Lilian de Oliveira Guimarães

**Polimorfismos genéticos em genes relacionados com imunidade
inata em população de área de baixa endemicidade para malária**

**Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional**

Orientadora: Prof. Dra. Karin Kirchgatter

**São Paulo
2017**

Ficha catalográfica

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

© Reprodução autorizada pelo autor

Guimarães, Lilian de Oliveira

Polimorfismos genéticos em genes relacionados com imunidade inata em
população de área de baixa endemicidade para malária / Lilian de Oliveira
Guimarães. – São Paulo, 2017.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Karin Kirchgatter

Descritores: 1. MALÁRIA. 2. PLASMODIUM. 3. GENEALOGIA. 4. IMUNIDADE.

USP/IMTSP/BIB-09/2017.

À minha família, com amor e gratidão pelo apoio, compreensão, suporte e carinho ao longo da elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra Karin Kirchgatter, pela amizade, ensinamentos, orientação, esforços para realização do trabalho, incentivo, principalmente pela confiança.

À Eliana Monteiro, pela ajuda e companhia durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr Gerhard Wunderlich por disponibilizar seu tempo, seu laboratório e sua equipe para execução deste trabalho.

À Dra Silvia Maria Fátima Di Santi, por disponibilizar as amostras pertencentes ao banco de amostras do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN e por disponibilizar este laboratório para a realização dos experimentos.

À Dra Izilda Curado, pela análise sorológica das amostras e pelos ensinamentos.

À Dra Marcia Holcman pelos ensinamentos e contribuição na parte estatística do trabalho.

Ao Thiago (sequenciador multiusuário Lim07) pela ajuda na análise do microssatélite no TLR2.

À Prof.^a Dra Julia Pavan e ao M.e Francisco Fernandes pela ajuda na análise estatística, discussão dos resultados, sugestões, ensinamentos e contribuição no artigo.

Ao Dr Miklos Bajay pela contribuição e ajuda na análise estatística, incrementando a análise de relacionamento entre TLRs e ancestralidade.

Ao Prof. Dr Sidney Emanuel Batista dos Santos pelos ensinamentos sobre ancestralidade e pela hospitalidade dada no período que permaneci em seu laboratório.

À equipe do laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará pelo treinamento em análise de microssatélites e hospitalidade durante o estágio.

Aos Profs. Dra Sabrina Ephifanio, Dra Camila Romano e Dr Renato Barboza pela atenção e discussão detalhada durante o exame de qualificação.

À Carmen Silva de Almeida Takata, Marcio Massao Yamamoto e Wolfgang Fischer pela ajuda com o sequenciamento.

Aos alunos do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, Angélica, Carolina Eliana, Giselle, Giovanni, Juliana, Malu, Miluska, Roseli e Yelina pelo convívio, amizade e favores realizados ao longo do meu trabalho.

À equipe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, Christina, Dida, Lia, Maria Silvia e Morgana, pelo apoio diário e incentivo.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Saúde Internacional Eliane Araújo, pela atenção e esclarecimentos de dúvidas ao longo de todo o projeto.

Ao bibliotecário Carlos José Quinteiro pelas correções na tese.

Aos meus amores, meu pai Laertes, minha mãe Aparecida e minha irmã Vivian, pelo carinho, apoio e por confiarem em minhas escolhas.

Ao meu esposo Wellington, pelo auxílio com parte dos softwares utilizados neste trabalho, pela compreensão, pelo estímulo e por estar ao meu lado em mais essa etapa.

Ao Instituto de Medicina Tropical, pela estrutura disponibilizada e suporte recebido durante a execução do trabalho.

À CAPES por prover a bolsa de doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Guimarães L de O. Polimorfismos genéticos em genes relacionados com imunidade inata em população de área de baixa endemicidade para malária (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Os receptores do tipo toll (*toll-like receptors* ou TLRs) são uma família de receptores na primeira linha de defesa do sistema imune inato que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), dentre os patógenos mais importantes encontra-se *Plasmodium*. Variações genéticas nesses receptores estão associadas à resistência ou suscetibilidade a uma variedade de doenças infecciosas. Sabe-se que as frequências destas mutações também podem variar de acordo com a ancestralidade biogeográfica dos indivíduos. Este trabalho avaliou a relação entre 24 polimorfismos em TLRs, ancestralidade e malária em 195 indivíduos residentes em área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. A ancestralidade genômica individual foi estimada usando marcadores autossômicos de inserção/deleção (INDELs) e os polimorfismos em TLR foram genotipados por PCR-RFLP, sequenciamento e eletroforese capilar. Dados prévios de malária presente ou pregressa obtidos por métodos moleculares e sorológicos foram utilizados para avaliar a relação dos polimorfismos em TLRs e malária nesses indivíduos. Os resultados mostraram que: (i) nove SNPs e um microssatélite foram polimórficos; (ii) a maior parte dos indivíduos analisados apresentou maior proporção de ancestralidade europeia; (iii) as proporções médias de ancestralidade europeia diferiram significativamente nos genótipos de TLR1 (I602S) e TLR6 (P249S); (iv) a probabilidade de ter o alelo variante G em TLR1 aumenta com o aumento da ancestralidade européia assim como aumenta a probabilidade de ter o alelo variante T no TLR6; (v) o polimorfismo em TLR9 -1237T/C foi fortemente relacionado à malária, sendo demonstrado que a presença de pelo menos um alelo C nessa posição aumentou o risco para malária 2,3 vezes; e (vi) TLR9 -1486T/C em associação com o TLR6 foi protetor, pois a associação dos alelos variantes reduziu o risco de malária em 4,4 vezes. O alelo G em TLR1 tem sido relacionado a uma resposta imune diminuída, o que poderia explicar a alta prevalência de casos de malária assintomática em áreas do sudeste brasileiro. O TLR9 tem sido relacionado com a patogênese da malária em estudos em animais e em humanos, sendo possivelmente modulado por polimorfismos na região promotora. Nossos dados também reforçam a necessidade de incluir marcadores de ancestralidade em estudos de associação genética para evitar resultados enviesados. Por fim, este é o primeiro estudo a associar polimorfismos em genes de imunidade inata e malária em amostras de Mata Atlântica.

Descritores: Malária. *Plasmodium*. Genealogia. Imunidade.

ABSTRACT

Guimarães L de O. Genetic polymorphisms in genes related to innate immunity in a low endemicity area for malaria (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Toll-like receptors (TLRs) are a family of receptors in the first line of defense of the innate immune system and they are able to recognize molecular patterns associated with pathogens (PAMPs), among the most important pathogens is *Plasmodium*. Genetic variations in these receptors are associated with resistance or susceptibility to a variety of infectious diseases. It is known that the frequencies of these mutations can also vary according to the biogeographic ancestry of the individuals. This work evaluated the relationship among 24 polymorphisms in TLRs, ancestry and malaria in 195 individuals living in the Atlantic Forest area of the São Paulo State. Individual genomic ancestry was estimated using autosomal insertion/deletion markers (INDELs) and TLR polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP, sequencing and capillary electrophoresis. Previous data about present or previous malaria were obtained by molecular and serological methods and were used to evaluate the relationship of polymorphisms in TLRs and malaria in these individuals. The results showed that: (i) nine SNPs and one microsatellite were polymorphic; (ii) the majority of the individuals analyzed presented a greater proportion of European ancestry; (iii) the average proportions of European ancestry differed significantly in the genotypes of TLR1 (I602S) and TLR6 (P249S); (iv) the probability of having the variant G allele in TLR1 increases with increasing European ancestry as well as increases the probability of having the T allele variant in TLR6; (v) the TLR9 -1237T/C polymorphism was strongly related to malaria, and the presence of at least one C allele in this position was shown to increase the risk for malaria 2.3 times; and (vi) TLR9-1486T/C in combination with TLR6 was protective, since the association of variant alleles reduced the risk of malaria by 4.4 times. The G allele in TLR1 has been related to a decreased immune response, which could explain the high prevalence of cases of asymptomatic malaria in areas of southeastern Brazil. TLR9 has been linked to the pathogenesis of malaria in animal and human studies, possibly being modulated by polymorphisms in the promoter region. Our data also reinforce the need to include ancestral markers in genetic association studies to avoid biased results. Finally, this is the first study to associate polymorphisms in genes of innate immunity and malaria in Atlantic Forest samples.

Descriptors: Malaria. *Plasmodium*. Genealogy. Immunity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Os TLRs.....	13
1.1.1	Ancestralidade e frequência dos polimorfismos em TLRs na população.....	16
1.1.2	Polimorfismos em TLRs e associação com suscetibilidade ou proteção a doenças com ênfase em malária.....	21
1.2	Malária.....	31
1.2.1	O Ciclo de Vida dos Plasmódios.....	32
1.2.2	Epidemiologia da Malária.....	36
1.2.3	Epidemiologia da Malária no Estado de São Paulo.....	37
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Geral.....	39
2.2	Específicos.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	Amostras, extração de DNA e análises prévias.....	40
3.2	Amplificação do genoma inteiro.....	41
3.3	Genotipagem dos SNPs.....	42
3.4	Análise de fragmentos.....	44
3.5	Análise da Ancestralidade.....	45
3.6	Estudos de Associação.....	47
3.6.1	Associação dos polimorfismos em TLR e ancestralidade.....	47
3.6.2	Associação dos polimorfismos em TLRs e malária.....	47
3.6.2.1	Regressão Logística.....	49
3.7	Aspectos éticos	50
4	RESULTADOS.....	51
4.1	Marcadores polimórficos, análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação.....	51
4.2	Estimativa da Ancestralidade.....	52
4.3	Associações dos genótipos encontrados e ancestralidade.....	53
4.4	Associações dos genótipos e alelos com malária.....	60
4.4.1	Análises das Componentes Principais como co-variável para o modelo.....	63
4.4.2	Análise Uniloco para o microsatélite.....	64
4.4.3	Análises Uniloco para os SNPs por Regressão Logística (efeito fixo).....	65
4.4.4	Análises Biloco para os SNPs por RL (efeito fixo).....	68
4.4.5	Modelos Completos e penalização para pequenas amostras.....	70
5	DISCUSSÃO.....	73
5.1	Associações entre os polimorfismos em TLRs e ancestralidade... ..	73
5.2	Associações entre os polimorfismos em TLRs e malária.....	77
6	CONCLUSÕES.....	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	APÊNDICES.....	102
	ANEXO.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os TLRs

O sistema imune é dividido em duas partes, o sistema imune inato e o adaptativo. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra organismos invasores e é altamente conservado entre as espécies¹.

Na imunidade inata, padrões associados a patógenos ou associados a danos (PAMPs/DAMPs) são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas membranas, como receptores do tipo *toll* (TLRs ou *toll-like receptors*) e receptores de lectina do tipo C (CLRs), ou presentes no citosol, como receptores NOD ou NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* ou *NOD-like receptors*) e receptores RLRs (*RIG-I-like Receptors*)²⁻⁴.

Os TLRs constituem a maior família de PRRs que diretamente reconhecem antígenos determinantes de vírus, bactérias, protozoários e fungos. Assim eles são os maiores agentes da resposta imune inata e possuem um papel chave na realização da resposta imune adaptativa. Adicionalmente, os TLRs também possuem ligantes endógenos como proteínas de choque térmico ou fragmentos de proteínas da matriz extracelular (usualmente lançadas durante o estresse celular)⁵. Essa família de receptores foi inicialmente identificada como uma proteína essencial para formação embrionária dorsoventral e resposta antifúngica de *Drosophila*⁶.

Membros da família dos TLRs podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua localização celular: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, e TLR10 são encontrados na superfície celular, enquanto TLR3, TLR7, TLR8, e TLR9 estão na membrana do retículo endoplasmático (em estágio de repouso) ou na membrana endossômica/lisossômica (após estímulo do ligante e transporte)⁷.

Os TLRs da superfície celular identificam componentes externos dos patógenos, enquanto os presentes na superfície das membranas intracelulares reconhecem na maioria das vezes ácidos nucleicos desses agentes infecciosos⁵ (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo dos ligantes exógenos reconhecidos por TLRs.

TLR	Ligantes exógenos	Origem
Heterodímero TLR1/TLR2	Triacil lipopeptídeos Lipoproteínas Lipoproteínas Solúveis GPI	Bactérias, Micobactérias <i>Neisseria meningitidis</i> <i>P. falciparum</i>
TLR2	Lipoproteínas Bacterianas Lipoarabinomanana MALP-2 Glicolipídeos Porinas Zimosan	Bactérias Micobactérias Micoplasma <i>Treponemamaltophilum</i> <i>Neisseria sp</i> Fungos
TLR3	dsRNA Ácido Poliinosínico: Policidídico	Vírus Sintético
TLR4	LPS Flavolipina Paclitaxel (Taxol®) Análogo acíclico sintético do lipídio A Proteína de fusão de RSV Glicoinositolfosfolipídeos Lipídeo A Proteínas do envelope MMTV GPI Micropartículas de eritrócitos infectados por <i>P. berguei</i> Hemozoína associada ao fibrinogênio humano	Bactérias Gram-negativas <i>Flavobacterium meningosepticum</i> Plantas Sintético Vírus respiratório sincicial <i>Trypanosoma cruzi</i> Bactérias Gram-negativas Vírus do tumor mamário murinho <i>P. falciparum</i> <i>P. berguei</i> Pigmento malárico
TLR5	Flagelina	Bactérias Gram-negativas
Heterodímero TLR6/ TLR2	MALP-2 Diacil lipopeptídeos Peptideoglicanas Zimosan	Micoplasma <i>Mycoplasma salivarium</i> Fungos Fungos
TLR7	ssRNA	Vírus
TLR8	ssRNA DNA CpG não metilado	Vírus Bactérias, fungos e protozoários
TLR9	Motivos CpG de DNA Hemozoína	Vírus e bactérias Pigmento malárico
TLR10	Desconhecido	

Fonte: Gao e Li⁸ (com modificações).

Abreviações: GPI: glicosilfosfatidilinositol; MALP-2 lipopeptídeo estimulador de macrófagos; LPS: lipopolissacarídeo; MMTV: Vírus do tumor mamário murino.

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo I que possuem três domínios^{9,10}. O ectodomínio é orientado para o espaço extracelular ou citoplasma (dependendo da localização do receptor) e contém muitas repetições (16-28) ricas em leucinas (LRRs) que ancoram de 24 a 29 aminoácidos e muitos contêm dois tipos de motivos: motivos “típicos” (“T”) (LxxLxLxxNxLxxLxxxxF/LxxLxx) e motivos “bacterianos” (“S”) (LxxLxLxxNxLxxLPx(x)LPxx)^{10,11}.

Os módulos LRR dobram-se em folhas- β paralelas em uma superfície côncava, formando uma ou duas estruturas em formato de ferradura, determinando esse padrão único dos TLRs¹⁰. Os resíduos hidrofóbicos das LRR estão armazenados dentro da estrutura interior do ectodomínio, formando uma região hidrofóbica de ligação ao ligante¹¹.

Desta forma as LRRs têm um papel fundamental no reconhecimento e na ligação a patógenos^{10,11}. Adicionalmente a região C-terminal das LRRs pode controlar a dimerização do receptor e a transmissão de sinais¹². O domínio transmembrana é homólogo do receptor análogo a interleucina-1 e ancora o receptor na orientação correta na membrana celular^{13,14}. O terceiro domínio, o domínio citoplasmático (domínio TIR ou *Toll/interleukin-1 receptor*) é normalmente composto por aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos¹⁵ e dimeriza após a interação ligante-ectodomínio e respectivas alterações na conformação do receptor, desencadeando o recrutamento de proteínas adaptadoras, MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), TIRAP/MAL (*TIR domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like protein*) e SARM (*sterile α - and armadillo motif-containing protein*), que compartilham significativa similaridade entre sua sequência de aminoácidos e seus domínios TIR¹⁶. Esses adaptadores carregam o sinal a partir do receptor e são necessários para expressão de citocinas pró-inflamatórias e IFN tipo 1^{2,17,18}. Para isso é importante que todos os TLRs formem homo ou heterodímeros, e essa característica pode facilitar a dimerização do domínio citoplasmático. Todos os adaptadores indicados anteriormente, assim como os TLRs, possuem o domínio TIR, e interações entre tal domínio do receptor e do adaptador são as chaves para uma sinalização bem-sucedida¹⁹. Com exceção do TLR3, MyD88 é comum para todas as vias sinalizadoras de TLRs⁵ (Figura 1).

Figura 1 - Vias de sinalização do TLRs.

