilidade, ao pior prognóstico e a menor produção de IL-12p40 (Bem Chaaben Um et al., 2011).

O presente estudo não encontrou diferenças na frequência do SNP IL-12p40 +1188 entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos moradores de área com alta endemicidade para a malária.

Outra das citocinas selecionadas para o presente estudo foi a IL-4. Ramos et al. (2012) estudaram a associação do polimorfismo da IL-4 +33 com a eliminação espontânea do vírus da hepatite C (HCV) em uma população do Rio de Janeiro. Neste estudo, foram comparados pacientes que apresentaram clearance viral espontâneo

após infecção aguda, em relação a pacientes com infecção crônica pelo HCV. As análises mostraram que o alelo C (selvagem) no SNP IL-4 +33 foi mais frequente no grupo com hepatite C aguda em relação aos indivíduos com hepatite crônica. Durante a evolução da hepatite C, o alelo T (mutado) estaria associado à maior expressão do gene da IL-4 (concentrações mais elevadas de IL-4) e à recorrência da infecção após transplante de fígado, além de lesões hepáticas mais graves. A maior produção de IL-4 induzida pelo alelo mutado, sobretudo nos indivíduos homozigotos TT estaria relacionada à redução do clearance viral pela regulação deficiente da resposta Th1, afetando assim o controle da infecção e favorecendo a persistência do processo inflamatório (Ramos et al., 2012).

O presente estudo não encontrou diferenças na frequência do SNP IL-4 +33 entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos moradores de área com alta endemicidade para a malária.

Com relação a IL-10, Tarabar et al. (2013) estudaram a associação do polimorfismo da IL-10 -3575 com a ocorrência de linfoma difuso de grandes células B (linfoma não Hodgkin). Este estudo analisou a associação deste SNP da IL-10 com as características clínicas e evolução dos pacientes com este tipo de linfoma. Neste estudo, considerando que o genótipo selvagem é o TT, foi observada associação entre a presença dos genótipos TA e AA da IL-10 -3575 com a presença de sintomas. Estudos têm demonstrado que variações dos níveis séricos de IL-10 foram associadas ao prognóstico em pacientes com linfoma não-Hodgkin (mais agressivos). No entanto, estudos *in vitro* anteriores sugeriram que o alelo A (mutado) estaria associado à baixa produção de IL-10, e o alelo T (selvagem) à produção mais elevada de IL-10 (Tarabar et al., 2013). Aparentemente, no modelo de linfoma não-Hodgkin, concentrações mais baixas de IL-10 levariam a uma modulação deficiente da resposta inflamatória, sendo deletéria ao organismo.

O gene que codifica a IL-10 constitui um bom gene candidato para o estudo do papel de diferentes SNP presentes em regiões promotoras de genes de citocinas no contexto da malária, uma vez que ela é uma citocina imunoreguladora, exercendo papel central no controle do processo inflamatório, apoptose e manutenção de células T CD4+ (*helper*).

Até a presente data, foram encontrados 13 artigos científicos sobre polimorfismos de IL-10 na literatura, sendo 12 deles em diferentes modelos de doenças, e apenas um em doença infecciosa (hanseníase).

Barnejee et al., (2013) observaram que pessoas expostas ao arsênico se tornaram mais suscetíveis a infecções oportunistas, sugerindo um papel imunomodulador do arsênico. Neste estudo foi demonstrado que o comprometimento das funções de macrófagos e o aumento da morte de células do sistema imunológico por apoptose nos indivíduos expostos ao arsênico contribuíram para o comprometimento do sistema imune. Devido ao fato das citocinas serem mediadores imunes importantes em humanos, Barnejee et al. (2013), resolveram investigar a associação do polimorfismo da IL-10 -3575 com a suscetibilidade ao arsênico em pessoas cronicamente expostas à substância por meio de água potável em Bengala Ocidental, na Índia. Neste estudo, os autores descreveram que o SNP estaria associado ao desenvolvimento de lesões cutâneas induzidas por arsênico, e que a presença do alelo polimórfico A e dos genótipos TA e AA foram mais frequentes em indivíduos expostos com lesões de pele pré-malignas. Também foi verificada a associação do polimorfismo com os níveis de IL-10, sendo que os indivíduos que apresentaram níveis mais baixos da citocina no soro foram àqueles com genótipos TA e AA. Desta forma, Barnejee et al. (2013) concluíram que o SNP IL-10 -3575 poderia contribuir para a formação de lesões de pele pré-malignas em indivíduos expostos ao arsênico, podendo progredir para o câncer de pele.

Moraes et al. (2003), realizaram estudo genético sobre a frequência de cinco polimorfismos na região promotora do gene que codifica a IL -10, nas posições -3575, -2849, -2763, -1082 e -819 em duas populações de indivíduos saudáveis, uma originária da Holanda e a outra do Rio de Janeiro, Brasil. Um total de 321 indivíduos holandeses (caucasianos) e 293 brasileiros, descritos como afro-brasileiros ou euro-brasileiros, foram genotipados utilizando técnicas de PCR-RFLP. As frequências dos genótipos na população brasileira foram diferentes daquelas da população holandesa. No entanto, a comparação das frequências genóticas entre afro-brasileiros e euro-brasileiros não encontrou diferenças. Quando os cinco polimorfismos foram agrupados em haplótipos -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C, sendo que apenas o haplótipo formado pelos três polimorfismos -3575T/-2849G/-2763C mostraram um forte desequilíbrio de ligação. Foram encontradas oito combinações de haplótipos considerando as três posições -3575/-2849/-2763 em brasileiros, mas apenas sete delas na população holandesa, isto é todas com exceção da TAC, ou seja -3575T/-2849A/-2763C. Ademais, as frequências dos haplótipos foram significativamente diferentes entre brasileiros (afro e euro combinados) e holandeses, e também entre euro-brasileiros e holandeses (todos caucasianos). O haplótipo -3575T/-2849G/-2763C (TGC) foi o mais frequente, enquanto o haplótipo AAA foi muito menos representado na população brasileira em relação a população holandesa. O haplótipo TAC, descrito anteriormente em afro-americanos, foi observado apenas em indivíduos brasileiros, curiosamente, quase que exclusivamente entre aqueles de origem europeia. Os resultados do estudo de Moraes et al. (2003) indicam que a população brasileira apresenta uma mistura genética de alelos africanos, europeus e ameríndios, e estes dados podem servir de base para estudos clínicos e imunológicos brasileiros envolvendo a IL-10.