Fonte: Abbas *et al.*²⁰ (com modificações). Abreviações: TLR: receptores do tipo Toll; TIR: receptor Toll/IL-1; MyD88: fator de diferenciação mieloide 88; TRIF: domínio TIR contendo IFN- β induzido por adaptador; NF κ β : fator de transcrição nuclear; TNF: fator de necrose tumoral; IL: interleucina; CCL2: quimiocina da cisteína-cisteína ligante 2; CXCL8: quimiocina da cisteína-X-cisteína ligante 8; CD80: grupo de diferenciação 80; CD86: grupo de diferenciação 86 e IFN κ/β : interferon κ/β .

Os TLR3 e 4 induzem a expressão de IFN tipo 1 através de uma via independente de MyD88, envolvendo TRIF. Ainda o processo da sinalização do TLR é mediado por outras proteínas adaptadoras o que finalmente desencadeia a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína quinase ativada por mitógeno²¹, quinase c-Jun N-terminal²², e fator regulatório de interferon (IRF)1, 3, 5, 7, e 8²³, que move dentro do

núcleo e controla direta e indiretamente a atividade transcricional dos genes que codificam várias citocinas pró-inflamatórias (interleucina [IL]-1, 2, 6, 8, 10, 12, 13, 23, e 27, proteína inflamatória de macrófago-1, proteína quimiotática de monócito-1, regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais [RANTES], supressores da sinalização de citocinas [SOCs], proteína induzida por interferon - 10, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, fator de necrose tumoral- α [TNF- α], interferon [IFN]- α , IFN- β e IFN- γ e proteínas induzidas por IFN)^{7,24,25}. Os domínios citoplasmáticos dos TLRs são altamente similares, mas diferenças no ectodomínio resultam em um espectro distinto de ligantes para cada membro da família dos TLRs²⁶.

Os TLRs são expressos em vários tipos celulares do sistema imune incluindo monócitos, células dendríticas, células B bem como células endoteliais (Tabela 2), onde sua expressão no nível do transcriptoma ou proteoma foi detectada em um amplo espectro de órgãos (pele, músculo esquelético, cérebro, medula espinhal, coração, rim, bexiga, glândula salivar, intestino fino, cólon, fígado, pâncreas, baço, traquéia, brônquios, pulmão, placenta, útero, ovário, próstata, testículos, timo, tireóide e glândula adrenal)¹.

A diversidade de células e organismos em que os TLRs são expressos fornece evidência que esses receptores têm muitas funções na complexa maquinaria do sistema imune: através deles o epitélio e o endotélio se defendem contra agentes infecciosos por suas próprias forças, eles medeiam a ativação da resposta imune adaptativa por antígenos presentes em células *T-helpers*, estimulam a expressão de moléculas de adesão celulares para leucócitos “rolarem” e se aderirem durante o desenvolvimento inflamatório e contribuem para a eficácia da fagocitose⁷. Ainda há evidência da participação dos TLRs no processo de proliferação celular, sobrevivência, apoptose, piroptose e angiogênese (consequentemente no remodelamento e reparo do tecido)²⁷⁻³⁰. Como os TLRs reconhecem muitos padrões moleculares associados a danos, a resposta imune mediada por TLR pode ser ativada sem a ação de agentes infecciosos. Consequentemente, TLRs participam no desenvolvimento de inflamação asséptica causada por fatores físicos ou químicos, potencializando o progresso da doença, ou o contrário, prevenindo complicações (ainda há a possibilidade da combinação desses dois efeitos)⁵.

Tabela 2 - Expressão dos genes de TLRs em células humanas.

Membro da família TLR	Principais tipos celulares onde a expressão do TLR foi identificada
TLR1	Células mielóides, pDCs, células NK, linfócitos T e B, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, queratinócitos, mastócitos e plaquetas.
TLR2	Células mielóides, pDCs, células NK, linfócitos T e B, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, neurônios, mastócitos e plaquetas.
TLR3	Monócitos, células dendríticas, eosinófilo, células NK, linfócitos T, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, neurônios e mastócitos.
TLR4	Células mielóides, pDCs, células NK, linfócitos T e B, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, mastócitos e plaquetas.
TLR5	Células mielóides, células NK, linfócitos T, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos e mastócitos.
TLR6	Células mielóides, pDCs, células NK, linfócitos T e B, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, mastócitos e plaquetas.
TLR7	Células mielóides, pDCs, células NK, linfócitos T e B, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e mastócitos.
TLR8	Células mielóides, células NK, linfócitos T, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e neurônios.
TLR9	Células mielóides, pDCs, células NK, células T e B, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, mastócitos e plaquetas.
TLR10	Células mielóides, pDCs, células T e B, células epiteliais, células endoteliais e queratinócitos.

Fonte: Kutikhin *et al.*⁵

Abreviações: TLR: receptores do tipo *toll*; NK: células *Natural Killers*. pDCs: Células dendríticas plasmocitóides.

Variações genéticas nos TLRs podem alterar a capacidade do organismo a responder a diferentes estímulos. Consequentemente, os polimorfismos nos TLRs podem alterar a suscetibilidade, curso e resposta a infecção ou doenças inflamatórias³¹.

Entre as variações genéticas nos genes de TLRs, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são amplamente usados em estudos visando relacioná-los a suscetibilidade a doenças. Há dois tipos de SNPs na região codificante: sinônimos

(onde não há mudança de aminoácido) e não sinônimos (onde há alteração de aminoácido), sendo que esse último pode alterar a função da proteína³². SNPs fora da região codificante podem alterar os fatores de ligação do fator de transcrição, mudando a eficácia de elementos potencializadores ou repressores³³. Podem também alterar a estrutura de códons iniciadores da tradução, o que pode levar a uma baixa regulação do transcrito selvagem³⁴ e ainda podem afetar a transcrição e o *splicing*/estabilidade do RNAm, o que pode alterar o nível de expressão de uma proteína³⁵.

SNPs localizados nas LRR podem afetar a capacidade dos receptores de se ligar a patógenos que normalmente eles reconhecem¹¹. Polimorfismos no domínio transmembrana podem levar a defeitos no receptor de transporte intracelular não permitindo a fixação de um receptor transmembrana³⁶. Já no domínio citoplasmático podem resultar em alterações na interação com proteínas adaptadoras ou em desfazer a dimerização⁵.

Os SNPs são distribuídos de forma distinta entre as populações humanas. Determinados polimorfismos podem se fixar na população por conferir um aspecto protetor a fatores ambientais³⁷. Há estudos que evidenciam como determinadas populações são mais diversificadas que outras³⁸.

1.1.1 Ancestralidade e frequência dos polimorfismos em TLRs na população.

As frequências de polimorfismos em cada um dos SNPs selecionados para este estudo variam muito na população humana, desde 0,0008% (no TLR2 E694D³⁹) a 49% (no TLR9 -1174G/A⁴⁰) (Tabela 3) e no microsatélite GTn no TLR2 varia de 29,3%⁴¹ a 79,9%⁴² (alelo do tamanho médio). Essas frequências também variam em determinados grupos de indivíduos (europeus, asiáticos, africanos, afro-americanos, africanos da região subsaariana, etc). Por exemplo, no TLR4 o haplótipo 299G/339I é característico de populações Europeias⁴³. Em um estudo sobre a distribuição dos SNPs de TLR em doadores de sangue saudáveis de diferentes partes do mundo, ficou bem evidenciado o grau de diversidade dos polimorfismos entre as populações e

entre a localização dos TLRs onde, com exceção do TLR1, os demais TLRs são mais diversificados em Africanos e os TLRs presentes em membranas internas, capazes de reconhecer ácidos nucleicos, apresentam menor diversidade³⁸. Quach *et al.*⁴⁴ observaram que o alelo G no TLR1 (602S) foi relacionado com ancestralidade Europeia. Frequências dos polimorfismos, analisados neste estudo, na população humana e europeia são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Frequências dos SNPs na População.

Gene	SNP	refSNP	MAF Global	Frequencia EUR	Referência
TLR1	I602S	rs5743618	G (602S): 0,199	0,673	40
	P631H	rs5743704	A (631H): 0,009	0,0298	40
	R650Q	rs200483398	A (650L): 0,0002	ND	39
	L658P	ND	ND	ND	45
	P669L	rs145936474	T (669L): 0,00006	ND	39
	R677W	rs121917864	T (677W): 0,00007	ND	39
	F679I	rs190143186	A (679I): 0,0004	0	40
	I693T	rs371032036	C (693I): 0,00007	ND	39
	E694D	rs374310145	C (694D): 0,000008	ND	39
TLR2	Y715N	rs5743706	ND	0	46
	F722L	rs150753690	A (722L): 0,00002	ND	39
	R723S	rs371652530	T (723S): 0,0002	0	40
	N729S	rs61735278	G (729S): 0,0006	0	40
	E738Q	rs142286429	C (738Q): 0,0010	0	40
	P746S	rs368695448	C (746S): 0,00002	ND	39
	R748H	rs370330063	A (748H): 0,00008	ND	47
	R753Q	rs5743708	A (753Q): 0,0068	0,0239	40
	D299G	rs4986790	G (299G): 0,0599	0,0567	40
TLR4	T399I	rs4986791	T (399I): 0,0407	0,0577	40
	TLR6	P249S	rs5743810	T (249S): 0,1152	0,40849
-1486T/C		rs187084	C: 0,3776	0,42739	40
TLR9	-1237T/C	rs5743836	C: 0,1725	0,1312	40
	-1174G/A	rs352139	A: 0,49	0,44729	40

Fonte: dbSNP database⁴⁸.

Abreviações: refSNP: SNP de referência; MAF: frequência do alelo menor; EUR: população Europeia.

A população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo, resultado da mistura de três grupos ancestrais: europeus, africanos e ameríndios^{49,50,51}. A contribuição de ancestralidade genômica autossômica europeia é a mais significativa (de 62⁵² a 77%⁵⁰), seguida da contribuição africana (de 14⁵⁰ a 21%⁵²) e ameríndia (de 8,5⁵⁰ a 17%⁵²). De uma forma geral, as proporções relativas de ancestralidade

genética autossômica nas populações das diferentes regiões brasileiras mantêm essa proporção, onde na região sudeste de 59,2⁵³ a 79,9%⁵⁰ são europeus, de 14⁵⁴ a 28,9%⁵³ são africanos e de 6,1⁵⁰ a 12,5%⁵³ são ameríndios. O Estado de São Paulo, como esperado, possui estimativas de ancestralidade muito parecidas, de 57,4⁵⁵ a 80,8%⁵⁶ europeus, 7,6⁵⁶ a 31%⁵⁷ africanos e de 6⁵⁷ a 14,7%⁵⁵ ameríndios. Comunidades isoladas, tais como remanescentes de quilombo ou comunidades indígenas, são exceções às estimativas de contribuição genética, onde a ancestralidade pode ser quase que exclusiva, pois essas comunidades são endogâmicas⁵⁸. O único dado de ancestralidade autossômica para a região do Vale do Ribeira é proveniente de população quilombola⁵⁹, onde a proporção africana é 39,7%, europeia 39% e ameríndia 21,3%.

1.1.2 Polimorfismos em TLRs e associação com suscetibilidade ou proteção a doenças com ênfase em malária.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa em resposta a uma infecção e por malária ela se inicia logo após a inoculação dos esporozoítos no hospedeiro vertebrado⁶⁰⁻⁶². Em células mononucleares de sangue periférico infectado com *P. falciparum* há aumento na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias via ligação por TLR1/TLR2 e TLR4^{63,64}. Formas distintas da GPI de *P. falciparum*⁶⁵⁻⁶⁷ são reconhecidas pelos dímeros TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6. A hemozoína (Hz) associada ao fibrinogênio humano⁶⁸ e a *Plasmodium* 2-Cis peroxirredoxina⁶⁹ são reconhecidas por TLR4. Em experimentos realizados no modelo murino, o TLR4 reconhece o grupo heme e micropartículas liberadas de eritrócitos parasitados por *P. berguei*^{70,71}. Ainda, RNA de *Plasmodium* foi sugerido como um ligante para TLR7⁷² e por último, o TLR9 reconhece DNA de *P. falciparum* e também DNA ligado à hemozoína^{73,74} (Figura 2)⁶⁴.

Figura 2 - Antígenos parasitários reconhecidos por TLRs.

Fonte: Eriksson *et al.*⁶⁴ (com modificações).

Abreviações: GPI- glicosilfosfatidilinositol; IFN- interferon; IL- interleucina; IRF- fator regulatório de IFN; MAL- adaptador tipo MyD88; MyD88- fator de diferenciação mielóide 88; NF- fator nuclear; TNF- fator de necrose tumoral; TRAM- molécula adaptadora relacionada a TRIF; TRIF- adaptador indutor de IFN-β contendo domínio TIR.

Embora a sinalização dos TLRs seja um aspecto importante na resposta pró-inflamatória, seu papel exato na malária continua inconclusivo⁶⁴. Em animais foi demonstrado que os TLR2 e TLR4 têm papel essencial na sobrevivência, mas não no controle da parasitemia na malária cerebral⁷⁵. Os animais deficientes de TLR9 sobreviveram à malária cerebral melhor que camundongos selvagens⁷⁶ e a inibição da ativação do TLR9 conferiu proteção contra a doença^{1,77}.

A avaliação da relação entre a expressão dos TLRs e o desfecho clínico da doença em humanos também é limitada. Em um estudo com malária experimental humana foi demonstrado que os TLRs são modulados individualmente durante a infecção aguda por *P. falciparum*⁶³. Os ligantes de TLR4 aumentaram a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que os ligantes de TLR1/TLR2 aumentaram a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias⁶³. O TLR6 teve sua expressão

diminuída enquanto que o TLR9 não teve sua expressão modificada durante a infecção⁶³. Em um estudo tailandês foi observado que a expressão de TLR2 foi aumentada em monócitos e células dendríticas mielóides de todos os indivíduos infectados por *P. falciparum*⁷⁸. Por outro lado, a expressão de TLR9 por células dendríticas plasmocitóides diminuiu nesses mesmos indivíduos^{64,78}. Embora estes estudos sejam limitados pelo período curto de infecção ou pelo número pequeno de amostras incluídas, eles indicam que a malária pode afetar a expressão de TLRs. Ainda, muitos estudos têm relacionado polimorfismos e mudanças na expressão dos TLRs na patogênese da doença^{45,79-89}.

No Brasil existem 20 estudos avaliando a relação dos mesmos polimorfismos em TLRs escolhidos para este estudo com malária (Tabela 4). Esses trabalhos avaliaram diferentes doenças infecciosas^{79,80,90-96}, complicações no parto⁹⁷, doenças auto-imunes⁹⁸, doenças metabólicas⁹⁹, transplantes^{100,101}, doadores recusados¹⁰², tumores¹⁰³⁻¹⁰⁵, doenças inflamatórias¹⁰⁶, doenças cardíacas¹⁰⁷ e doenças crônicas intestinais¹⁰⁸. Para fins de comparação, quando possível, as frequências dos alelos foram extraídas destes trabalhos, independente de sua associação ou não a doenças, e comparadas com as frequências encontradas nesse estudo.

Tabela 4 - Estudos brasileiros avaliando SNPs e suscetibilidade a doenças.

TLR	Ref	Condição Analisada	Estado	N Total	SNP	MAF
1	79	Malária	AM, MT, RO	304	I602S	G (602S): 0,19
	90	Doença de Chagas	SP	245	I602S	ND
2	91	<i>Helicobacter pylori</i>	MG	486	R753Q	A (753Q):0,006
	92	Toxoplasmose ocular	RJ	160	R753Q	A (753Q): 0,01
	97	Pré-eclampsia	SP	229	R753Q	A (753Q): 0,08
	90	Doença de Chagas	SP	245	R753Q	ND
	93	<i>H. pylori</i>	MG	541	R753Q	A (753Q): 0,01
	98	Trombocitopenia Imune	MG	662	R753Q	A (753Q):0,001
4	91	<i>H. pylori</i>	MG	486	D299G	G (299G): 0,06
	94	Malária	PA	44	D299G	G (299G): 0,06
	79	Malária	AM, MT, RO	304	D299G	G (299G): 0,05
	90	Doença de Chagas	SP	245	D299G	ND
	93	<i>H. pylori</i>	MG	541	D299G	G (299G): 0,05
	99	Diabetes	SP	411	D299G	G (299G): 0,04
	95	Sepse	SP	ND	D299G	ND
	100	Transplante renal	ND	245	D299G	ND
	98	Trombocitopenia Imune	MG	662	D299G	G (299G): 0,05
	102	Doadores recusados	SP	255	D299G	G (299G): 0,06
	97	Pré-eclampsia	SP	229	D299G	G (299G): 0,05
	103	Cancer gástrico	SP	607	D299G	G (299G): 0,04
	80	Malária	AM	648	D299G	G (299G): 0,02
	104	Câncer gástrico	SP	669	D299G	G (299G): 0,05
	105	Câncer coloretal	SP	430	D299G	G (299G): 0,04
	106	Espondilite anquilosante	SP	400	D299G	G (299G): 0,05
	101	Transplante renal	ND	386	T399I	ND
	99	Diabetes	SP	411	T399I	T (399I): 0,02
	100	Transplante renal	ND	245	T399I	ND
	80	Malária	AM	648	T399I	T (399I): 0,02
	103	Câncer gástrico	SP	607	T399I	T (399I): 0,02
	104	Câncer gástrico	SP	669	T399I	T (399I): 0,02
	106	Espondilite anquilosante	SP	400	T399I	T (399I): 0,03
6	79	Malária	AM, MT, RO	304	P249S	T (249S): 0,16
	107	Espessura da parede ventricular	ND	443	P249S	T (249S): 0,24
	80	Malária	AM	648	P249S	T (249S): 0,07
9	79	Malária	AM, MT, RO	304	-1486T/C	C: 0,41
	90	Doença de Chagas	SP	245	-1486T/C	ND
	80	Malária	AM	648	-1486T/C	C: 0,47
	79	Malária	AM, MT, RO	304	-1237T/C	C: 0,15
	92	Toxoplasmose ocular	RJ	160	-1237T/C	C: 0,216
	90	Doença de Chagas	SP	245	-1237T/C	ND
	96	HPV	SP	489	-1237T/C	ND
	108	Intestino inflamado	RS	487	-1237T/C	C: 0,17

Abreviações: TLR: receptores do tipo *toll*; Ref: referências; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; MAF: frequência do alelo menor; ND: não disponível; HPV: Vírus do papiloma humano. N Total= Pacientes e Controles.