Em outro estudo feito por Moraes et al. (2004), foram analisadas as frequências dos mesmos cinco polimorfismos da região promotora do gene da IL-10 (-3575, -2849, 2763,

-1082 e -819), e se poderiam atuar como marcadores de suscetibilidade ou de gravidade na hanseníase. Foram analisados indivíduos saudáveis em comparação a pacientes com hanseníase, com relação ao tipo de infecção (multibacilar ou paucibacilar), e à gravidade da hanseníase (infecção grave versus leve). Foram encontradas diferenças significantes entre pacientes do grupo controle e indivíduos com hanseníase em relação a três SNP (-3575, -2849 e -2763. O haplótipo -3575A/-2849G/-2763C (AGC) foi associado à resistência na hanseníase (haplótipo protetor), e paradoxalmente ao desenvolvimento de forma graves da doença, utilizando um modelo binomial ou ordinal. Já o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C (TGC) estaria associado à suscetibilidade, mas não à gravidade da hanseníase (Moraes et al. 2003).

No presente estudo foi encontrada frequência mais elevada do alelo selvagem T e dos genótipos TT e TA nos indivíduos assintomáticos em relação aos sintomáticos, sugerindo um possível papel protetor do alelo selvagem, corroborando os achados de estudos em pacientes com linfoma (Tarabar et al., 2013). Nos pacientes assintomáticos com o alelo selvagem (T), poderia ocorrer modulação (contenção) do processo inflamatório, sendo este efeito benéfico ao indivíduo infectado. No entanto, esta hipótese teria que ser comprovada por estudos nos quais houvesse análise simultânea dos genótipos e alelos, além de análise de outros polimorfismos de IL-10 formando haplótipos, associando essas análises genéticas à mensuração da IL-10 em soro ou plasma dos indivíduos infectados, sintomáticos e assintomáticos.

Com relação ao TGF β 1, tanto a baixa como a alta expressão desta proteína pode causar alterações no trato respiratório. Faria et al., (2009) verificaram a associação entre o polimorfismo do gene do TGF- β 1 +869 em pacientes com fibrose cística (FC) e doença pulmonar em relação a indivíduos saudáveis. Considerando que o genótipo TT é o selvagem, em relação à distribuição genotípica do SNP do TGF- β 1 +869 foi

encontrada associação, nos indivíduos com fibrose cística, do genótipo heterozigoto TC com quadros pulmonares mais leves.

Em estudo realizado por Frade et al. (2011) foram investigados polimorfismos do gene do TGF β 1 nas posições -509 C $\rightarrow$ T e +869 T $\rightarrow$ C em pacientes com leishmaniose visceral (LV) em comparação a indivíduos com infecção assintomática, porém com teste de hipersensibilidade tardia (DTH+) positivo, e em indivíduos controle saudáveis com DTH-. Na análise alélica do polimorfismo de TGF β 1 -509, o alelo T (polimórfico) foi encontrado em 41% dos indivíduos com LV, 49% no grupo assintomático com DTH+, e 37% dos indivíduos controle saudáveis DTH-. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando os indivíduos DTH+ foram comparados aos DTH-, assim como quando se fez a análise estatística agrupando os indivíduos LV e DTH+ versus DTH-. Neste caso, o alelo polimórfico T atuaria como fator de suscetibilidade à infecção. Com relação à distribuição genotípica, a frequência do genótipo -509 CC (selvagem) foi de 32%, 29% e 46% para os grupos com LV, DTH+ e DTH-, respectivamente; o genótipo CT foi encontrado em 54%, 44% e 42%; e finalmente o genótipo TT (homozigoto mutado) esteve presente em 14%, 27% e 12% dos indivíduos desses mesmos grupos. Foi encontrada maior frequência de indivíduos TGF β 1 -509 CC (genótipo selvagem) entre os indivíduos saudáveis, confirmando o achado de que o alelo mutado atuaria como fator predisponente e o selvagem como fator de proteção.

Nos indivíduos portadores dos genótipos contendo o alelo polimórfico T, isto é, CT e TT, foi descrita produção elevada de TGF β 1, tendo sido encontrada diferença estatisticamente significante entre os pacientes com LV (CT + TT) e o grupo controle DTH- (CT + TT). Essa mesma diferença foi observada quando os casos DTH+ (CT + TT) foram comparados aos controles DTH- (CT + TT). Quando os indivíduos com genótipos TT+TC dos grupos LV e DTH+ foram comparados aos TT+TC do grupo DTH- a significância estatística foi ainda maior. Sendo assim, no estudo de Frade et al.,

(2011) houve associação entre a presença do alelo polimórfico T e as formas sintomáticas de leishmaniose visceral e ainda à elevada produção de TGF β 1, interferindo negativamente na modulação da resposta inflamatória.

No mesmo estudo de Frade et al. (2011), o polimorfismo de TGF β 1 +869 T $\rightarrow$ C foi analisado nos indivíduos com LV: sintomáticos, assintomáticos com DTH + e indivíduos controle saudáveis com DTH -. O alelo C (polimórfico) foi encontrado em 50% dos indivíduos com LV, 52% dos assintomáticos com DTH+, e 48% dos indivíduos controle saudáveis DTH-. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando os grupos foram comparados dois a dois, ou em associação.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças nas frequências genotípicas e alélicas dos indivíduos com malária sintomática e assintomática em relação ao SNP TGF β 1 +869 T $\rightarrow$ C, corroborando os achados de Frade et al. (2011) no contexto da leishmaniose.

Polimorfismos nos genes que codificam receptores TLR e nos genes que codificam citocinas têm sido implicados na patogênese e no controle da carga parasitária em indivíduos com malária, notadamente nas infecções causadas por *Plasmodium falciparum* (Leoratti et al., 2011).

Luty et al., (2000) estudaram 100 crianças com malária no Gabão e compararam este grupo com outro formado por igual número de crianças sem malária (estudo caso-controle com emparelhamento feito por idade e gênero). Os resultados do estudo indicaram que apenas nas formas graves de malária por *P. falciparum* havia produção aumentada de TNF- α e IL-10, associada a níveis reduzidos de IL-12. Desta forma, os níveis de IL-12 foram inversamente relacionados à gravidade da malária humana e murina.

Boutlis et al. (2003) estudaram dois polimorfismos no gene que codifica a subunidade IL-12p40 que têm sido associados com a susceptibilidade à malária cerebral em seres

humanos, além de produção reduzida de óxido nítrico (NO). Na tentativa de aprofundar a compreensão das relações entre IL-12, NO e NO sintetase (NOS), parasitemia e polimorfismos da IL-12p40, os níveis plasmáticos destas substâncias foram avaliados em células mononucleares do sangue periférico de 424 indivíduos da Papua Nova Guiné, todos moradores de área com intensa transmissão de malária, porém apresentando quadro de tolerância à malária devido ao fato de já terem apresentado inúmeros episódios infecciosos. Os resultados deste estudo corroboraram que os níveis de IL-12 eram, de fato, inversamente proporcionais à parasitemia nos casos de malária por *P. falciparum*, e esta associação foi muito forte ($p < 0,001$). Os dados encontrados foram consistentes com a existência de um efeito supressor da parasitemia sobre a produção de IL-12. Este mesmo efeito já havia sido anteriormente demonstrado in vitro em modelos murinos de malária. Ademais, os níveis de IL-12 foram inversamente proporcionais à atividade da NOS ($p = 0,007$). Esta última associação reflete, muito provavelmente, uma regulação adicional da produção de IL-12 induzida pela elevada expressão da NOS que culminaria com a produção aumentada de NO em monócitos do sangue periférico desses indivíduos. Tanto o nível de IL-12, quanto à atividade da NOS não foram associados a qualquer um dos dois polimorfismos de IL-12p40 estudados (pro e 3'-UTR).

Níveis sanguíneos de citocinas e de auto-anticorpos parecem desempenhar papel relevante dentre os mecanismos de indução de anemia na malária. Fernandes et al. (2008) avaliaram o grau de anemia e as concentrações plasmáticas de citocinas tais como o TNF- α , IFN- γ , IL-12, fator de inibição de migração (MIF), e IL-10, além da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) em indivíduos com malária, moradores da Amazônia Legal brasileira. A presença de anticorpos dirigidos contra componentes normais da membrana de eritrócitos e cardiolipina também foram estudadas. Nenhuma diferença foi observada na frequência de anemia entre pacientes infectados por

Plasmodium vivax e os infectados por *Plasmodium falciparum*, e não houve nenhuma associação entre os níveis de parasitemia e a presença de anemia em pacientes com *P. vivax* e *P. falciparum*. No entanto, aumentos significativos de TNF- α , IFN- γ , MIF, e MCP-1 foram observados em pacientes com *P. falciparum* e *P. vivax*, enquanto que as concentrações de IL-10 encontravam-se aumentadas apenas em pacientes com infecção por *P. vivax*. Concentrações mais elevadas de IL-12 e IL-10 foram observadas em pacientes com malária e anemia por *P. falciparum*, enquanto que para o TNF- α este perfil foi observado nos indivíduos sem anemia. Pacientes infectados por *P. falciparum* ou por *P. vivax* que apresentaram IgM ou IgG e IgM anti-*Plasmodium* positivos, tiveram níveis mais baixos de hemoglobina. Não foram encontradas associações entre a presença de auto-anticorpos (anti-eritrócitos e anti-cardiolipina) e a presença ou intensidade da anemia. Os dados desse estudo brasileiro sugerem que em áreas de baixa endemicidade e transmissão instável de malária, infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* apresentam características semelhantes em termos de indução de anemia e produção de citocinas.

Bueno et al. (2010) estudaram pacientes com infecção aguda causada *P. vivax* e demonstraram que os indivíduos apresentavam aumento significativo de células T reguladoras (Treg) circulantes associadas a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias tais como INF- γ e IL-17, e anti-inflamatórias tais como o TGF- β e a IL-10 e estes efeitos foram relacionados ao nível de parasitemia. Os autores concluíram que a malária causada por *P. vivax* levou a um aumento do número de células Treg e esta ativação foi desencadeada pela carga parasitária, contribuindo para a modulação da resposta imune na malária por *P. vivax*.

Basu et al. (2010) investigaram 14 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados nos genes que codificam o TLR2, TLR4 e TLR9, além de SNP no genes que codificam o TNF- α e a linfotoxina- α (LTA). Foram encontradas associações bastante

significativas entre a carga parasitária em sangue e SNP não sinônimos do TLR4, além de associações com SNP da região promotora do gene do TNF- α em pacientes com malária na Índia. Os mesmos autores (Basu et al., 2012) estenderam o estudo investigando em 293 pacientes indianos com malária branda por *P. falciparum*, dentre outros parâmetros, a associação entre a carga parasitária e SNP da IL12p40 (IL12B). IL12 é composta por uma subunidade de 35 kDa codificada por IL-12A, também chamada de p35 e outra subunidade de 40 kDa codificada por IL-12B (p40). Polimorfismos em genes que codificam ambas as subunidades têm sido relatados em inúmeras alterações do sistema imune, doenças inflamatórias e infecciosas, incluindo a malária.