A seguir cada TLR analisado nesse trabalho será individualmente introduzido, assim como o respectivo SNP estudado e sua relação com algumas doenças infecciosas e malária.

TLR1. Os genes que codificam os TLR1, TLR6 e TLR10 estão agrupados na região cromossômica 4p14 e codificam proteínas com alto grau de similaridade^{109,110}. O TLR1 é uma proteína de 786 aminoácidos, composta por 7 éxons e são descritos 17 SNPs não sinônimos neste TLR^{109,111,112}. Atualmente, o polimorfismo Ile602Ser (I602S) é o mais estudado e o mais frequentemente encontrado¹¹². Outros SNPs no TLR1 incluem Asn248Ser (N248S)¹¹³ e -7202A/G¹¹⁴. O SNP N248S diminui a sinalização e já foi associado à hanseníase¹¹². O -7202A/G aumenta a expressão do TLR1 na superfície celular e aumenta a ativação de NF-κB mediada por TLR1¹¹². Em um estudo em pacientes com sepse e doença aguda no pulmão associada à sepse, este SNP foi relacionado com maior probabilidade de disfunção orgânica e morte^{112,114}.

Ile602Ser (rs5743618). O SNP I602S é importante por afetar a função e a expressão na superfície celular do TLR1 alterando a capacidade do receptor em reconhecer o ligante, provavelmente devido a incapacidade do alelo C (602Ser) no tráfego na superfície celular³⁶. Em um ensaio de citocinas no sangue total, a estimulação por lipopeptídeos resultou em altos níveis de IL-6 em indivíduos portadores do fenótipo 602IleIle quando comparados com os portadores dos alelos 602SerSer¹¹⁵. Em um estudo avaliando a variação da resposta imune e ancestralidade usando a variabilidade de locus controladores da expressão gênica (eQTL), Quach *et al.*⁴⁴ observaram que o alelo C (602Ser) foi associado com a diminuição da expressão de genes de resposta inflamatória e este alelo também foi associado com ancestralidade Europeia.

Funcionalmente, o SNP 602Ser protege contra hanseníase^{36,112} e aumenta a suscetibilidade a candidíase⁴³. Em relação à malária, sabe-se que respostas proinflamatórias por glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *P. falciparum* são principalmente mediadas através do reconhecimento por TLR1/TLR2⁶⁷. Até o momento, há apenas dois estudos buscando associação desse polimorfismo e malária, um estudo brasileiro⁷⁹ realizado com pacientes da Região Amazônica e um estudo

indiano⁸⁸ com pacientes infectados com *P. falciparum*, onde alelo C (602S) foi considerado um fator de risco para malária em ambas as análises.

TLR2. O gene do TLR2 está localizado na posição cromossômica 4q31.3 e é composto por 3 éxons, onde o primeiro e o segundo não são codificantes e o terceiro possui a região codificante dos 785 aminoácidos da proteína¹¹². O TLR2 é capaz de detectar o mais vasto repertório de PAMPs de uma grande variedade de agentes, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias, fungos, vírus e parasitas¹¹⁶. Atualmente, 24 polimorfismos são descritos neste gene, entre os quais 13 são mutações não sinônimas que conduzem a trocas de aminoácidos. Seis polimorfismos são os mais encontrados, sendo dois não sinônimos Pro631His (P631H) e Arg753Gln (R753Q), e quatro sinônimos. Georgel *et al.*¹¹² verificou uma frequência de 2,33% para P631H e 3,49% para R753Q em 42 indivíduos caucasianos franceses analisados. Polimorfismos no TLR2 estão associados com várias doenças infecciosas, tanto de origem viral^{117,118} quanto bacteriana^{116,119}.

Arg753Gln (rs5743708). O SNP R753Q reduziu a capacidade do receptor de responder aos ligantes em indivíduos heterozigotos quando comparados com homozigotos ancestrais, após estimulação com lisado de *Borrelia*¹²⁰. Esta mutação foi protetora contra doença de Lyme¹²¹, mas tornou os portadores suscetíveis a infecção do trato urinário¹²², aumentou do risco para sepse relacionada a infecções estafilocóccia¹²⁰ e ainda foi associada com suscetibilidade à tuberculose¹²³.

Arg677Trp (rs121917864). A síntese de IL-12, após estímulo com lisados de células de *Mycobacterium leprae*, esteve prejudicada em indivíduos mutantes para o SNP R677W em um estudo coreano¹²⁴. Com relação à associação a doenças, em um estudo realizado no Reino Unido, a mutação foi associada à suscetibilidade a hanseníase¹²⁵, mas não com morbidade e mortalidade causada por *Staphylococcus aureus*¹²⁶. Porém em outros estudos dois SNPs foram avaliados (R677W e R753Q) e não foi encontrada associação à tuberculose em amostras chinesas¹²⁷ e nem com leishmaniose cutânea em pacientes de área endêmica no Irã¹²⁸.

Com relação à malária não foram encontradas associações entre ambos os SNPs (R677W e R753Q) em crianças africanas⁴⁵ e nem entre o SNP R753Q em amostras indianas⁸². Não há nenhum estudo brasileiro até o momento que analisou os polimorfismos no TLR2 em pacientes com malária.

GTn. Outro polimorfismo encontrado em TLR2 é um dinucleotídeo GT que varia aproximadamente de 12 a 30 repetições (GTn) e está presente no segundo íntron, aproximadamente 100 pb acima do sítio de início da transcrição. Variações no número de repetições são associadas à suscetibilidade a tuberculose, hanseníase e câncer^{129,130}. Entretanto, em pacientes com malária, a análise deste polimorfismo demonstrou que não há associação com proteção contra malária cerebral⁴².

TLR4. A localização genômica do gene que codifica o TLR4, uma proteína de 840 resíduos, é 9q32-33¹³¹, sendo expresso principalmente em neutrófilos, monócitos e células dendríticas¹³². Vinte e oito posições não sinônimas e sete sinônimas têm sido descritas, entre as quais duas mutações Asp299Gly (D299G) e Thr399Ile (T399I), que induzem trocas de aminoácidos¹¹². Esses dois polimorfismos estão no domínio extracelular e normalmente co-segregam em populações caucasianas e europeias, mas não em africanos¹³³. O polimorfismo T399I prejudica a eficácia da sinalização do lipopolissacarídeo e a capacidade de induzir inflamação^{112,134}. Georgel *et al.*¹¹² identificaram uma mutação adicional (C281Y), porém rara (1% em 49 indivíduos caucasianos franceses analisados). Este é um dos TLRs mais estudados, pois é o receptor-chave para lipopolissacarídeos (LPS), um componente das bactérias Gram-negativas e de estruturas de micobactérias, fungos e *Plasmodium* sp.³⁷. O polimorfismo D299G em TLR4 resulta na alteração estrutural da proteína, que pode afetar a ligação do ligante, a eficiência na dobragem, a expressão na superfície celular e a estabilidade da proteína¹³⁵. A presença deste polimorfismo também implica na capacidade de resposta diminuída de TLR4 para LPS e ativação de NF- κ B¹³⁶, comprometendo assim as funções de sinalização de TLR4¹³⁷.

Asp299Gly (rs4986790) e Thr399Ile (rs4986791). O polimorfismo D299G foi associado à suscetibilidade a infecções bacterianas¹³⁴ e a presença da mutação no D299G, mas não T399I, foi relacionada ao aumento da incidência de bactérias Gram-negativas e osteomielite hematogênica¹³⁸. Em um estudo de cinco anos realizado com população italiana, foi encontrada associação dessas variantes com níveis de inflamação sistêmica, risco de infecção bacteriana e desenvolvimento de aterosclerose^{31,134}. No entanto, nenhum dos dois polimorfismos D299G e T399I estiveram associados à suscetibilidade a tuberculose em amostras chinesas¹²⁷.

Estudos relacionando polimorfismos neste TLR e malária são controversos. Basu *et al.*⁸² associaram ambos os polimorfismos a baixa parasitemia de *P. falciparum* em amostras indianas. Mockenhaupt *et al.*⁴⁵ associaram as duas mutações a risco maior de gravidade em crianças africanas e Pirahmadi *et al.*¹³⁹ relacionaram o genótipo heterozigoto no D229G e homozigoto ancestral no T399I com suscetibilidade a malária grave em amostras iranianas. Ainda, há estudos que não demonstraram influência das variações genéticas no TLR4 na suscetibilidade ou mortalidade por malária em Gana¹⁴⁰; o mesmo se repetiu em dois estudos Indianos onde os polimorfismos no TLR4 não foram associados nem com gravidade da doença ou frequência dos episódios clínicos⁸⁶ e nem o D299G foi associado à suscetibilidade ou resistência a malária⁶¹. Zakeri *et al.*¹⁴¹ encontraram ambos os SNPs distribuídos igualmente entre indivíduos infectados ou não com *P. falciparum*, em amostras iranianas.

No Brasil dois estudos com amostras Amazonenses não encontraram associação do polimorfismo D299G e malária^{79,94}. Estes resultados são divergentes daqueles encontrados por da Silva Santos *et al.*⁸⁰ onde este polimorfismo foi relacionado à malária não complicada.

TLR6. O TLR6 está na mesma posição cromossômica do TLR1 4p14, sendo uma proteína de 796 aminoácidos e para esse TLR são conhecidos 22 SNPs não sinônimos¹¹². Assim como o TLR1, o TLR6 é um membro muito importante da família dos TLRs por formar heterodímero com o TLR2 e então ampliar o repertório de reconhecimento para uma variedade de ligantes microbianos¹⁴². Já foi descrito que polimorfismo nesse gene potencializou a liberação de IFN- γ após a injeção da vacina do bacilo de Calmette e Guérin (BCG)¹⁴³.

Pro249Ser (rs5743810). O SNP P249S localizado no domínio extracelular no TLR6 que converte Prolina em Serina, já foi avaliado com relação à malária em um estudo camaronês⁸⁷ e em um estudo indiano⁸⁸, onde associação com a doença só foi encontrada na Índia; sendo o alelo T (249S) associado com o risco de malária cerebral. No Brasil, este polimorfismo já foi avaliado em um estudo⁷⁹ que encontrou associação da variante no TLR6 e malária não grave, onde o genótipo 249PP foi mais prevalente em assintomáticos, porém este resultado não foi reproduzido em outro estudo usando também amostras da região Amazônica⁸⁰.

TLR9. O gene codificante do TLR9 está localizado na região cromossômica 3p21.3 e abrange aproximadamente 5 kb¹¹². Consiste de dois éxons que codificam 1032 aminoácidos¹⁴⁴. Este TLR está presente na membrana do endossomo¹⁴⁵ e é expresso em células dendríticas plasmocitóides e linfócitos B¹⁴⁶. Em 2003, Lazarus *et al.*¹⁴⁷ identificaram 20 polimorfismos, sendo quatro relativamente comuns nas populações: -1237T/C e -1486T/C localizados na região promotora; 1174G/A localizado no *intron* 1 e 2848C/T localizado no *exon* 2 do gene TLR9. Em um estudo avaliando a relação entre estes SNPs e malária, Campino *et al.*¹⁴⁸ demonstraram que a expressão do TLR9 é possivelmente influenciada por SNPs próximos ao gene. Infelizmente os autores não conseguiram definir qual SNP age como regulador da expressão do TLR9, provavelmente por causa do pequeno número de amostras estudadas.

-1486T/C (rs1870084). Este polimorfismo -1486T/C já foi avaliado em indivíduos com tuberculose e não teve associação significativa quando analisado individualmente, mas em conjunto com outros dois polimorfismos no TLR4 (D299G e T399I) houve um aumento de 7,5 vezes no risco para desenvolver a doença¹⁴⁹. Ainda avaliando tuberculose outro estudo demonstrou uma ação protetora do genótipo heterozigoto, sendo também negativamente associado à malária grave⁸⁶.

Alguns estudos avaliaram esse SNP e malária. Apinjoh *et al.*⁸¹ associaram este polimorfismo com susceptibilidade para malária em crianças camaronesas e Kar *et al.*⁶¹, em um estudo indiano, identificaram o genótipo heterozigoto como o mais frequente em indivíduos com malária grave. Por outro lado, alguns estudos não encontraram nenhuma associação do -1486T/C e malária. Os genótipos TC e CC foram encontrados tanto em pacientes com *P. falciparum* como em indivíduos não infectados¹⁴¹ e ainda, avaliando este polimorfismo individualmente, Omar *et al.*⁸⁶ não encontraram influência na incidência de malária sintomática e nem efeito na parasitemia em área endêmica (Gana). No entanto, ao realizar uma análise conjunta com outros SNPs no mesmo TLR, o haplótipo mais frequente -1486T, -1237T, 1174A, 2848C (39.1%) foi significativamente associado com proteção contra malária sintomática e alta parasitemia⁸⁶. Por último, Mockenhaupt *et al.*⁸⁵, em um estudo com gestantes, encontraram uma associação do alelo -1486C e baixo peso no

nascimento, mas não encontraram relação com a prevalência nem a com densidade parasitária nas gestantes.

No Brasil, os resultados também são conflitantes. Um estudo realizado por Leoratti *et al.*⁷⁹ na Região Amazônica mostrou uma forte associação com a presença do alelo -1486C e a alta parasitemia de *P. falciparum* enquanto outro estudo realizado por da Silva Santos *et al.*⁸⁰ não encontrou nenhuma associação.

-1237T/C (rs5743836). O polimorfismo -1237T/C tem sido relacionado a diversas doenças. A presença do alelo mutante aumentou a atividade transcricional principalmente na ativação de NF- κ B, mostrando ser significativamente associado com o desenvolvimento de mudanças gástricas pré-malignas induzidas por *Helicobacter pylori*¹⁵⁰. A participação deste alelo na indução da ativação de NF- κ B, também foi comprovada em outro estudo, mostrando ainda o efeito de proteção contra meningococemia, evitando a invasão meningeal¹⁵¹.

Em estudos com malária, o genótipo selvagem (TT) foi associado com baixa parasitemia, mas não teve efeito na malária sintomática⁸⁵. Sawian *et al.*⁸⁸ demonstraram que SNP -1237T/C em heterozigose predispõe indivíduos Austro-Asiáticos à malária complicada. Da mesma forma Esposito *et al.*⁸³ encontraram associação entre o alelo -1237C com um aumento no risco de desenvolver malária em crianças burundianas. Por último, alguns estudos não associaram o -1237T/C com manifestação clínica da malária em pacientes iranianos¹⁴¹ e nem entre crianças africanas⁴⁵. Sam-Agudu *et al.*⁸⁷ mostraram que a frequência do alelo C não diferiu entre crianças de Uganda com malária cerebral e malária não complicada.

No Brasil, o único estudo que avaliou o SNP -1237T/C demonstrou que a presença do genótipo -1237TT foi relacionada com baixa parasitemia em indivíduos da Amazônia⁷⁹.

1174G/A (rs352139). Este SNP foi associado à tuberculose em um estudo realizado com amostras da Indonésia e Vietnã¹⁵² e à progressão da síndrome da imunodeficiência humana e aumento da carga viral em adultos¹⁵³, porém não houve relação com o desenvolvimento de sepse em pacientes com grandes traumas¹⁵⁴.

Em relação à malária esse polimorfismo já foi analisado em alguns estudos. Omar *et al.*⁸⁶ encontraram que o genótipo 1174GG aumentava o risco de sintomas

4,8 vezes e Sam-Agudu *et al.*⁸⁷ demonstraram que os alelos -1237C e 1174G foram associados com um aumento nos níveis de IFN- γ em crianças com malária cerebral.

1.2 Malária

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e naturalmente transmitida ao homem através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*¹⁵⁵. Cinco espécies do gênero *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*) podem infectar humanos, onde *P. falciparum* causa a doença mais grave e consequentemente com altas taxas de mortalidade¹⁵⁶.

Cerca de 3,2 bilhões de pessoas continuam sob o risco de malária. De acordo com as últimas estimativas da WHO¹⁵⁵, em 2015 ocorreram 214 milhões de novos casos com aproximadamente 438.000 mortes. Entre 2000 e 2015 a incidência e a mortalidade diminuíram globalmente, 37% e 60% respectivamente. Mesmo com o progresso para eliminação da malária em países Asiáticos, Africanos e Sul-Americanos, a malária continua como o principal problema de saúde em muitos países e regiões tropicais com um fraco sistema de saúde¹⁵⁷.

Nas Américas, no período de 2000 a 2015, a mortalidade diminuiu 72%, mas ainda hoje 121 milhões de pessoas em 21 países (do total de 35) estão sob o risco de malária. O *P. vivax* é o principal agente etiológico, responsável por 70% dos casos¹⁵⁵. Segundo a WHO¹⁵⁵, o Brasil foi responsável por 37% dos casos de malária reportados nas Américas em 2013. De janeiro de 2016 a julho de 2017, o país registrou 204.501 casos da doença, sendo o *P. vivax* o principal agente envolvido¹⁵⁸.

A malária tem um largo espectro de manifestações que variam desde a malária assintomática, sintomática e até infecção grave. Embora a doença grave aconteça entre 1 e 2% de todos os casos, as manifestações clínicas da doença são responsáveis por grande impacto sócio-econômico¹⁵⁶. A composição genética do hospedeiro e sua imunidade são fatores determinantes para o desfecho clínico das infecções, assim como para a transmissão da doença¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Estudos demonstraram que crianças até 10

anos de idade foram os maiores reservatórios para transmissão da doença em áreas hiperendêmicas¹⁵⁹. Na Amazônia peruana, pacientes com *P. vivax* foram incapazes de infectar mosquitos *Anopheles darlingi*, sinalizando para a possibilidade de que algum grau de imunidade esteja presente em populações dessa área de baixa intensidade de transmissão da malária¹⁶⁰.

A contribuição genética na suscetibilidade para malária é bem documentada com o traço falcêmico, variantes da hemoglobina C e deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase conferindo proteção contra doença grave¹⁶². Por outro lado, a α -talassemia aumenta a susceptibilidade à malária não complicada enquanto confere proteção contra malária grave¹⁶³. Então é possível que os mecanismos responsáveis pela proteção contra malária não complicada e contra a malária grave sejam diferentes. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que em áreas endêmicas para malária, a imunidade para doença grave é alcançada primeiramente, enquanto a suscetibilidade à malária não complicada ainda permanece^{85, 164}.

1.2.1 O Ciclo de Vida dos Plasmódios.

Para todas as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, o ciclo é basicamente o mesmo, iniciando com a entrada dos esporozoítas no hospedeiro vertebrado, atingindo a corrente sanguínea e infectando primariamente os hepatócitos. Após o ciclo hepático os parasitas seguem para o ciclo assexuado eritrocítico que é o responsável pelos sintomas da doença. Em algum momento parte dos parasitas darão origem aos gametócitos que se ingeridos durante a alimentação dos mosquitos continuarão o ciclo. O ciclo de vida está esquematizado na Figura 3¹⁶⁵. *Plasmodium* sp possui um ciclo de vida complexo alternando entre mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* e hospedeiros vertebrados, necessitando invadir diferentes tipo celulares em estágios específicos de seu desenvolvimento e expressar proteínas especializadas para sua sobrevivência nos diferentes hospedeiros. Estas proteínas são necessárias para sobrevivência intracelular e extracelular, para invasão de uma variedade de tipos celulares e para seu escape da resposta imune^{166,167, 168}.

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium*.

Fonte: de Koning-Ward *et al.*¹⁶⁵ (com modificações).

O ciclo de vida do *Plasmodium* pode ser dividido em duas partes, (A) reprodução sexuada dentro do mosquito vetor e (B) multiplicação asexuada dentro do hospedeiro vertebrado.

Infecção. A infecção por *Plasmodium* sp. inicia-se quando os esporozoítos são injetados junto com saliva na pele do hospedeiro vertebrado durante a alimentação do mosquito. Uma vez depositado na pele, os esporozoítos móveis migram através da derme e invadem vasos sanguíneos¹⁶⁹. Eles podem levar de 1 a 3 horas para deixar a derme e atingir a corrente sanguínea. Os esporozoítos que permanecerem na pele serão destruídos e drenados pelo sistema linfático, onde será gerada uma resposta imune. A corrente sanguínea carregará o parasita até o fígado, onde este atravessará a barreira sinusoidal para atingir o órgão e então estabelecer o ciclo exoeritrocítico da infecção^{168, 170, 171}. Um denso revestimento cobre o esporozoíto e a proteína chave é a proteína circunsporozoita (CSP), que consiste em uma região altamente repetitiva e uma repetição tipo trombospondina 1 (TSR). A invasão dos hepatócitos requer a

ligação da CSP a proteoglicanos altamente sulfatados (HSPGs), ativando o processamento da CSP, removendo o N terminal e expondo o domínio TSR^{168, 172}. De 2 a 10 dias depois de instalado no fígado, cada esquizonte dará origem a centenas de merozoítos (esquizogonia exoeritrocítica) e então irá lançá-los na corrente sanguínea iniciando o ciclo eritrocítico. O trofozoíto irá se desenvolver e liberar os merozoítos na corrente sanguínea. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítos podem não seguir essa etapa de reprodução e manter estágios dormentes (hipnozoítos) no fígado. Estes estágios podem ser ativados e lançados na corrente sanguínea, como merozoítas, após semanas, meses ou até mesmo anos¹⁶⁸.

Invasão do eritrócito. Os merozoítos presentes na circulação invadem os eritrócitos. A proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP1) é a principal proteína associada a GPI na superfície do merozoíto¹⁷³. A MSP1 atua como uma plataforma sobre a superfície do merozoíto para ao menos três complexos com diferentes proteínas extrínsecas que se ligam ao eritrócito¹⁷⁴. Após infectar o eritrócito o parasita é envolvido dentro do vacúolo parasitóforo, onde ele irá progredir através dos estágios de desenvolvimento: anel (estabelecimento), trofozoíto (crescimento) e esquizonte (divisão). Nas próximas horas haverá uma divisão celular (esquizogonia eritrocítica) que resultará em novos merozoítos que romperão a membrana celular e liberarão novos parasitas para nova invasão de eritrócitos. Para sobreviver no eritrócito, o parasita exporta proteínas para citoplasma da célula infectada. No caso de *P. falciparum*, estas proteínas exportadas modelam o eritrócito, permitindo a absorção de nutriente e exportação de resíduos, alterando as propriedades físicas da membrana do eritrócito para promover citoadesão, processo mediado pela inserção da proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1)¹⁶⁵. A esquizogonia exoeritrocítica ocorre somente uma vez (*P. falciparum* e *P. malariae*), enquanto a eritrocítica ocorre ao decorrer da doença. Cada ciclo eritrocítico lança novos merozoítos e gera as “ondas” febris características¹⁶⁸.

Formação dos gametócitos. Durante os ciclos de esquizogonia na corrente sanguínea, uma parte dos parasitas desenvolve as formas sexuais (gametócitos) femininas e masculinas, durante a gametocitogênese¹⁶⁸. No caso de *P. falciparum*, elas se desenvolvem dentro dos eritrócitos através de cinco estágios morfológicamente distintos, desde um estágio jovem, parecido com um anel, até a

forma de um gametócito maduro¹⁶⁵. A transmissão de malária de humanos para mosquitos depende do desenvolvimento destes estágios sexuais. Estímulos ambientais como alta parasitemia e exposição a drogas estão associados com aumento na produção de gametócitos, indicado que estes parasitas são sensíveis ao ambiente¹⁶⁸.

Desenvolvimento no mosquito. Mosquitos do gênero *Anopheles* são os vetores para o *Plasmodium*. Mais que 400 espécies de mosquitos *Anopheles* já foram descritas, sendo aproximadamente 70 destas espécies vetores potenciais para malária em humanos¹⁷⁵. No vetor natural, o ciclo de vida se inicia quando a fêmea do mosquito se alimenta de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado e ingere os gametas dos parasitas presentes no sangue^{176, 177}.

No intestino do mosquito, os gametócitos masculinos iniciam três etapas de replicação de DNA e exoflagelação gerando oito microgametas móveis; cada microgameta móvel irá fertilizar um macrogameta formando um zigoto. O zigoto dará origem a uma forma móvel do parasita conhecida como oocineto. O oocineto quando penetra na parede do intestino do mosquito “encista”, formando o oocisto. Neste estágio o parasita inicia uma replicação assexuada, levando a formação dos esporozoítos (esporogonia). Com exceção do zigoto, o *Plasmodium* é haplóide durante todo o ciclo¹⁶⁵. O oocisto se rompe, liberando os esporozoítos que migrarão até a glândula salivar. O ciclo se repete quando estas formas são injetadas no hospedeiro humano durante a próxima alimentação do mosquito^{165,178-181}.

A duração de cada fase varia de acordo com a espécie de *Plasmodium* (Tabela 5)¹⁸².

Tabela 5 - Duração de cada fase do ciclo para cada espécie de *Plasmodium*.

	Espécies de <i>Plasmodium</i>			
	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
Ciclo exoeritrocítico (dias)	6-8	9	14-16	5-7
Ciclo eritrocítico (horas)	48	50	72	48
Período de incubação (dias)	12-17	16-18	18-40	9-14
	ou meses	ou mais	ou mais	
Esporogonia (dias)	8-10	12-14	14-16	9-10

Fonte: Malawest *website*¹⁸².

1.2.2 Epidemiologia da Malária.

As cinco espécies que podem causar malária em humanos distribuem-se diferentemente no mapa mundial. *P. falciparum* ocorre na África tropical, em partes da Ásia, no oeste do Pacífico, na América do Sul e Central, no Haiti e na República Dominicana; *P. vivax* é quase ausente da África, mas é a espécie predominante na Ásia e nas Américas do Sul e Central; *P. malariae* é encontrado no mundo todo, mas tem uma distribuição muito pontual; *P. ovale* ocorre principalmente no oeste da África tropical e raramente no oeste do Pacífico; e *P. knowlesi* é encontrado em todo o Sudeste da Ásia como um patógeno natural de macacos, mas foi recentemente demonstrado que é uma causa significativa da malária zoonótica naquela região, particularmente na Malásia¹⁸³.

A malária é transmitida em 97 países e a transmissão é influenciada por fatores ambientais que agem na capacidade do mosquito vetor em manter o ciclo do parasita. O nível de transmissão é determinado pela frequência do contato entre o mosquito e o homem, sendo influenciado pela densidade vetorial, sua localização e seus hábitos alimentares (Figura 4)¹⁸⁴. O nível de transmissão é crítico para determinar um panorama para malária em comunidades expostas. Em áreas onde o risco de picadas infectivas é baixo ou imprevisível a doença continua instável¹⁸⁵.

Nas Américas, as áreas com alta transmissão estão localizadas principalmente na região de floresta Amazônica, que se estende através de nove países (Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa). Brasil e Colômbia foram responsáveis por 68% dos casos em 2010^{177, 186}.

No Brasil, 99,8% da malária está concentrada na Região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão), onde aproximadamente 129.000 casos em 2016¹⁵⁸ e *P. vivax* e *P. falciparum* são responsáveis por 83,7% e 16,3% dos casos¹⁸⁷. *P. malariae* raramente é observado, mas acredita-se que sua incidência seja subestimada devido à dificuldade de diagnóstico desta espécie através do método de gota espessa¹⁸⁷.

Figura 4 - Distribuição da população sob risco de malária em 2015.

Fonte: Global Malaria Mapper¹⁷² (com modificações).

Fora da Região Amazônica 492 casos foram registrados em 2016 em diferentes estados brasileiros, principalmente em São Paulo (139), Rio de Janeiro (51), Minas Gerais (49), Goiás (45) e Espírito Santo (48)¹⁵⁸. Muitos desses casos foram devido à migração da Região Amazônica ou do continente Africano, mas alguns casos foram autóctones da região de Mata Atlântica. Nesta a transmissão é esporádica e os casos de malária são principalmente devido à transmissão por *Anopheles (Kerteszia)* que se reproduzem na água represada nas bromélias que são abundantes nessa região. Possivelmente a transmissão é mantida pelo envolvimento da infecção de macacos, com a presença de *P. vivax* e *P. malariae*^{177, 187-190}.

1.4.3 Epidemiologia da Malária no Estado de São Paulo.

A transmissão da malária autóctone no Estado de São Paulo caracteriza-se principalmente pela transmissão persistente na região leste, que abriga o bioma da

Mata Atlântica^{187,191}. Em 2016, 9 casos de malária foram notificados no estado nessa região¹⁵⁸.

Esses casos ocorrem com baixos níveis de parasitemia causados por *P. vivax*¹⁹¹⁻¹⁹⁶ e *P. malariae*¹⁹⁷⁻²⁰⁰. Em um estudo que analisou dados de 1980-2007, os municípios com maior número de casos de malária foram Peruíbe (135), Juquitiba (81), São Paulo (65), São Sebastião (58), Miracatu (44), Iporanga (36), Pedro de Toledo (36) e Sete Barras (35), todos localizados no bioma da Mata Atlântica^{191,196}.

Esses casos podem estar relacionados aos primatas do gênero *Alouatta* (bugios) e *Cebus* (macaco-prego), infectados com parasitas como *P. brasilianum* e *P. simium*, que eventualmente podem infectar mosquitos e transmitir a infecção ao homem, causando malária com discreta parasitemia e sintomatologia ou mesmo casos assintomáticos²⁰¹.

Portanto, visto que a suscetibilidade à malária, assim como a presença ou ausência de sintomas da doença têm sido associados a variações genéticas nos genes que codificam TLRs em diversas regiões endêmicas^{42,45, 81-89} e considerando que no Brasil os estudos sobre polimorfismos em TLRs e malária^{79,80,94} são oriundos da Região Amazônica, este estudo foi desenhado para avaliar o papel desses polimorfismos em indivíduos residentes na região de Mata Atlântica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral.

Investigar a relação entre a presença de polimorfismos nos genes TLRs e a presença de malária e/ou anticorpos antiplasmodiais, em indivíduos de área de baixa endemicidade do Estado de São Paulo, visando identificar uma associação genética para uma maior ou menor suscetibilidade à infecção neste grupo de pessoas em risco.

2.2 Específicos.

- a) Analisar a frequência dos polimorfismos na população de Juquitiba;
- b) Analisar a ancestralidade dos indivíduos provenientes do município de Juquitiba;
- c) Analisar a associação individual e em conjunto dos polimorfismos em TLRs e malária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras, extração de DNA e análises prévias.

Em atividade de busca ativa realizada pela SUCEN durante o projeto de pesquisa “Malária autóctone em áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo: caracterização do problema e subsídios para seu controle”, apoio FAPESP- Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (Processo no. 03/06420-0 – Coordenador Gerhard Wunderlich) foram coletadas amostras de sangue de moradores do município de Juquitiba, localizado na região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Figura 5)²⁰², em três períodos de coleta, durante três anos.

Figura 5 - Origem geográfica das amostras usadas nesse estudo.

Fonte: Guimarães *et al.*²⁰².

Cinco mililitros de sangue foram coletados e o DNA genômico foi obtido através de extração com o uso de resina comercialmente disponível GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante.

O diagnóstico molecular de malária foi realizado pelo Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN (NEM/SUCEN), situado no Ambulatório dos Viajantes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A detecção da espécie de *Plasmodium* foi realizada por PCR de acordo com um protocolo gênero-específico²⁰³ que utiliza oligonucleotídeos em sequências conservadas nos genes que codificam *ssrRNA* (subunidade ribossomal menor) de todas as espécies de *Plasmodium*. A identificação da espécie foi realizada com posterior sequenciamento do fragmento e análise da sequência por BLASTN^{204,205}. Assim, foram detectados casos positivos para *P. vivax* e *P. malariae*.