A região cromossômica 5q31-q33 foi ligada à parasitemia causada por *P. falciparum* em vários estudos independentes. Esta região cromossômica contém vários genes que participam da regulação do sistema imune tais como o gene que codifica a subunidade da IL12 denominada B ou p40 (Basu et al., 2012).

IL-12 é uma citocina heterodimérica e pleitrópica, com ação pró-inflamatória, atuando como uma molécula reguladora do sistema imune, além de constituir potente fator de crescimento hematopoético. É produzida por fagócitos e células dendríticas em resposta a estímulos desencadeados por patógenos, com a intermediação de receptores TLR além de outros receptores extracelulares. Fisiologicamente, as células-alvo mais importantes da IL-12 são as células progenitoras hematopoéticas, células NK e células T. Esta citocina é capaz de estimular a produção de citocinas Th1 (por exemplo, IFN γ), e juntamente com o IFN γ , a IL-12 vai atuar sobre uma população de células Th1 relacionada diretamente à produção de imunoglobulinas por linfócitos B (Eskandari-Nasab et al., 2013).

Os resultados encontrados no estudo de Basu et al. (2012) revelaram que, no caso do SNP IL-12p40 +1188, em indivíduos portadores do genótipo selvagem AA as cargas

parasitárias foram mais elevadas que nos heterozigotos AC, que por sua vez foram mais elevadas em relação aos portadores do genótipo homozigoto mutado CC, muito raro. Além disso, no caso do SNP IL-12p40 +1188, os portadores dos genótipos AA (selvagem) e AC (heterozigoto) apresentaram expressão reduzida da IL-12p40 em relação àqueles raros indivíduos com genótipo CC. Apesar do intenso polimorfismo encontrado no locus do SNP IL-12p40 +1188, as frequências encontradas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No presente estudo houve predominância dos genótipos AA (selvagem) do SNP IL-12p40 +1188 nos indivíduos com parasitemia indetectável pela gota espessa, que foram diagnosticados por PCR, em relação aos que apresentavam gota espessa positiva (parasitemias baixas, moderadas e intensas). Neste último grupo encontramos mais portadores de genótipo AC e CC em relação ao grupo com parasitemia indetectável. Estes resultados contrariam àqueles descritos por Basu et al., (2012) que descreveram as maiores parasitemias nos indivíduos com genótipos AA (selvagem) e AC (heterozigoto) em relação a CC (homozigoto polimórfico). No entanto, Basu et al. (2012) analisaram a carga parasitária por Real Time PCR, técnica mais moderna e mais sensível que a semi-nested PCR utilizada no presente estudo, além de ser quantitativa. No presente estudo optamos pela classificação dos sujeitos de pesquisa de acordo com o teste da gota espessa, que infelizmente é menos sensível e mais subjetivo, porém trata-se do teste de referência nas regiões endêmicas brasileiras. Ademais, no trabalho de Basu et al. (2012), foi analisada a expressão da subunidade p40 da IL-12 nos mesmos indivíduos, tendo sido encontrada associação entre as parasitemias elevadas e a baixa expressão da IL-12. No presente estudo, além de termos encontrado mais indivíduos com genótipo AA entre àqueles com parasitemia indetectável pela gota espessa, nós não realizamos a avaliação dos níveis de IL-12p40 circulantes nos pacientes.

Outro aspecto que merece ser comentado é o momento de avaliação dos sujeitos de pesquisa. A literatura tem apontado que a parasitemia elevada induz uma reação inflamatória/imune mais potente com produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-1, IL-6, TNF- α , INF γ , e outras citocinas anti-inflamatórias tais como a IL-10 que vão atuar na modulação da resposta imune (Luty et al., 2000; Boutlis et al. 2003; Fernandes et al., 2008; Bueno et al., 2010). Neste contexto, isto é, em indivíduos com elevada parasitemia, seriam encontrados elevados níveis de IL-1, IL-6, TNF- α , INF γ , e de IL-10, porém baixos níveis de IL-12p40. A resultante desta situação seria o combate à intensa parasitemia, com subsequente queda da mesma. Nos sujeitos de pesquisa do presente estudo, caso a gota espessa tenha sido realizada em etapa posterior àquela do início da reação inflamatória/imune (fase aguda da infecção), poder-se-ia encontrar baixas parasitemias, como foi o caso, exatamente nos indivíduos que combateram a parasitemia de forma mais eficaz durante a fase aguda do processo (genótipo AA). Nestes indivíduos, seria fundamental avaliar o resultado da gota espessa em relação ao dado do início dos sintomas, com a finalidade de interpretar os resultados encontrados.