As amostras foram analisadas também pela técnica de ELISA, conforme Levitus *et al.*²⁰⁶, quanto à presença de anticorpos IgG contra uma proteína recombinante que representa a região C-terminal da proteína de superfície do merozoítos de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) expressa em *Escherichia coli* como uma proteína de fusão glutathione S-transferase (GST). O ensaio foi realizado no Laboratório de Imunoepidemiologia da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) pela Dra Izilda Curado.

Como esse estudo foi um estudo longitudinal onde foram coletadas várias amostras de cada paciente, foram consideradas amostras positivas se alguma das diferentes amostras testadas foi positiva. As amostras negativas são aquelas onde todas as amostras analisadas para aquele paciente por determinada técnica foram negativas. Assim, foram obtidos 195 residentes com pelo menos uma amostra analisada para as duas técnicas (PCR e PvMSP1₁₉).

3.2 Amplificação do genoma inteiro.

Considerando o pequeno volume de DNA genômico das amostras, foi realizada uma pré-amplificação genômica conhecida como WGA (“*whole genome amplification*”), baseada em amplificação por deslocamento múltiplo com uma DNA polimerase capaz de replicar até 100 kb sem dissociar-se do DNA molde. Esta enzima possui atividade de exonuclease de 3’ a 5’, garantindo a fidelidade dos produtos durante a replicação. Através dessa metodologia até 40 µg de DNA podem ser gerados em 50 µl de reação²⁰⁷. Esta técnica já foi utilizada em análise de

microssatélites de *P. vivax* e *P. malariae*, com excelente concordância com os resultados obtidos diretamente a partir de DNA genômico^{208,209}. O kit REPLIg (Qiagen, Valencia, CA) foi empregado para essa amplificação do genoma inteiro e foi utilizado conforme as instruções do fabricante.

3.3 Genotipagem dos SNPs.

PCR-RFLP (“*restriction fragment length polymorphism*”). Os polimorfismos I602S, D299G, P249S, -1237T/C e -1486T/C, foram genotipados por PCR-RFLP. Os primers usados nas reações vieram de trabalhos anteriores. As condições da PCR, digestão e eletroforese em gel de agarose sofreram modificações e são detalhadas na tabela 6. Controles conhecidos para cada SNP foram usados nas reações de PCR e de digestão.

Sequenciamento. Os SNPs P631H, R650Q, L658P, P669L, R677W, F679I, I693T, E694D, Y715N, F722L, R723C, N729S, E738Q, P746S, R748H, R753Q, T399I e 1174G/A foram genotipados por sequenciamento (Tabela 7). A reação de sequenciamento foi realizada em ambas as fitas utilizando o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Primeiramente, foram acrescentados 1 µl do oligonucleotídeo 5 pmol, 3,25 µl do tampão “*Save Money*”, 0,75 µl de BigDye, 1 µl do produto de PCR e 4,5 µl de água ultrapura. A termociclagem foi a seguinte: 96 °C por 60 seg; 96 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg, 60 °C por 4 min, 35 ciclos. Para a precipitação do material foi adicionado 90 µl de isopropanol 66% e mantido a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foi realizada a centrifugação do material a 12.000 rpm por 20 minutos e foi descartado o sobrenadante. A lavagem da amostra foi feita com 150 µl de isopropanol 75% e centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o isopropanol foi removido e a amostra permaneceu à temperatura ambiente até completa evaporação do álcool. A amostra recebeu então 10 µl de formamida, foi desnaturada e aplicada em sequenciador de capilar 3100 (Applied Biosystems) do Departamento de Parasitologia do ICB/USP.

Tabela 6 - Condições da PCR-RFLP

SNP	Oligonucleotídeos	Tamanho fragmento	Ref.	Ciclagem	Concentrações dos reagentes	Enzima de restrição	Concentração do Gel de agarose	Resultado eletroforese
I602S	F:GGAAAGTTATAGAGG AACCCT R:CTTCACCCAGAAAGA ATCGTGCC	280pb	79	95 °C 5min (1X); 95 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 30s (35X); 72 °C 7min (1X)	3mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 200 µM dNTPs mix; 40nM cada primer; 0,6 U <i>taq</i> <i>Platinum</i>	<i>AluI</i> (3U) 37 °C- 2h 65 °C- 20min	2%	S: 129+151 I: 280
D299G	F:GATTAGCATACTTAG ACTACTACCTCGATG R:GATCAACTTCTGGCC CCAGCATTCAC	249pb	79	95 °C 4min (1X); 95 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 30s (35X); 72 °C 10min (1X)	2mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 125 µM dNTPs mix; 250 nM cada primer; 0,5 U <i>taq</i> <i>Platinum</i>	<i>NcoI</i> (3U) 37 °C- 2h 65 °C- 20min.	3%	G:30+219 D: 249
P249S	F:GCATTTCGAAGTCGTT TCTATGT R:GCAAAAACCCTTCAC CTTGTT	210pb	79	95 °C 5min (1X); 95 °C 30s, 63 °C 30s, 72 °C 30s (35X); 72 °C 7min (1X)	3mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 200 µM dNTPs mix; 40nM cada primer; 0,6 U <i>taq</i> <i>Platinum</i>	<i>AvaII</i> (3U) 37 °C- 1h	3%	P:50+160 S: 210
-1237 T/C	F:CTGCTTGCAGTTGACT GTGT R:ATGGGAGCAGAGAC ATAATGGA	135pb	210	95 °C 4min (1X); 95 °C 30s, 61 °C 20s, 72 °C 18s (40X); 72 °C 5min (1X)	1,5 mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 164 µM dNTPs mix; 160nM cada primer; 0,5 U <i>taq</i> <i>Pfu</i>	<i>BstNI</i> (3U) 60 °C- 2h	3%	C:27+48+6 0 T: 27+108
-1486 T/C	F:TATCGTCTTATTCCCC TGCTGGAATGT R:TGCCCAGAGCTGACT GCTGG	145pb	79	95 °C 5min (1X) 95 °C 30s, 62 °C 30s, 72 °C 30s (35X); 72 °C 7min (1X)	2mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 125 µM dNTPs mix; 250 nM cada primer; 0,5 U <i>taq</i> <i>Platinum</i>	<i>AflIII</i> (6U) 37 °C- 2h 65 °C- 20min.	3%	T:34+111 C:145

Abreviações: F: oligonucleotídeo *Forward*; R: oligonucleotídeo *Reverse*; U: unidades; Ref.: Referência.

Tabela 7 – Oligonucleotídeos e condições da PCR nos SNPs genotipados por sequenciamento.

TLR	SNP	Oligonucleotídeos	Referência	Ciclagem	Concentrações dos reagentes
2	P631H		211	94 °C 4min (1X); 94 °C 1min e 45s, 66,7 °C 1s, 72 °C 1s (45X); 72 °C 10min (1X)	1,5 mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 125 µM dNTPs mix; 125 nM cada primer; 0,8 U <i>Taq Pfu</i>
	R650Q				
	L658P				
	P669L				
	R677W				
	F679I				
	I693T	F:GTCGGAATGTCAC			
	E694D	AGGACAGC			
	Y715N	R:GAACCTAGGACTT			
	F722L	TATCGCAGC			
	R723C				
	N729S				
	E738Q				
	P746S				
	R748H				
	R753Q				
4	T399I	F:GGTTGCTGTTCTCA AAGTGATTTTGGGA GAA	211	95 °C 4min (1X); 95 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 30s (35X); 72 °C 10min (1X)	3mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 125 µM dNTPs mix; 125nM cada primer; 0.8 U <i>Taq Platinum</i>
		R:ACCTGAAGACTGG AGAGTGAGTTAAAT GCT			
9	1174	F:TTCTGCAGGTAGG GCTTGGAG	211	94 °C 4min (1X); 94 °C 1min e 45s, 68,5 °C 1min, 72 °C 1min(45X); 72 °C 10min (1X)	1,5 mM MgCl ₂ ; Tampão 1X; 125 µM dNTPs mix; 125 nM cada primer; 0,8 U <i>Taq Pfu</i>
	G/A	R:GACAAGGAAAGGC TGGTGACAT			

3.4 Análise de fragmentos.

O marcador TLR2 (GTn) foi genotipado usando os primers descritos por Greene *et al.*²¹¹, as condições da PCR sofreram algumas modificações e foi estabelecido um protocolo de eletroforese capilar. Os oligonucleotídeos utilizados foram *Forward*: FAM-TCATTCGTTCCATTCATCTG e *Reverse*: TTGAGAAATGTTTTCTAGGC, o primer *forward* foi marcado com um fluoróforo. O perfil de ciclagem usada: 95°C 4min (1X); 95°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1min (46X); 72°C 10min (1X). Os reagentes foram usados nas seguintes concentrações: 2,5mM MgCl₂; Tampão 1X; 125 µM dNTPs mix; 125nM cada primer; 0,8 U *Taq Platinum*. Um microlitro do produto da

PCR de cada amostra foi separado, após diluição (1/100), em um sequenciador de capilar multiusuário ABI3500 (Applied Biosystems) com 13,85 µl Formamida HiDi e 0,15 µl do padrão de peso molecular (GeneScan ROX 500, Applied Biosystems). A reação de eletroforese capilar foi realizada no sequenciador de capilar multiusuário ABI3500 (Applied Biosystems) do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM-07) do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP. O tamanho dos fragmentos amplificados e a altura dos picos foram analisados pelo programa STRand²¹². O número de repetições GTn foi classificado de acordo com o seu tamanho⁴¹, em S (“*short*”) se o marcador fosse ≤ 16 repetições, ou seja ≤ 96 pb; em M (“*medium*”) o marcador entre 17 a 22 repetições, ou seja de 98 a 108 pb e L (“*large*”) marcadores ≥ 23 repetições, ou seja ≥ 110 pb.

3.5 Análise da Ancestralidade.

Para essa análise foi escolhida uma metodologia que usa marcadores autossômicos por sofrerem recombinação a cada geração, registrando as histórias de ambas as linhagens masculina e feminina²¹³, diferentemente de metodologias baseadas em marcadores uniparentais, como DNA mitocondrial e polimorfismos no cromossomo Y.

Neste trabalho foi usada uma metodologia baseada em marcadores INDELs que possuem significantes diferenças na frequência dos alelos entre as principais populações, fazendo que esta classe de marcadores seja adequada para análise de ancestralidade biogeográfica²¹⁴. Para avaliar a ancestralidade genômica foram usados 62 marcadores de ancestralidade bialélicos do tipo inserção-deleção (INDELS). Estes marcadores são de cromossomos autossômicos e foram selecionados baseados em três critérios: (A) grandes diferenças nas frequências alélicas entre populações Africanas, Europeias e Ameríndias; (B) localização em cromossomos diferentes ou em regiões físicas distantes de um mesmo cromossomo e (C) variabilidade de tamanho entre 3 e 40 pb para realizar a genotipagem simultânea de vários marcadores. Estes marcadores foram previamente selecionados e usados em Santos

*et al.*²¹⁵ e são usados para avaliar a contribuição genética parental entre diferentes populações²¹⁶.

As 195 amostras foram genotipadas para os 62 INDELS usando três reações de amplificação do tipo PCR multiplex com os pares de primers marcados com fluorescência²¹⁵. Todas as reações foram realizadas em um volume final de 7 µl com 10 ng de DNA, 10 µM de cada primer e Taq PCR Master Mix 1X (Qiagen). As condições da amplificação do PCR foram: 11 min a 95°C seguidos por 1 min a 94°C; 1 min a 60°C e 2 min a 70°C por 10 ciclos, seguidos por 1 min a 90°C, 1 min a 60° e 2 min a 70° por 17 ciclos e uma extensão final de 60 min a 60°C²¹⁶.

Para eletroforese capilar, 1 µl do produto final do PCR foi adicionado em um mix contendo 8,7 µl de Formamida HI-DI (Applied Biosystems) e 0,3 µl do padrão de tamanho GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA foram separados usando o Sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e os genótipos foram analisados com o Software GeneMapper IDv3.2 (Applied Biosystems). O alelo de tamanho menor foi codificado como 1 e o de tamanho maior como 2.

A estimativa da ancestralidade individual das amostras de Juquitiba foi realizada com o Software Structure v.2.3.4 que usa o modelo Bayesino (MCMC: Markov Chain Monte Carlo)²¹⁷⁻²²⁰. As principais populações de origem no Brasil são Europeias, Africanas e Ameríndias, portanto três subpopulações (k= 3) foram modeladas. A ancestralidade genética quantitativa foi estimada para os indivíduos, incluindo descendentes contemporâneos de populações originais (pseudoancestrais)²¹⁹ avaliados por Santos *et al.*²¹⁵ e Francez *et al.*²²¹.

O modelo de ancestralidade Admixture model foi usado assumindo frequência alélica da população correlacionadas com um período de 100000 e 1000000 interações.

As frequências alélicas encontradas foram comparadas com as frequências encontradas em outros estudos em banco de dados internacionais como o projeto 1000Genomes⁴⁰ e HapMap⁴⁶. Com essas comparações procurou-se avaliar se as frequências encontradas estavam de acordo com o esperado para populações europeias.

3.6 Estudos de Associação.

3.6.1 Associação dos polimorfismos em TLR e ancestralidade.

As análises foram realizadas no Software R, versão 3.3.2²²². O pacote de Genética foi usado para obter: (a) as frequências alélicas e genotípicas para cada variante; (B) os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste Chi-quadrado e (c) o desequilíbrio de ligação (LD) entre os pares de loci (TLR1 I602S/TLR6 P249S; TLR2P631H/TLR2 R753Q; TLR4 D299G/TLR4 T399I; e TLR9-1237T.C/-1486T.C/1174G.A) usando o parâmetro D' ²²³.

O método de máxima verossimilhança, que utiliza o algoritmo de maximização de expectativas (parte do pacote haplo.stats), foi usado para estimar as frequências haplotípicas²²⁴. Para avaliar diferenças nas proporções de cada ancestral entre os diferentes genótipos foi usada a análise de variância (ANOVA) e o teste tStudent no pacote agrícola²²⁵.

Para pesquisar graficamente a associação dos polimorfismos com a ancestralidade individual estimada, um modelo de regressão logística binária foi construído usando o pacote ggplot²²⁶.

3.6.2 Associação dos polimorfismos em TLRs e malária.

Os marcadores de ancestralidade foram re-codificados de acordo com a regra: 11 → 0, 12 → 1 e 22 → 2 e a redução de dimensionalidade utilizando análise de componentes principais²²⁷⁻²²⁹ da matriz de correlação.

Para o estudo de associação foi utilizada a modelagem por regressão logística²²⁹⁻²³¹ sendo que os modelos com significância estatística foram submetidos a um ajuste para pequenas amostras²³²⁻²³⁷.

A idade foi centralizada pela média (38 anos) e o sexo foi codificado em "0" para as mulheres e "1" para os homens.

Dada a pequena quantidade de indivíduos não-afetados (controle), os SNPs foram codificados como "0" no caso de homozigotos do alelo mais frequente e "1" no caso do genótipo possuir pelo menos um alelo menos frequente, de forma a evitar que as tabelas de contingência tivessem alguma casela nula, o que comprometeria o ajuste dos modelos de regressão. As tabelas de contingência estão agrupadas por similaridade de nomenclatura dos SNPs (Quadro 1).

TLR1		I602S	
		Controle	Caso
HH=0		18	40
Hh, hh=1		45	92

TLR2		P631H		R753Q	
		Controle	Caso	Controle	Caso
HH=0		62	123	61	128
Hh, hh=1		1	9	2	4

TLR4		D299G		T399I	
		Controle	Caso	Controle	Caso
HH=0		58	119	59	119
Hh, hh=1		5	13	4	13

TLR6		P249S	
		Controle	Caso
HH=0		31	76
Hh, hh=1		32	56

TLR9		-1237T/C		-1486T/C		1174G/A	
		Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso
HH=0		47	74	24	67	15	38
Hh, hh=1		16	58	39	65	48	94

Quadro 1 – Tabelas de Contingência por SNP agrupadas por nomenclaturas similares.

3.6.2.1 Regressão Logística.

Para o estudo de associação foi utilizada a regressão logística. Assim, considerando p a probabilidade da positividade para malária o modelo ficou:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \mu + \beta_1 X_1$$

Onde X_1 é a variável independente para o genótipo do SNP, com codificação 0 para HH e 1 para Hh ou hh (considerando "h" como sendo uma cópia do alelo de menor frequência) e μ e β_1 são, respectivamente, o intercepto e o coeficiente obtido pelo ajuste do modelo.

Este modelo permite a inclusão de outras variáveis (denominadas co-variáveis) cada qual com o seu respectivo coeficiente.

Dessa forma o estimador de p será:

$$\hat{p}(X_1) = \frac{e^{\mu+\beta_1 X_1}}{1 + e^{\mu+\beta_1 X_1}}$$

E, portanto:

$$\hat{p}(ODDS) = \frac{\hat{p}(genótipo)}{1 - \hat{p}(genótipo)} = e^{\mu+\beta_1 X_1}$$

Ou, ainda:

$$\begin{aligned}\hat{p}(0) &= \hat{p}(HH) = e^{\mu} \\ \hat{p}(1) &= \hat{p}(Hh, hh) = e^{\mu+\beta_1}\end{aligned}$$

$\hat{p}(0)$ é chamado de risco basal, ou em outras palavras, o risco de contrair malária quando a variável independente (e as co-variáveis se existirem) forem iguais a zero. Chegamos então ao estimador do *Odds Ratio*:

$$\hat{\theta}_{Hh,hh} = \frac{\hat{p}(Hh,hh)}{\hat{p}(HH)} = e^{\beta_1}$$

Assim, o risco de contrair malária aumenta em e^{β_1} quando $\beta_1 > 0$ ou diminui em e^{β_1} quando $\beta_1 < 0$.

No modelo foram adicionadas algumas co-variáveis como sexo, idade, Unidade Domiciliar (UD) categorizada usando o endereço dos indivíduos e a Análise Componente Principal (CP) obtida a partir dos dados de ancestralidade.

3.7 Aspectos éticos.

Todas as amostras fazem parte da coleção do Núcleo de Estudos em Malária, conforme as diretrizes contidas na Resolução nº 347, de 13 de janeiro de 2005 do Conselho Nacional de Saúde que foi constituída mediante solicitação à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). A utilização dessas amostras neste estudo foi autorizada pela responsável por sua guarda (Dra. Silvia Maria Di Santi, Chefe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN). Adicionalmente, este projeto foi aprovado em 24 de outubro de 2011 pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1022/CEP) (Anexo A).

4 RESULTADOS

4.1 Marcadores polimórficos, análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação.

Todos os marcadores foram amplificados em todos os indivíduos, porém apenas nove SNPs (TLR1 I602S; TLR2 P631H e R753Q; TLR4 D299G e T399I; TLR6 P249S; TLR9 -1486T/C, -1237T/C e 1174G/A) e o microssatélite (TLR2 GTn) foram polimórficos nas amostras de Jucituba. Todos os outros marcadores foram monomórficos. Todos os polimorfismos estavam nas proporções esperadas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, após a correção de Bonferroni ($\alpha = 0,005$). Desequilíbrio de ligação absoluto não foi encontrado nessas amostras, mas exceto para os pares rs5743836 e rs187084 no cromossomo 3, todos os outros pares estavam em desequilíbrio de ligação ($D' > 0,7$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise do desequilíbrio de ligação dos genes na mesma região cromossômica.

		rs5743618 TLR1 I602S	rs5743810 TLR6 P249S
	rs5743618 TLR1 I602S rs5743810 TLR6 P249S	31702	0,885083
4p14			
	rs5743704 TLR2 P631H rs5743708 TLR2 R753Q	366	0,9022452*
4q31.3			
	rs4986790 TLR4 D299G rs4986791 TLR4 T399I	300	0,9446748
9q32-33			
	rs5743836 TLR9 -1237TC rs187084 TLR9 -1486TC rs352139 TLR9 1174GA	249 2410	0,4015296 2659
3p21.3			
			0,7004501 0,9249534

Estimativas em pares do desequilíbrio de ligação D' (diagonal superior) e distância física entre os SNPs em pares de bases (diagonal inferior). *($p=0,68$).

4.2 Estimativa da Ancestralidade.

Com base nos 62 marcadores INDELs a maior contribuição nas amostras é a ancestralidade genômica predominantemente Europeia (63%) seguida pela contribuição genômica Africana (22%) e Ameríndia (15%) (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática da proporção de ancestralidade obtida na população de Juquitiba. As imagens foram geradas pelo Software STRUCTURE para amostras de referência do banco de dados Santos *et al.*²¹⁵ e amostras dos indivíduos de Juquitiba – SP, usando 62 INDELs (A) Gráfico triangular: cada indivíduo é representado por um ponto, e a proporção da mistura correspondente é indicada pela distância das extremidades do triângulo. As cores vermelha, verde e azul correspondem aos indivíduos das populações parentais (Europeus, Ameríndios e Africanos respectivamente), e os indivíduos de Juquitiba são representados pelos pontos amarelos; (B) Gráfico de Barra: cada linha vertical representa um indivíduo e a proporção de mistura correspondente (Vermelho: Europeu, Verde: Ameríndio e Azul: Africano).

4.3 Associações dos genótipos encontrados e ancestralidade.

A proporção dos alelos e dos genótipos encontrados no estudo e sua distribuição entre os três grupos ancestrais estão descritos na tabela 9. As frequências dos SNPs encontradas neste estudo foram disponibilizadas em um banco de dados *on-line* para SNPs denominado ALFRED²³⁸.

A análise da variância demonstrou que as proporções das ancestralidades Europeia e Africana diferiram significativamente entre os genótipos no TLR1 I602S ($p=2,59E-06$ e $0,000149$, respectivamente). O teste Tukey indicou que a ancestralidade Europeia foi maior para o genótipo GG que para o TG ($p=0,001$) e TT ($p=0,001$). Para a ancestralidade Africana, o teste indicou que o genótipo TT foi maior que os genótipos TG ($p=0,001$) e GG ($p=0,001$). No TLR6 P249S e no microssatélite no TLR2, a proporção de ancestralidade Europeia também divergiu significativamente entre os genótipos ($p=0,0294$ e $0,0146$, respectivamente). No TLR6 P249S o teste indicou que a ancestralidade Europeia foi maior no genótipo CC que no TC ($p=0,001$) e TT ($p=0,001$). No GTn, o teste Tukey post hoc indicou que a ancestralidade Europeia foi maior para o genótipo SL que para todos os outros demais ($p=0,01$). Não houve diferenças estatísticas nas proporções de ancestralidade nos outros SNPs avaliados (Tabela 9).

Tabela 9 - Proporção genotípica dos polimorfismos em TLR nas ancestralidades Europeia, Ameríndia e Africana.

Polimorfismo	Genótipo	N	Proporção	EUR	AME	AFR
TLR1 I602S	T/T	58	0,297	0,538 (0,491-0,585)	0,167 (0,136-0,198)	0,295 (0,250-0,340)
(I=T; S=G)	T/G	95	0,487	0,636 (0,603-0,668)	0,158 (0,141-0,176)	0,206 (0,176-0,237)
	G/G	42	0,215	0,723 (0,686-0,759)	0,126 (0,104-0,147)	0,152 (0,121-0,183)
rs5743618				2,59E-06	0,216	0,000149
<i>p</i>						
TLR2 P631H	C/C	185	0,949	0,628 (0,604-0,652)	0,156 (0,142-0,170)	0,216 (0,194-0,238)
(P=C; H=A)	C/A	9	0,046	0,551 (0,380-0,721)	0,110 (0,067-0,153)	0,340 (0,179-0,500)
	A/A	1	0,005	0,546 (-)	0,073 (-)	0,382 (-)
rs5743704				0,642	0,324	0,151
<i>p</i>						
TLR2 R753Q	G/G	189	0,969	0,625 (0,600-0,650)	0,154 (0,140-0,168)	0,221 (0,198-0,244)
(R=G; Q=A)	G/A	5	0,026	0,645 (0,537-0,752)	0,127 (0,092-0,162)	0,228 (0,134-0,322)
	A/A	1	0,005	0,541 (-)	0,304 (-)	0,155 (-)
rs5743708				0,861	0,243	0,913
<i>p</i>						
TLR4 D299G	A/A	177	0,908	0,617 (0,592-0,643)	0,156 (0,142-0,171)	0,226 (0,203-0,250)
(D=A; G=G)	A/G	17	0,087	0,695 (0,620-0,770)	0,134 (0,100-0,169)	0,171 (0,111-0,231)
	G/G	1	0,005	0,830 (-)	0,063 (-)	0,107 (-)
rs5743708				0,102	0,421	0,301
<i>p</i>						
TLR4 T399I	C/C	178	0,913	0,619 (0,593-0,644)	0,156 (0,141-0,170)	0,225 (0,202-0,249)
(T=C; I=T)	C/T	15	0,077	0,681 (0,600-0,762)	0,139 (0,102-0,176)	0,180 (0,112-0,247)
	T/T	2	0,010	0,775 (0,667-0,883)	0,111 (0,017-0,205)	0,114 (0,100-0,128)
rs5743810				0,19	0,665	0,357
<i>p</i>						
TLR6 P249S	C/C	107	0,549	0,597 (0,562-0,631)	0,163 (0,143-0,183)	0,240 (0,209-0,272)
(P=C; S=T)	C/T	75	0,385	0,655 (0,619-0,690)	0,147 (0,128-0,166)	0,199 (0,165-0,232)
	T/T	13	0,067	0,691 (0,607-0,775)	0,121 (0,092-0,151)	0,188 (0,122-0,253)
rs5743810				0,0294	0,244	0,157
<i>p</i>						
TLR9 -1237T/C	T/T	121	0,621	0,635 (0,604-0,665)	0,156 (0,137-0,174)	0,210 (0,183-0,236)
rs5743836	T/C	65	0,333	0,620 (0,578-0,662)	0,154 (0,135-0,174)	0,225 (0,184-0,268)
	C/C	9	0,046	0,539 (0,443-0,635)	0,128 (0,082-0,173)	0,333 (0,220-0,447)
rs5743836				0,264	0,7	0,0728
<i>p</i>						

continua

continuação

Tabela 9 - Proporção genotípica dos polimorfismos em TLR nas ancestralidades Europeia, Ameríndia e Africana.

Polimorfismo	Genótipo	N	Proporção	EUR	AME	AFR
TLR9 -1486T/C rs187084	T/T	91	0,467	0,634 (0,598-0,669)	0,156 (0,135-0,176)	0,211 (0,178-0,243)
	T/C	83	0,426	0,609 (0,571-0,648)	0,150 (0,131-0,169)	0,241 (0,205-0,277)
	C/C	21	0,108	0,651 (0,589-0,713)	0,163 (0,120-0,207)	0,186 (0,137-0,235)
<i>p</i>				0,508	0,825	0,26
TLR9 1174A/G rs352139	A/A	53	0,272	0,645 (0,598-0,691)	0,160 (0,128-0,191)	0,196 (0,156-0,235)
	A/G	94	0,482	0,615 (0,580-0,650)	0,150 (0,133-0,167)	0,235 (0,203-0,267)
	G/G	48	0,246	0,624 (0,576-0,672)	0,155 (0,130-0,180)	0,221 (0,174-0,268)
<i>p</i>				0,606	0,838	0,352
TLR2 GTn	M/M	78	0,400	0,671 (0,636-0,707)	0,137 (0,117-0,156)	0,192 (0,161-0,223)
	M/L	72	0,369	0,588 (0,551-0,626)	0,163 (0,144-0,183)	0,248 (0,210-0,287)
	M/S	18	0,092	0,585 (0,485-0,684)	0,172 (0,117-0,226)	0,244 (0,153-0,335)
	L/L	18	0,092	0,611 (0,543-0,678)	0,178 (0,127-0,229)	0,211 (0,148-0,274)
	L/S	7	0,036	0,691 (0,518-0,864)	0,127 (0,005-0,248)	0,183 (0,059-0,306)
	S/S	2	0,010	0,418 (0,177-0,658)	0,204 (0,202-0,206)	0,379 (0,138-0,620)
<i>p</i>				0,0146	0,302	0,174

O teste exato de Fisher foi usado para determinar as diferenças nas frequências de genótipos entre os ancestrais. Os valores são expressos em *p*. Valores em negrito mostram $p < 0,05$; valores entre parêntese mostram o intervalo de confiança; (-) sem dados para calcular o intervalo de confiança.

Os resultados da regressão logística binária usando o modelo linear generalizado e implementado no software R são apresentados nas Figuras 7, 8 e 9. Nessa representação pode-se ver que a probabilidade de apresentar o alelo G no TLR1 I602S aumenta com o aumento da ancestralidade Europeia (Figura 7 A) e a probabilidade de apresentar o alelo T nesse mesmo marcador aumenta com o aumento da ancestralidade Africana (Figura 7 D). No TLR6 P249S a probabilidade de apresentar um alelo T aumenta com a ancestralidade Europeia (Figura 8A) e a probabilidade de apresentar um alelo C aumenta com a ancestralidade Africana (Figura 8C). A probabilidade de apresentar o alelo M no GTn aumenta de forma similar tanto na ancestralidade Europeia quanto na ancestralidade Africana (Figura 9A e B).

Figura 7 – Regressão logística ajustada descrevendo a associação entre ancestralidade e o marcador TLR1 I602S. **A e B**: Probabilidade de apresentar o alelo G e o alelo T de acordo com a ancestralidade Europeia. **D e E**: Probabilidade de apresentar o alelo G e o alelo T de acordo com a ancestralidade Africana. **E**: Probabilidade de apresentar o alelo T de acordo com a ancestralidade Ameríndia. As áreas cinza mostram o intervalo de confiança de 95%. As imagens foram geradas usando ggplot2 no software R.

Figura 8 – Regressão logística ajustada descrevendo a associação entre ancestralidade e o marcador TLR6 P249S. **A e B:** Probabilidade de apresentar o alelo T e o C de acordo com a ancestralidade Europeia. **C:** Probabilidade de apresentar o alelo C de acordo com a ancestralidade Africana. As áreas cinza mostram o intervalo de confiança de 95%. As imagens foram geradas usando ggplot2 no software R.

Figura 9 – Regressão logística ajustada descrevendo a associação entre ancestralidade e o marcador GTn. **A:** Probabilidade de apresentar um alelo M de acordo com a ancestralidade Europeia. **B:** Probabilidade de apresentar um alelo M de acordo com a ancestralidade Africana. As áreas cinza mostram o intervalo de confiança de 95%. As imagens foram geradas usando ggplot2 no software R.

Dezenove haplótipos nos genes de TLR1, 6, 2, 4 e 9 foram encontrados nas amostras estudadas com frequências variando de 0,00257 e 0,95385 (Tabela 10). Para avaliar se um dado haplótipo foi associado com as diferenças na proporção de ancestralidade o programa haplo.stats foi usado. Então, uma pontuação para cada haplótipo (hap.score) e um *p-value* para cada hap.score foi gerado. Se o haplótipo é associado com um aumento/diminuição na ancestralidade, uma pontuação positiva/negativa para este haplótipo é gerada.

Tabela 10 - Frequência dos haplótipos polimórficos encontrados e associação com ancestralidade.

Gene	refSNP	Região cromossômica	Haplótipo	Frequência	Africano		Europeu		Ameríndio	
					hap.score	p	hap.score	p	hap.score	p
TLR1 (T/G)	rs5743618	4p14	TT	0,01609	0,49026	0,62395	0,16219	0,87116	-1,0769	0,28152
			TC	0,52494	4,57006	0	5,50234	0	2,3575	0,0184
TLR6 (C/T)	rs5743810		GT	0,24289	-1,99296	0,04627	2,59965	0,00933	-1,38616	0,1657
			GC	0,21609	-3,65202	0,00026	3,96012	7e-05	-1,10362	0,26976
TLR2 631 (C/A)	rs5743704	4q31.3	CG	0,95385	-1,38354	0,1665	0,82603	0,40879	0,79003	0,42951
			CA	0,01795	-0,20439	0,83805	-0,13798	0,89026	0,58638	0,55762
753 (G/A)	rs5743708		AG	0,02821	1,9452	0,05175	-0,94278	0,34579	-1,50557	0,13218
			AA	-	-	-	-	-	-	-
TLR4 299 (A/G)	rs4986790	9q32-33	AC	0,94871	1,58372	0,11326	-2,08992	0,03662	1,14339	0,25288
			AT	0,00257	-0,63273	0,52691	0,55167	0,58117	0,05225	0,95833
399 (C/T)	rs4986791		GC	0,00257	-0,84173	0,39994	1,45827	0,14477	-1,23388	0,21725
			GT	0,04615	-1,3894	0,16471	1,81863	0,06897	-0,97576	0,32919
TLR9 -1237 (T/C)	rs5743836	3p21.3	TTG	0,01909	0,74642	0,45541	-0,50642	0,61256	-1,45642	0,14528
			TTA	0,48037	-0,87883	0,37949	0,59037	0,55495	0,38451	0,7006
			CTG	0,15846	0,82238	0,41086	-0,40093	0,68848	-0,62554	0,53161
-1486 (T/C)	rs187084		CTA	0,02157	-0,10958	0,91274	-0,09543	0,92397	0,35157	0,72516
	rs352139		TCG	0,28189	-0,88426	0,37655	0,56937	0,56911	0,43148	0,66612
1174 (G/A)			TCA	0,00583	-0,2666	0,78978	1,04452	0,29624	-1,45642	0,14528
			CCG	0,02775	2,53924	0,01111	-2,1585	0,03089	-0,30558	0,75993
			CCA	0,00505	0,52564	0,59914	-0,40584	0,68486	-0,13306	0,89414

Muitos haplótipos no TLR1/TLR6 foram significativamente associados com ancestralidade Africana ou Europeia: TC, GT e GC. Neste par de genes o único haplótipo que apresentou associação com ancestralidade Ameríndia foi o TC. No entanto, como mencionado anteriormente este haplótipo também foi associado com ancestralidade Africana e Europeia. O haplótipo AC no TLR4 D299G e T399I apresentou associação significativa com ancestralidade Europeia. O haplótipo CCG no TLR9 -1237T/C, -1486T/C e 1174G/A apresentou associação significativa com ancestralidade Africana e Europeia. Porém após aplicar a correção de Bonferroni [p corrigido $<0,012$ (4p14 e 9q32-33) ou p corrigido $<0,006$ (3p21.3)], somente os haplótipos TC, GT e GC no TLR1/TLR6 permaneceram significativamente associados com ancestralidade Africana ou Europeia.