No presente estudo, no momento de estudar os SNP em relação às parasitemias, optamos pela alocação de todos os sujeitos de pesquisa de acordo com o resultado da gota espessa e não dos sintomas, muito embora fosse intuitivo imaginar que indivíduos assintomáticos deveriam, em sua maioria, corresponder àqueles com parasitemia indetectável pela gota espessa. Porém, tendo em vista que tivemos 80 indivíduos no grupo com parasitemia indetectável pela gota espessa e os indivíduos assintomáticos eram 37, nota-se que havia contingente não desprezível de indivíduos sintomáticos com parasitemia indetectável pela gota espessa (n=43), que foram diagnosticados por semi-nested PCR. Poderíamos imaginar que nestes indivíduos sintomáticos com parasitemia não detectável a avaliação do parâmetro (parasitemia) poderia ter sido realizada em

etapa posterior àquela da fase aguda da infecção, resultando em parasitemias indetectáveis pela gota espessa pelo fato do processo inflamatório/imune já ter atuado de forma eficaz para reduzir a parasitemia. Sendo assim, em estudos prospectivos será fundamental saber quando ocorreu o início dos sintomas em cada um dos sujeitos de pesquisa, e analisar este dado em relação à data da realização do teste da gota espessa.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- 1) No presente estudo, as cinco PCR-RFLP para a detecção de polimorfismos genéticos da IL-6 (-174), IL-12p40 (+1188), IL-4 (+33), IL-10 (-3575) e TGF- β 1 (+869) foram padronizadas com sucesso.
- 2) Considerando os cinco polimorfismos analisados, apenas no SNP IL-10 -3575 T→A foram encontradas frequências mais elevadas do alelo selvagem T e dos genótipos TT e TA nos indivíduos assintomáticos em relação aos sintomáticos.
- 3) Em relação ao SNP da IL-12p40 +1188, foi observada frequência mais elevada do genótipo selvagem AA entre aqueles com parasitemia indetectável pela gota espessa, em relação aos indivíduos com parasitemia baixa/ moderada/ intensa.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*. 2011;17;365(20):1863-75.

Afridi S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, Rihet P. Malaria resistance genes are associated with the levels of IgG subclasses directed against *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in Burkina Faso. *Malar J*. [Internet] 2012 Sep 4 [cited 2013 Aug 29]; 11: Article 308 [15 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-11-308.pdf>

Aidoo M, McElroy PD, Kolczak MS, Terlouw DJ, ter Kuile, FO, Nahlen B, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. *Genet Epidemiol* 2001;21(3):201-11.

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

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;66(6):641-8.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. [Internet] 2010 Jan 13 [cited 2013 Aug 29]; 9: Article 13 [8 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-9-13.pdf>

Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis*. 2007; 195(4):589-96.

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

Araujo CF, Lacerda MVG, Abdalla DSP, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(6):517-21.

Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, et al. Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 2003;171:5396-5405.

Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun.* 2012;80(10):3343-59.

Banerjee N, Nandy S, Kearns JK, Bandyopadhyay AK, Das JK, Majumder P, et al. Polymorphisms in the TNF- α and IL10 gene promoters and risk of arsenic-induced skin lesions and other nondermatological health effects. *Toxicol Sci.* 2011;121(1): 132-9.

Basu M, Das T, Ghosh A, Majumder S, Maji AK, Kanjilal SD, Mukhopadhyay I, et al. Gene-gene interaction and functional impact of polymorphisms on innate immune genes in controlling *Plasmodium falciparum* blood infection level. *PLoS One.* [Internet] 2012 Oct 12 [cited 2013 Aug 29]; 7(10) Article e46441 [18 p.]. Available from:

<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0046441&representation=PDF>

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- α polymorphisms with *Plasmodium falciparum* blood infection levels. *Infect Genet Evol.* 2010;10(5): 686-96.

Ben Chaaben A, Busson M, Douik H, Boukouaci W, Mamoghli T, Chaouch L, et al. Association of IL-12p40 +1188 A/C polymorphism with nasopharyngeal cancer risk and tumor extension. *Tissue Antigens.* 2011;78(2):148-51.

Bruce-Chwatt LJ. *Essential malariology*. 2. ed. London: William Heiseman Medical Books, 1985. 452 p.

Bruce M, Day KP. Cross-species regulation of *Plasmodium* parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends Parasitol.* 2003;19(6):271-77.

Besehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of IL-4 variants in ethnically diverse populations: Association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;114(1):80-87.

Black CG, Barnwell JW, Huber CS, Galinski MR, Coppel RL. The *Plasmodium vivax* homologues of merozoite surface proteins 4 and 5 from *Plasmodium falciparum* are

expressed at different locations in the merozoite. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120 (2):215-24.

Boutlis CS, Riley EM, Anstey NM, de Souza JB. Glycosylphosphatidylinositols in malaria pathogenesis and immunity: potential for therapeutic inhibition and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;297:145-85.

Buruiana FE, Solà I, Alonso-Coello P. Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; Issue 11: Art. No. CD005109.

Carlton JM, Aadams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008;455(7214):757-63.

Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandil PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis.* 2010; 202(4):638-47.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors *Immunology : Cell.* 1975;72(9):3666-70.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Malaria Biology. [cited 2013 Aug 28]. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

Chang KH & Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol.* 2004;34:1501-16.

Clark IA, Chaudhri G. Tumor necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br. J. Haematol.* 1988;70(1):99-103.

Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* [Internet] 2006 Oct 10 [cited 2013 Aug 29]; 5: Article 85 [32 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-5-85.pdf>

Clark IA, Alleva LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther.* 2010;128(3):519-48.

Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Nouredine MA, Bell DA. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutation Research*. 2008;659:147-57.

Coutelier JP, Van Broeck J, Wolf SF. Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. *J. Virol*. 1995;69(3):1955-58.

De Nardin E. Genetic polymorphisms and immune responses. *Immunological Investigations*. 2009;38(3-4):198-202.

Domingo-Domènech E, Benavente Y, González-Barca E, Montalban C, Gumà J, Bosch R, et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica*. 2007;92(11):1475-81.

Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis Dd, Gollob KJ. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:208-18.

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*. [Internet] 2010 May 8 [cited 2013 Aug 29]; 9: Article 119 [10 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-9-119.pdf>

Eskandari-Nasab E, Moghadampour M, Asadi-Saghandi A, Kharazi-Nejad E, Rezaeifar A, Pourmasoumi H. Levels of Interleukin-(IL)-12p40 are Markedly Increased in Brucellosis Among Patients with Specific IL-12B Genotypes. *Scand J Immunol*. 2013;78(1):85-91.