4.4 Associações dos genótipos e alelos com malária.

Neste estudo os indivíduos foram classificados como positivos ou negativos para malária usando como critérios a sorologia e a biologia molecular. Indivíduos foram classificados como positivos se apresentaram PCR positivo ou sorologia positiva para MSP1 em qualquer coleta, indicando que o parasita atingiu o estágio eritrocítico. Os indivíduos foram classificados como negativos se apresentaram PCR e sorologia para MSP1 negativos. Dos 195 indivíduos analisados nesse estudo: 99 indivíduos foram do sexo feminino e 96 do sexo masculino, com idade média de 38 anos. A sorologia e a detecção de DNA do parasita foram realizadas em todos os indivíduos na primeira coleta. Na segunda coleta a análise de PCR foi realizada em 122 indivíduos, destes as técnicas sorológicas foram realizadas em 109; na terceira coleta apenas 31 indivíduos cederam amostras para a PCR, destes só foi possível avaliar a resposta sorológica em 20. Assim, no total, 132 indivíduos foram positivos e 63 negativos, para os estudos de associação dos polimorfismos e malária.

A frequência de todos os genótipos e alelos dos marcadores polimórficos nos grupos positivo e negativo está apresentada na Tabela 11.

continuação

Tabela 11 - Frequências dos genótipos e alelos encontrados no estudo, nos grupos positivo e negativo para malária.

Polimorfismo	Genótipos e alelos	Total (195 indivíduos)		Positivo (132 indivíduos)		Negativo (63 indivíduos)		<i>p</i>
		N	Proporção	N	Proporção	N	Proporção	
TLR6	C/C	107	0,549	76	0,576	31	0,792	0,491
P249S	C/T	75	0,385	47	0,356	28	0,444	
	T/T	13	0,067	9	0,068	4	0,064	
P=C								
S=T	C	289	0,741	199	0,754	90	0,714	
	T	101	0,259	65	0,246	36	0,286	0,478
TLR9	T/T	121	0,621	74	0,561	47	0,746	0,032
-1237T/C	T/C	65	0,333	52	0,393	13	0,206	
	C/C	9	0,046	6	0,045	3	0,048	
	T	307	0,787	200	0,758	107	0,849	
	C	83	0,213	64	0,243	19	0,151	0,053
TLR9	T/T	91	0,467	67	0,508	24	0,381	0,253
-1486T/C	T/C	83	0,426	52	0,394	31	0,492	
	C/C	21	0,108	13	0,098	8	0,127	
	T	265	0,679	186	0,705	79	0,627	
	C	125	0,321	78	0,295	47	0,373	0,156
TLR9	A/A	53	0,272	38	0,288	15	0,238	0,107
1174A/G	A/G	94	0,482	57	0,432	37	0,588	
	G/G	48	0,246	37	0,280	11	0,175	
	A	200	0,513	133	0,504	67	0,532	
	G	190	0,487	131	0,496	59	0,468	0,683
TLR2	M/M	78	0,400	55	0,417	23	0,365	0,845
GTn	M/L	72	0,369	48	0,364	24	0,381	
	M/S	18	0,092	13	0,098	5	0,079	
	L/L	18	0,092	10	0,076	8	0,127	
	L/S	7	0,036	5	0,038	2	0,032	
	S/S	2	0,010	1	0,008	1	0,016	0,515
	M	246	0,631	171	0,648	75	0,595	
	L	115	0,295	73	0,277	42	0,333	
	S	29	0,074	20	0,076	9	0,071	

O teste qui-quadrado foi usado para determinar as diferenças nas frequências de genótipos entre os indivíduos positivos e negativos. Os valores são expressos em *p*. Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

Pelo teste qui-quadrado somente o -1237T/C ($p=0,032$) foi associado com a malária (Tabela 11). Essa associação se manteve pelo teste exato de Fisher ($p=0,0175$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Teste de independência para cada SNP.

Gene	SNP	p
TLR1	I602S	0,8679
TLR2	P631H	0,1717
	R753Q	1
TLR4	D299G	0,7948
	T399I	0,5889
TLR6	P249S	0,2854
	-1237T/C	0,0175
TLR9	-1486T/C	0,1247
	1174G/A	0,4964

Os valores de p foram calculados pelo teste exato de Fisher.
Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

4.4.1 Análises das Componentes Principais como co-variável para o modelo.

Após a análise de componentes principais dos marcadores de ancestralidade, foi obtido o percentual acumulado da variância explicada pelas 10 primeiras componentes. A Figura 10 mostra o gráfico dos autovalores resultantes da decomposição espectral da matriz de correlação. Como a queda relativa do primeiro para o segundo autovalor é maior do que as demais diferenças (do segundo para o terceiro e assim por diante) sugere-se que apenas a primeira componente principal deva ser utilizada nos modelos de regressão. Ainda assim, foram avaliados os modelos contendo até as três primeiras componentes.

Figura 10- Autovalores da Decomposição Espectral

4.4.2 Análise Uniloco para o microsatélite.

Foram feitas várias codificações para o microsatélite. A Tabela 13 mostra o resultado de vários modelos de associação para a codificação "0" para os genótipos sem tamanho “*short*” (S) (menos frequente) e "1" para pelo menos 1 alelo de tamanho “*short*”.

Tabela 13 – Significância estatística para os modelos ajustados para o microsatélite

Modelo	<i>p</i>
Apenas Microsatélite	0,749
Microsatélite+Sexo+Idade	0,695
Microsatélite+Sexo+Idade+UD	0,992
Microsatélite+Sexo+Idade+ CP1	0,908
Microsatélite+Sexo+Idade+CP1+CP2	0,962
Microsatélite+Sexo+Idade+CP1+CP2+CP3	0,967

Não houve significância estatística do seu efeito sobre malária em nenhum caso. Para várias outras codificações diferentes foi tentado o ajuste dos modelos, mas os resultados foram similares. O microssatélite pode ser avaliado como efeito aleatório em modelos mistos.

4.4.3. Análises Uniloco para os SNPs por Regressão Logística (efeito fixo).

A análise uniloco considerando apenas o efeito fixo de cada SNP isoladamente (Tabela 14), mostrou evidência de associação, ao nível de 1,4% do SNP TLR9 -1237 T/C com a positividade. Considerando um nível de 10%, o marcador TLR9 -1486 T/C também aparece com evidência de associação à malária ($p=0,099$). Incluindo as informações de sexo e idade como co-variáveis, apenas o marcador TLR9 -1237 T/C manteve evidência de associação (Tabela 15).

Tabela 14- Análise uniloco para cada SNP

Polimorfismo	<i>p</i>	Coeficiente
TLR1 I602S	0,805	-0,0834
TLR2 P631H	0,156	1,5122
TLR2 R453Q	0,956	-0,048
TLR4 D299G	0,667	0,2368
TLR4 T399I	0,422	0,4771
TLR6 P249S	0,273	-0,3371
TLR9 -1237T/C	0,014	0,8339
TLR9 -1486T/C	0,099	-0,5158
TLR9 1174G/A	0,466	-0,2574

Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

Tabela 15 - Análise uniloco por SNP+Sexo+Idade

Polimorfismo	<i>p</i>	Coefficiente
TLR1 I602S	0,817	-0,0793
TLR2 P631H	0,143	1,5758
TLR2 R453Q	0,985	-0,0165
TLR4 D299G	0,76	0,1707
TLR4 T399I	0,487	0,4195
TLR6 P249S	0,418	-0,2538
TLR9 -1237T/C	0,014	0,8494
TLR9 -1486T/C	0,11	-0,5068
TLR9 1174G/A	0,604	-0,1859

Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

A Unidade Domiciliar, em geral, diminui a significância do efeito dos SNPs o que demonstra que o efeito do SNP está confundido com o efeito da UD (Tabela 16). A UD não foi considerada como covariável, mas pode ser avaliada como efeito aleatório em modelos mistos, uma vez que foram encontradas evidências de associação da UD com a ancestralidade, de acordo com as considerações feitas na análise de componentes principais. Conforme resultados na Tabela 17, além do SNP TLR9 1237T/C, o marcador TLR9 1486 T/C apareceu com significância no limiar do nível de 5% ($p=0,048$).

Tabela 16 - Análise uniloco por SNP+Sexo+Idade+UD

Polimorfismo	<i>p</i>	Coefficiente
TLR1 I602S	0,9	0,0451
TLR2 P631H	0,221	1,3356
TLR2 R453Q	0,685	-0,3702
TLR4 D299G	0,996	0,0026
TLR4 T399I	0,695	0,2523
TLR6 P249S	0,426	-0,2588
TLR9 -1237T/C	0,024	0,8022
TLR9 -1486T/C	0,048	-0,6597
TLR9 1174G/A	0,403	-0,3132

Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

A inclusão da primeira componente principal de ancestralidade contribuiu para aumentar a significância do marcador TLR9 -1237 T/C e indicou ao nível de 10%, associação também do marcador TLR2 P631H, avaliados indivíduos de mesmo sexo, idade e ancestralidade (Tabela 17). Tomando-se as outras duas componentes (Tabelas 18 e 19) não houve melhora da significância do efeito dos SNPs, mostrando que elas não conseguem explicar mais do resíduo dos modelos.

Tabela 17 - Análise uniloco por SNP+Sexo+Idade+Ancestralidade (CP1)

Polimorfismo	<i>p</i>	Coefficiente
TLR1 I602S	0,4302	-0,2885
TLR2 P631H	0,0969	1,8146
TLR2 R453Q	0,9809	-0,0215
TLR4 D299G	0,802	0,1406
TLR4 T399I	0,509	0,399
TLR6 P249S	0,2544	-0,3677
TLR9 -1237T/C	0,008	0,9364
TLR9 -1486T/C	0,1448	-0,4664
TLR9 1174G/A	0,7651	-0,1089

Valores em negrito mostram $p < 0,1$.

Tabela 18 - Análise uniloco por SNP+Sexo+Idade+Ancestralidade (CP1+CP2)

Polimorfismo	<i>p</i>	Coefficiente
TLR1 I602S	0,4387	-0,285
TLR2 P631H	0,0978	1,8111
TLR2 R453Q	0,9924	-0,0086
TLR4 D299G	0,7895	0,1504
TLR4 T399I	0,4973	0,4119
TLR6 P249S	0,2592	-0,3719
TLR9 -1237T/C	0,0079	0,9461
TLR9 -1486T/C	0,1471	-0,4648
TLR9 1174G/A	0,7681	-0,1074

Valores em negrito mostram $p < 0,1$.

Tabela 19 - Análise uniloco por SNP+Sexo+Idade+Ancestralidade (CP1+CP2+CP3)

Polimorfismo	<i>p</i>	Coefficiente
TLR1 I602S	0,2832	-0,4108
TLR2 P631H	0,1103	1,7776
TLR2 R453Q	0,8859	-0,1296
TLR4 D299G	0,9842	-0,0114
TLR4 T399I	0,6666	0,2657
TLR6 P249S	0,3313	-0,3265
TLR9 -1237T/C	0,0066	0,983
TLR9 -1486T/C	0,0986	-0,5433
TLR9 1174G/A	0,7371	-0,1244

Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

4.4.4 Análises Biloco para os SNPs por RL (efeito fixo).

Conforme os resultados das análises uniloco, o modelo com sexo, idade e primeira componente da ancestralidade foi mantido para estas análises. Foram avaliados os efeitos de todos os pares de SNPs (Tabelas 20 a 27).

Tabela 20- Modelos Biloco do TLR1 I602S.

	TLR2		TLR4		TLR6	TLR9		
	P631H	R753Q	D299G	T399I	P249S	-1237T/C	-1486T/C	1174G/A
Intercepto	1,03*	1,14*	1,00*	0,99	1,14*	0,44	0,97	0,62
TLR1 I602S	-0,19	-0,37	-0,20	-0,22	-0,17	-0,02	0,10	0,38
SNP_coluna	16,15	-1,27	0,91	0,91	-0,56	1,34*	0,01	0,55
Sexo	0,76*	0,77*	0,75*	0,75*	0,72*	0,82*	0,73*	0,76*
Idade	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
CP1	0,19*	0,17	0,16	0,16	0,16	0,19*	0,15	0,17
Interação	-15,20	1,90	-1,12	-0,79	0,28	-0,60	-0,69	-0,91

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Tabela 21- Modelos Biloco do TLR2 P631H.

	TLR2	TLR4		TLR6	TLR9		
	R753Q	D299G	T399I	P249S	-1237T/C	-1486T/C	1174G/A
Intercepto	0,90*	0,88*	0,85	1,06*	0,42	1,07*	0,96
TLR2 P631H	1,82	1,83	1,85	16,07	16,34	1,21	15,24
SNP_coluna	0,03	0,21	0,47	-0,32	0,96**	-0,43	-0,08
Sexo	0,74*	0,74*	0,73*	0,72*	0,79*	0,73*	0,73*
Idade	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
CP1	0,16	0,16	0,16	0,19*	0,19*	0,15	0,16
Interação	-	-	-	-15,24	-15,68	13,89	-13,71

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

- dados insuficientes para calcular interação.

Tabela 22- Modelos Biloco do TLR2 R753.

	TLR4		TLR6	-1237T/C	TLR9	
	D299G	T399I	P249S		-1486T/C	1174G/A
Intercepto	0,87*	0,84	1,02*	0,46	1,12*	1,05*
TLR2 R753Q	-0,01	0,01	0,27	-0,61	-1,04	-16,08
SNP_coluna	0,14	0,40	-0,34	0,87*	-0,52	-0,21
Sexo	0,74*	0,74*	0,72*	0,81*	0,75*	0,81*
Idade	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
CP1	0,14	0,13	0,16	0,17	0,12	0,13
Interação	-	-	-0,92	15,27	1,67	16,94

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

- dados insuficientes para calcular interação.

Tabela 23- Modelos Biloco do TLR4 D299G.

	TLR4	TLR6	-1237T/C	TLR9	
	T399I	P249S		-1486T/C	1174G/A
Intercepto	0,77	1,01*	0,45	1,10*	0,94
TLR4 D299G	-15,59	0,49	-0,18	-0,08	-0,30
SNP_coluna	15,98	-0,31	0,86*	-0,51	-0,15
Sexo	0,77*	0,71*	0,80*	0,72*	0,73*
Idade	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
CP1	0,14	0,16	0,17	0,12	0,13
Interação	-	-0,72	0,88	0,42	0,55

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$;

(-) dados insuficientes para calcular interação.

Tabela 24- Modelos Biloco do TLR4 T399I.

	TLR6	-1237T/C	TLR9	
	P249S		-1486T/C	1174G/A
Intercepto	1,00*	0,43	1,07*	0,92
TLR4 T399I	0,49	0,16	-0,08	-0,31
SNP_coluna	-0,34	0,89*	-0,54	-0,18
Sexo	0,71*	0,78*	0,72*	0,73*
Idade	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
CP1	0,15	0,17	0,12	0,13
Interação	-0,24	0,53	0,88	0,90

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

- dados insuficientes para calcular interação.

Tabela 25- Modelos Biloco do TLR6 P249S.

	TLR9		
	-1237T/C	-1486T/C	1174G/A
Intercepto	0,68	0,67	0,71
TLR6 P249S	-0,47	0,56	0,45
SNP_coluna	0,79	0,23	0,38
Sexo	0,73*	0,75*	0,72*
Idade	-0,01	-0,01	-0,01
CP1	0,19*	0,11	0,15
Interação	0,31	-1,55*	-1,08

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Tabela 26- Modelos Biloco do TLR9 -1237T/C.