Falvo JV, Ugliarolo AM, Brinkman BM, Merika M, Parekh BS, Tsai EY, et al. Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. *Mol Cell Biol*. 2000;20(6):2239-47.

Faria EJ, Faria IC, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS. Association of MBL2, TGF-beta1 and CD14 gene polymorphisms with lung disease severity in cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2009;35(4):334-42.

Ferreira MU, Liu Q, Zhou M, Kimura M, Kaneko O, Thien HV, Isomura S, Tanabe K, Kawamoto, F. Stable Patterns of Allelic Diversity at the Merozoite Surface Protein-1 Locus of *Plasmodium falciparum* in Clinical Isolates from Southern Vietnam. *J. Eukaryot. Microbiol*. 1998;45:131-136.

Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;44(1):125-32.

Frade AF, Oliveira LC, Costa DL, Costa CH, Aquino D, Van Weyenbergh J, et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Genet Evol.* 2011;11(5):912-6.

Flint J, Hill AV, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW, et al. High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature.* 1986; 321(6072):744-50.

Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, Lauw F, Ropert C, Oliveira RB de, et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 ;106(14):5789-94.

Garcia A, Marquet S, Bucheton B, Hillaire D, Cot M, Fievet N, et al. Linkage Analysis of blood *Plasmodium falciparum* levels: interest of the 5q31-33 chromosome region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998;58(6):705-09.

Gantt, K.R. Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T, Goldaman, T.L., Recker, T.J., Millher, M.A., Wilson, M.E., 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol.* 170,2613-20

Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine.* 2008;5(6):127.

Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Della Ragione F, et al. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha genes. *Clin Chem.* 2003;49(10):1664-7.

Grau GE, Lambert PH, Vassalli P, Piguet PF. Tumor necrosis factor (TNF) and pathology; its relationships with other cytokines. *Schweiz Med Wochenschr.* 1989; 119(49):1756-61.

Greenwood B, Marsh K, Snow R. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today.* 1991;7(10):277-81.

Gregersen PK, Olsson LM. Recent Advances in the Genetics of Autoimmune Disease. *Annual Review of Immunology.* 2009;27:363-91.

Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, Mendonça EG, Oliveira MGA, Siqueira-Batista R. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. Rev Bras Ter Intensiva. 2011;23(3):358-69.

Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. PLoS Negl Trop Dis. [Internet] 2010 Aug 3 [cited 2013 Aug 29]; 4(8): Article e774 [11 p.]. Available from: <http://www.plosntds.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000774&representation=PDF>

Gyan BA, Goka B, Cvetkovic JT, Kurtzhals JL, Adabayerl V, Perlmann H, et al. Allelic polymorphisms in the repeat and promoter regions of the interleukin-4 gene and malaria severity in Ghanaian children. Clin. Exp. Immunol. 2004;138:145-50.

Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. Hum Immunol. 2001;62(11):1191-9.

Haldar K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;1:87-93.

Haldane JBS. The rate of mutations of human genes. Proceedings of the Eighth International Congress of Genetics and Heredity. Hereditas. 1948;35:267-73.

Hemmer CJ, Holst FGE, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or ovale than in *Plasmodium falciparum* malaria. Trop Med Int Health. 2006;11(6):817-23.

Hermesen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, van Deuren M, Van der Meer JW, et al. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. Clin. Exp. Immunol. 2003;132(3):467-72.

Huebinger RM, Rivera-Chavez F, Chang L-Y, Liu M-M, Minei JP, Purdue GF, et al. IL-10 polymorphism associated with decreased risk for mortality after burn injury. J Surg Res. 2010;164(1):141-5.

Hunt N, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. Trends Immunol. 2003;24:491- 99.

Karunaweera N, Wanasekara D, Chandrasekharan V, Mendis K, Carter R. *Plasmodium vivax*: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation.

Malar J. [Internet] 2007 May 22 [cited 2013 Aug 29]; 6: Article 62 [14 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-6-62.pdf>

Kim J-R, Imwong M, Nandy A, Chotivanich K, Nontprasert A, Tonomsing N, et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata, India. Malar J. [Internet] 2006 Aug 14 [cited 2013 Aug 29]; 5: Article 71 [10 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-5-71.pdf>

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the Four Species of Human Malaria Parasites by Nested PCR that Targets Variant Sequences in the Small Subunit rRNA Gene. Parasitol. Int. 1997;46:91-95

King IL, Segal BM. Cutting edge: IL-12 induces CD4⁺ CD25⁺ T-cell activation in the presence of T regulatory cells. J. Immunol. 2005;175(2):641–45.

Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. Int J Parasitol. 2004;34(13-14):1517-28.

Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, et al. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. Lancet. 1998;351:1768-72.

Kubistova S, Mrazek F, Petrek M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic. 2009;153:93-102.

Kuesap J, Hirayama K, Kikuchi M, Ruangweerayut R, Na-Bangchang K. Study on association between genetic polymorphisms of haem oxygenase-1, tumour necrosis factor, cadmium exposure and malaria pathogenicity and severity. Malar J. 2010; 9:260.

Kwiatkowski D. Malarial toxins and regulation of parasite density. Parasitol. Today. 1995;11(6):206-12.

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. [Internet] 2012 Jan 9 [cited 2013 Aug 29]; 11: Article 12 [18 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-11-12.pdf>

Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-pascual C, Langhorne J, Roberts DJ, et al. Malarial anemia : of mice and men Review in translational hematology Malarial anemia : of mice and men. *Blood*. 2011;110:18-28.

Leichtle A, Hernandez M, Lee J, Pak K, Webster NJ, Wollenberg B, et al. The role of DNA sensing and innate immune receptor TLR9 in otitis media. *Innate Immun*. 2012;8(1):3-13.

Leoratti FM, 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;198(5):772-80.

Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M. Serum levels of the proinflammatory interleukin- 1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in malaria children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infection & Immunity*. 2004;72(10):5630-37.

Machado P, Mendes C, Rosário VE, Arez AP. The contribution of human erythrocyte polymorphisms in the protection against malaria. Review Article *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010;1(4):85-96

Maitland K, Williams TN, Newbold CI. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: biological interactions and the possibility of cross-species immunity. *Parasitol. Today*. 1997;13(6):227-31.

Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet*. 2005;118(2):295-300.

Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Friedhoff LR, Schou C, Beaty TH. Total serum IgE levels and chromosome 5q. *Clin. Exp. Immunol*. 1995;25(S2):79-83.

May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kremsner PG. HLA-DQB1* 0501-Restricted Th1 type immune responses to *Plasmodium falciparum* liver stage antigen 1 protect against malaria anemia and reinfections. *J. Infect. Dis*. 2001;183(1):168-72.

Miller LH, Carter R. A review. Innate Resistance in Malaria. *Exp. Parasitol*. 1976;40(1):132-46.

Mizoguchi A, Baham AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol*. 2006;176(2):705-10.

Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics*. 2003;54(12):896-9.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun*. 2004;5(7):592-5.

Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science (New York, N.Y.)*. 1990;248(4960):1230-4.

Moon SU, Kim HH, Kim TS, Choi KM, Oh CM, Ahn YJ, et al. Blocking effect of a monoclonal antibody against recombinant Pvs25 on sporozoite development in *Anopheles sinensis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(8):1183-7.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Kochar DK, Alonso PL, Del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(9):555-66.

Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, et al. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J. Virol*. 2000;74(12):5452-59.

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;340(6):492-8.

Nkoghe D, Akue JP, Gonzalez JP, Leroy EM. Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic rural Gabonese populations. *Malar J*. [Internet] 2011 Feb 9 [cited 2013 Aug 29]; 10(1): Article 33 [4 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-10-33.pdf>

Novelli F, Casanova JL. The role of IL-12, IL-23 and IFN gamma in immunity to viruses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(5):367-77.

Oliveira LC, Ramasawmy R, Borges JD, Marin MLC, Muller NG, Kalil J, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil. *Einstein*. 2011;9(3):359-66.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria J*. [Internet] 2010 Apr 30 [cited 2013 Aug 29];

9: Article 115 [15 p.]. Available from:
<http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-9-115.pdf>

Ong'echa JM, Raballah EO, Kempaiah PM, Anyona SB, Were T, Davenport GC, et al. Polymorphic variability in the 3' untranslated region (UTR) of IL12B is associated with susceptibility to severe anaemia in Kenyan children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. BMC Genet. 2011;6:12-69.

Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. J. Infect. Dis. 1999;179(1):279-282.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of IL- 10 Family Cytokines in Inflammation and Diseases. Annu Rev Immunol. 2011; 29:71-109.

Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-K signaling in macrophages. Crit Ver Eukaryot Gene Expr. 2010;20(2):87-103.

Parra B, Hinton DR, Lin MT, Cua DJ, Stohlman SA. Kinetics of cytokine mRNA expression in the central nervous system following lethal and non lethal coronavirus-induced acute encephalomyelitis. Virology. 1997;233(2):26070.

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 USA. 2007;104 (6):1919-24.

Pasvol G, Weatherall DJ & Wilson RJ. The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Br J Haematol. 1980;45:285-95.

Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz, Herczynska M. The - 590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. 2005;26(1):48-51.

Perlmann P, Bjökman A. Malaria Research: Host-parasite Interactions and New Developments in Chemotherapy, Immunology and Vaccinology. Curr. Opin. Infect. Dis. 2000;13(5):431-43.

Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW. No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. Eur J Immunol. 1993;23(11):3050-3.

Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, Ramos AL, Cabello PH, Urményi TP et al. Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. BMC Res Notes. [Internet] 2012 Sep 17 [cited 2013 Aug 29]; 5: Article 508 [6 p.]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-5-508.pdf>

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. [Internet] 2010 Oct 29 [cited 2013 Aug 29]; 9: Article 302 [9 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-9-302.pdf>

Rao A, Kumar MK, Joseph T, Bulusu G. Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. Malar J. [Internet] 2010 Jun 9 [cited 2013 Aug 29]; 9: Article 155 [7 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-9-155.pdf>

Richards JS, Beenson JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. Immunol Cell Biol. 2009;87(5):377-90.

Ritchie TL. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate hosts. Parasitology. 1998;96(Pt 3):607-39.

Rihet P, Traoré Y, Abel L, Aucan C, Traoré-Leroux T, Fumoux, F. malaria in human: *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. Am. J. Hum. Genet. 1998;63(2):498-505.

Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. Lancet Oncol. 2006;7(1):27-38.

Ryu JH, Kim SJ. Interleukin -6 -634 C/G and -174 G/C polymorphisms in Korean patients undergoing hemodialysis. Korean J Intern Med. 2012;27(3):327-37.

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

Scragg I, Hensmann M, Bate C, Kwiatkowski D. Early cytokine induction by *Plasmodium falciparum* is not a classical endotoxin-like process. Eur. J. Immunol. 1999;29(8):2636-2644.

Sohail M, Kaul A, Bali P, Raziuddin M, Singh MP, Singh OP, et al. Alleles -308A and -1031C in the TNF-alpha gene promoter do not increase the risk but associated with

circulating levels of TNF-alpha and clinical features of vivax malaria in Indian patients. *Mol. Immunol.* 2008;45(6):1682-92.

Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of *falciparum* malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J.* [Internet] 2008 Jan 14 [cited 2013 Aug 29]; 7: Article 13 [11 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-7-13.pdf>

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993;61:315–20.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Rev. Immunol.* 2004; 4(3):169-80.

Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N. Engl. J. MED.* 1997;336(2):86-91.

Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol. Rev.* 2004; 201:268-90.

Sun FB, Zhang DL, Zheng HM, Song B. Association of interleukin-10 gene polymorphism with cachexia in patients with gastric cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2010;32(11):845-49

Suzuki I, Hizawa N, Yamaguchi E, Kawakami Y. Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels. *Clin. Exp. Allergy.* 2000;30(12):1746-49.

Tang TH, Salas A, Ali-Tammam M, Martínez Mdel C, Lanza M, Arroyo E, et al. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malaria J.* [Internet] 2010 Jul 27 [cited 2013 Aug 29]; 9: Article 219 [6 p.]. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-9-219.pdf>

Tarabar O, Cikota-Aleksić B, Tukić L, Milanović N, Aleksić A, Magić Z. Association of interleukin-10, tumor necrosis factor-α and transforming growth factor-β gene polymorphisms with the outcome of diffuse large B-cell lymphomas. *Int J Clin Oncol.* 2013. [Epub ahead of print]. Available from: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10147-013-0531-z.pdf>

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. [Internet] 2008 Jun 17 [cited 2013 Aug 29]; 5(6): Article e128 [10 p.]. Available from: <http://www.plosmedicine.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0050128&representation=PDF>

Torre D, Speranza F, Martegani R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. Lancet Infect. Dis. 2002;2(12):719-20.

Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. 2003;3:133–46.

Tsai EY, Falvo JV, Tsytsykova a V, Barczak a K, Reimold a M, Glimcher LH, et al. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. Mol Cell Biol. 2000;20(16):6084-94.

Tujera R. Malaria – an overview. FEBS J. 2007;274(18):4670-79.

Van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and homeostasis leading to microcirculatory dysfunction. Trends Parasitol. 2006;22(11):503-08.

Verra F, Luoni G, Calissano C, Troye-Blomberg M, Perimann P, Permann H, et al. IL-4 -589 C/T polymorphism and IgE levels in severe malaria. Acta Trop. 2004;90(2):205-09.

Wassmer SC, de Souza JB, Frère C, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. J Immunol. 2006;176(2):1180-84.

Wipasa J, Elliot S, Xu H, Good MF. Immunity to Asexual Blood Stage Malaria and Vaccine Approaches Immunol. Cell Biol. 2002;80(5):401-14.

World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2009. Geneva: World Health Organization, 2009. 78p. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf

World Health Organization (WHO). Who Global Malaria Programme. World malaria report: 2010. Geneva: World Health Organization, 2010. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf

World Malaria Report – WHO - 2008. www.who.int/malaria.

Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. J Immunol. 2010;184(8):4338-48.

Yeo TW, Lampah D a, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, Kenangalem E, et al. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. J Infect Dis. 2010;202(1):109-12.

Zedan MM, El-Chennawi FA, Fouda AE. Interleukin-12 and peripheral blood invariant natural killer T cells as an axis in childhood asthma pathogenesis. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2010;9(1):43-8.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Preparo de Soluções

TAE 50 X concentrado (1 litro)

Pesar 242g de Tris base + 57,1 mL de ácido acético glacial + 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0). Completar para 1 litro com H₂O mili-Q. Autoclavar e guardar em geladeira.

EDTA (solução estoque 0,5 M; pH 8,0)

Pesar 186,1g de EDTA em pó. Dissolver em 800 mL de H₂O mili-Q e deixar agitando. Acertar o pH com NaOH concentrado (10 N), gota a gota, até atingir pH 8,0. Quando atingir o pH 8,0 a solução ficará límpida. Completar o volume para 1 litro com H₂O mili-Q. Aliquotar e autoclavar. Guardar em geladeira.

Preparo do marcador de peso molecular

Marcador de peso molecular	100 µL
<i>Loading dye solution</i> (6X concentrada).....	100 µL
Água deionizada ou tampão TE	100 µL

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética - CAPPesq **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/10/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0633/10**, intitulado: **"POLIMORFISMOS DE CITOCINAS EM PACIENTES BRASILEIROS COM AS FORMAS SINTOMÁTICA E ASSINTOMÁTICA DE MALÁRIA POR P. FALCIPARUM "** apresentado pelo Departamento de **MEDICINA TROPICAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Thelma Suely Okay**

Pesquisador (a) Executante: **Wilson Domingues**

CAPPesq, 28 de Outubro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO B – Teste de equilíbrio de Hardy Weinberg para os seguintes SNP: IL-6 174; IL-12p40 +1188; IL-4 +33; IL-10 -3575 e TGFβ1 +869.

• **IL-6-174 MS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	51.24	48
Heterozigoto	43.52	50
Homozigoto raro	9.24	6

• **IL-6-174 AS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	21.95	21
Heterozigoto	13.09	15
Homozigoto raro	1.95	1

• **IL-12P40+1188 MS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	40	37
Heterozigoto	49	55
Homozigoto raro	15	12

• **IL-12P40+1188 AS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	17.57	17
Heterozigoto	15.85	17
Homozigoto raro	3.57	3

• **IL-4+33 MS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	44.46	45
Heterozigoto	47.08	46
Homozigoto raro	12.46	13

- **IL-4+33 AS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	11.36	14
Heterozigoto	18.28	13
Homozigoto raro	7.36	10

- **IL-10 -3575 MS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	57.75	58
Heterozigoto	39.5	39
Homozigoto raro	6.75	7

- **IL-10 -3575 AS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	27.68	28
Heterozigoto	8.65	8
Homozigoto raro	0.68	1

- **TGFβ1+869 MS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	37.56	44
Heterozigoto	49.88	37
Homozigoto raro	16.56	23

- **TGFβ1+869 AS**

Genótipo	Esperado	Observado
Homozigoto comum	13.68	16
Heterozigoto	17.64	13
Homozigoto raro	5.68	8