	TLR9	
	-1486T/C	1174G/A
Intercepto	0,55	0,66
TLR9 -1237T/C	1,07*	1,30
SNP_coluna	-0,17	-0,36
Sexo	0,79*	0,75*
Idade	-0,01	-0,01
CP1	0,16	0,16
Interação	-0,39	-0,30

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Tabela 27 - Modelos Biloco do TLR9 -1486T/C.

	TLR9 1174G/A
Intercepto	0,89
TLR9 -1486T/C	14,35
SNP_coluna	0,52
Sexo	0,73*
Idade	-0,01
CP1	0,14
Interação	-15,13

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

O SNP TLR9 -1237T/C permaneceu com significância estatística de associação para indivíduos com mesmo genótipo para os demais SNPs separadamente, com exceção de TLR6 P249S (Tabela 25) e TLR9 1174 G/A (Tabela 26).

Foi encontrada evidência de interação para os marcadores TLR6 P249S e TLR9 -1486T/C (Tabela 25) .

4.4.5 Modelos Completos e penalização para pequenas amostras.

Adotando-se o nível de significância estatística de 5%, os marcadores e os respectivos modelos considerados foram:

- TLR9 -1237 T/C - modelo Uniloco (modelo mais simples com significância);
- TLR9 -1486 T/C - modelo Uniloco com sexo, idade e Unidade Domiciliar;
- TLR6 P249S e TLR9 -1486T/C - modelo Biloco com sexo, idade, primeira componente de ancestralidade e interação.

Os resultados completos (com todos os coeficientes) destes modelos estão mostrados nas Tabelas 28 a 30.

Tabela 28 – Análise uniloco do TLR9 -1237T/C

	Estimativa	Erro Padrão	z	Pr (> z)
Intercepto	0,4539	0,1865	2,43	0,0149
TLR9 -1237T/C	0,8339	0,3384	2,46	0,0137

Abreviações: Pr: Probabilidade.

Tabela 29 – Análise uniloco do TLR9 -1486T/C para indivíduos com mesmo sexo, idade e unidade domiciliar

	Estimativa	Erro Padrão	z	Pr (> z)
Intercepto	2,0636	0,5533	3,73	0,0002
TLR9 -1486T/C	-0,6597	0,3340	-1,98	0,0482
Sexo	0,7603	0,3320	2,29	0,0220
Idade	-0,0038	0,0106	-0,36	0,7224
UD	-0,0242	0,0065	-3,73	0,0002

Abreviações: Pr: Probabilidade.

Tabela 30 – Análise biloco do TLR6 P249S e TLR9 -1486T/C

	Estimativa	Erro Padrão	z	Pr (> z)
Intercepto	0,6694	0,5359	1,25	0,2116
TLR6 P249S	0,5627	0,5237	1,07	0,2826
TLR9 – 1486T/C	0,2348	0,4376	0,54	0,5916
Sexo	0,7459	0,3277	2,28	0,0228
Idade	-0,0059	0,0105	-0,56	0,5742
CP1	0,1140	0,0908	1,26	0,2091
TLR6 P249S: TLR9-1486T/C	-1,5458	0,6805	-2,27	0,0231

Abreviações: Pr: Probabilidade,

Os coeficientes de sexo, apesar de não serem estatisticamente significantes, sempre são positivos, indicando que, tendo em vista a codificação adotada para o

sexo (0-mulheres e 1-homens), há um maior risco para homens em relação às mulheres.

Para os modelos considerados, o intercepto representa o risco basal do modelo, ou seja, o risco para mulheres, com idade de 38 anos e sem nenhum alelo menos frequente nos genótipos considerados.

Estes modelos sofreram o ajuste para pequenas amostras e a significância estatística foi mantida (Tabela 31).

Tabela 31 – Valores finais para os modelos ajustados para pequenas amostras.

Modelo	<i>p</i>	Coefficiente	<i>Odds Ratio</i>	95% IC
Uniloco TLR9 -1237 T/C	0,0123	0,8156	2,3	1,2 – 4,5
Uniloco TLR9 -1486 T/C	0,0489	-0,6395	1,9	1,003 – 3,7
Biloco TLR6 P249S e TLR9 -1486 T/C	0,0242	-1,4764	4,4	1,2 – 16,5

Valores em negrito mostram $p < 0,05$.

Abreviações: IC: Intervalo de Confiança.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados polimorfismos em TLRs e sua associação com malária, buscando algum marcador para suscetibilidade ou resistência para a doença, em indivíduos vivendo em área de baixa endemicidade. Como a frequência dos polimorfismos nos TLRs varia entre as populações humanas, inicialmente foi realizada uma análise da ancestralidade genética visando distinguir associações de polimorfismos nos SNPs com malária de características genéticas individuais.

Não foi encontrado desequilíbrio de ligação absoluto neste estudo, porém houve evidência para desequilíbrio de ligação ($D' > 0,7$) em três regiões cromossômicas avaliadas: (a) 4p14 (TLR1 I602S e TLR6 P249S), desequilíbrio de ligação neste par de SNPs já foi descrito anteriormente, onde estes genes codificam proteínas que são altamente similares em suas sequências de aminoácidos e seus co-receptores²³⁹; (b) 4q31.3 (TLR2 P6031H e TLR2 R753Q), embora com $D' = 0,9$, esses SNPs não estão em desequilíbrio de ligação, visto que o valor de p foi igual a 0,68, esta falta de associação também foi descrita em estudos anteriores²⁴⁰; (c) 9q32-33 (TLR4 D299G e TLR4 T399I), a associação entre esse par de SNPs é muito bem documentada já que estes dois polimorfismos co-segregam^{37,241}; (d) 3p21.3 (TLR9 -1237T/C e TLR9 1174G/A), os alelos -1237C e 1174G no TLR9 estiveram ligados em crianças ugandesas com malária⁸⁷ e o desequilíbrio de ligação entre esse par de polimorfismos já foi observado em crianças ganesas⁸⁶, mas com valores de D' ligeiramente maiores que o encontrado aqui ($D' = 0,86$ versus $D' = 0,70$). Valores similares de D' foram descritos para o par de SNPs -1486T/C e 1174G/A no TLR9 entre a população de Juquitiba ($D' = 0,92$) e crianças ganesas ($D' = 0,85$)⁸⁶. Em um estudo conduzido na Polônia, não foi encontrada evidência de desequilíbrio de ligação entre nenhum par de SNPs, entre esses três polimorfismos no TLR9²⁴².

5.1 Associações entre os polimorfismos em TLRs e ancestralidade.

Os polimorfismos R650Q, L658P, P669L, R677W, F679I, I693T, E694D, Y715N, F722L, R723C, N729S, E738Q, P746S e R748H no TLR2 foram monomórficos para o alelo ancestral. No dbSNP há dados de ancestralidade na população Europeia apenas para os marcadores F679I, Y715N, R723S, N729S e E738Q onde estes, assim como no presente estudo, se apresentaram também monomórficos para o alelo ancestral. De forma geral, as frequências dos alelos encontradas na população de Juititaba foram similares às encontradas em outros estudos brasileiros, com exceção dos polimorfismos no TLR1 I602S e no TLR6 P249S, onde foram maiores que nas populações da Região Amazônica. Os resultados dos SNPs analisados serão discutidos individualmente a seguir.

TLR1(I602S). As frequências dos alelos foram 54% para T (I) e 46% para G (S). Esta frequência alélica é divergente da disponível no projeto 1000Genomes⁴⁰ onde o alelo T (602I) esta presente em 67% das amostras Europeias e o G (602S) em 33%. Com relação a dados disponíveis com amostras brasileiras, as frequências alélicas só podem ser extraídas de um estudo com indivíduos de Região Amazônica⁷⁹, onde o MAF divergiu bastante sendo G: 19%⁷⁹ e o deste estudo 46%. A diferença encontrada na proporção de alelos nesse marcador entre a ancestralidade Europeia e Africana já foi descrita em Quach *et al.*⁴⁴ onde o alelo G foi relacionado com a ancestralidade Europeia e em outro estudo Nédélec *et al.*²⁴³ observaram que a ancestralidade Africana predispôs a uma forte resposta inflamatória a infecção, gerada pelo alelo ancestral, os resultados em Juititaba foram similares aos desses estudos onde o alelo G (602S) foi associado com a ancestralidade Europeia e o alelo T com Africana.

TLR2 P631H. O alelo C (631P) esteve presente em 97% das amostras enquanto o A (631H) em apenas 3%. No projeto 1000Genomes⁴⁰ o MAF global foi A: 0,96% e na população Europeia foi A: 2,98%, uma proporção bem parecida com a encontrada aqui. Infelizmente não há outros estudos brasileiros para comparação.

TLR2 R753Q. O alelo G (753R) foi encontrado em 98% e o alelo A (753Q) em apenas 2%. O MAF global deste SNP é A: 0,7% e na população Europeia é A: 2,4%, frequência muito parecida com este estudo. Os demais estudos brasileiros analisando este SNP também são de amostras da região sudeste⁹¹⁻⁹⁷ e o MAF A (753Q) variou bastante desde 0,1⁹⁷ a 8%⁹⁶.

TLR2 GTn. Todas as 195 amostras foram analisadas e todos os genótipos foram encontrados (SS, SM, SL, MM, ML e LL). Os genótipos foram distribuídos nas seguintes frequências: MM (40%), ML (36,9%), SM (9,2%), LL (9,2%), SL (3,6%), SS (1%). Ao caracterizar esse marcador Yim *et al.*¹²⁹ observaram que o alelo M também foi o mais frequente nas três populações estudadas (Afro-Americanos, Americanos caucasianos e Americanos coreanos). Em seu estudo Yim *et al.*¹²⁹ descrevem que os alelos de tamanho extremo S e L são mais observados na população de Americanos Coreanos, a comparação entre este estudo e Yim *et al.*¹²⁹ não é possível porque a frequência dos genótipos em Yim *et al.*¹²⁹ não é informada. Em seu trabalho Yim *et al.*¹²⁹ também avaliaram que o alelo de tamanho M gera uma menor resposta inflamatória que os demais e o autor sugere que essa seria a razão deste alelo ser o mais abundante em cada raça. Em relação o polimorfismo no Gtn, há somente dois estudos usando populações europeias para comparar a frequência dos alelos^{130,211}. Eles foram realizados em croatas caucasianos¹³⁰ ou em norte-americanos²¹¹ e em ambos o alelo M foi também o mais comum, com 70 e 58% de frequência, respectivamente; nas amostras de Juquitiba foi encontrada uma frequência intermediária (63,1%). Não há frequências dos alelos GTn em outras populações européias para comparação.

TLR4 D299G. A frequência do alelo A (299D) foi 95% e do alelo G (299G) 5%. Os dados 1000Genomes⁴⁰ mostram que o MAF global desse SNP é G: 5,9% e para população Europeia 5,6%. Diversos estudos brasileiros (15 trabalhos) avaliaram a frequência deste polimorfismo e os resultados encontrados em estudos realizados na região sudeste ou norte apresentaram um MAF muito semelhante ao do presente estudo, ou seja, G por volta de 5%. Em seu estudo Ferwerda *et al.*³⁷ observaram que o alelo mutante (G) esteve presente de 10 a 18% em populações Africanas, como o número de indivíduos com ancestralidade predominantemente Africana nas amostras de Juquitiba é baixo, para avaliar a influência da ancestralidade com os alelos foi usada regressão logística e não foi encontrada relação.

TLR4 T399I. Foi possível identificar que 95% dos indivíduos apresentaram o alelo C (399T) e 5% o alelo T (399I), novamente estes resultados estão de acordo com o MAF global (4,1%) e com os dados encontrados no projeto 1000Genomes⁴⁰ em uma população europeia (5,7%). Este polimorfismo foi estudado em seis outros

estudos brasileiros, apenas com amostras do estado de São Paulo e a frequência de T 7(399I) foi ligeiramente mais baixa que a do presente estudo, ou seja, de 2 a 3%.

TLR6 P249S. Nesse estudo, observou-se uma frequência de 74% para o alelo C (249P) e 26% para o alelo T (249S). Os dados encontrados aqui diferem dos valores do 1000Genomes⁴⁰ (Global T: 12%; indivíduos Europeus T: 41%). Dois estudos brasileiros analisaram esse marcador em amostras de indivíduos da região Amazônica, com frequências do alelo T de 16%⁷⁹ e 8%⁸⁰, valores bem inferiores ao encontrado em Juquitiba. Entretanto, como já mencionado, TLR1 e TLR6 estão localizados na mesma região cromossômica, sendo descrito desequilíbrio de ligação entre esses genes (inclusive neste estudo) e associação dos alelos variantes com ancestralidade Europeia³⁸. Em nossa análise também foi encontrada uma associação com ancestralidade. Portanto, essa discrepância encontrada nas frequências do alelo C nas diferentes populações provavelmente está relacionada à carga de ancestralidade europeia de cada população analisada.

TLR9 -1486T/C. A frequências aqui encontradas foram de 68% para o alelo T e 32% para o alelo C. Os dados do 1000Genomes⁴⁰ mostram os seguintes valores: 37% para o alelo C na população global e 43% na população Europeia. Os estudos brasileiros mostram frequências de 41%⁷⁹ e 47%⁸⁰. Portanto, todos os dados disponíveis são muito similares aos descritos aqui.

TLR9 -1237T/C. Em nossa população de estudo, a frequência do alelo T foi de 78,7% e do alelo C foi de 21,3%. Comparando com os dados disponíveis do projeto 1000Genomes⁴⁰, o alelo C esteve presente em 17% das amostras globais e 13% das amostras de indivíduos Europeus. No Brasil este SNP foi estudado cinco vezes, com amostras da região norte, sudeste e sul, onde a frequência do alelo C variou de 15 a 21%. As amostras de região sudeste apresentaram uma frequência do alelo C similar à deste estudo.

TLR9 1174G/A. As frequências alélicas encontradas na população do estudo foram de 51,3% para o alelo A e 48,7% para o alelo G. Esses valores, próximos aos 50%, também foram observados no projeto 1000Genomes⁴⁰, tanto na população global (A: 49%) como em indivíduos europeus (A: 45%). Infelizmente não há estudos brasileiros para comparação de frequências.

5.2 Associações entre os polimorfismos em TLRs e malária.

Este estudo foi realizado com amostras de indivíduos residentes em área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, no município de Juquitiba. Casos de malária humana e mosquitos infectados já foram descritos em Mata Atlântica em outros estudos^{244,245,248}. Esta mesma área, o município de Juquitiba, já foi abordada em outros momentos visando analisar diferentes aspectos sobre a doença: (i) inquérito sorológico²⁴⁹; (ii) infectividade em gestantes²⁰; (iii) hábito alimentar dos mosquitos^{195,248} e (iv) polimorfismos genéticos dos parasitas^{209,249}. Nas análises sorológicas²⁴⁹ foram observadas altas taxas de positividade por imunofluorescência indireta (36%) para *P. vivax*, indicando a exposição dos indivíduos ao parasita. No estudo epidemiológico sobre malária em gestantes²⁰⁰ observou-se que 5,6% e 44% das gestantes eram positivas para *Plasmodium* sp por técnicas de biologia molecular e sorologia respectivamente. Dentre as mulheres positivas por PCR a grande maioria dos casos era de pacientes vivendo em área rural do município. Na análise de hábito alimentar foi observado que os mosquitos se alimentaram predominantemente de sangue humano²⁴⁸, por PCR foi encontrada uma taxa de positividade nos mosquitos de 0,03% para *P. vivax* e 0,01% para *P. malariae*²⁴⁸ e por sorologia 0,086% para *P. vivax*¹⁸⁵. Por último, nas análises de diversidade genética de *P. malariae*^{209,249} foram observados que uma mesma cepa de parasita persistiu ao menos três anos nessa região e também ficou evidenciada uma baixa diversidade sugerindo uma provável fonte clonal de *P. malariae*. Não há até o momento um estudo com primatas neste município, mas em outras regiões de Mata Atlântica, os primatas não-humanos são apontados como participantes na dinâmica da doença^{250,251}.

Neste estudo os residentes de Juquitiba foram acompanhados por 3 anos e amostras de sangue para pesquisa de anticorpos e infecção com *Plasmodium* sp foram coletadas em três momentos diferentes. Infelizmente nem todos os indivíduos estiveram disponíveis nos três momentos. Todas as residências são muito próximas à Mata Atlântica e, com base nas observações dos estudos anteriores, a probabilidade destes indivíduos terem sido expostos ao parasita em algum momento é muito grande. Além disso, os testes sorológicos realizados com marcador de exposição

(CSP) demonstraram que $\frac{3}{4}$ desses indivíduos apresentaram anticorpos contra essa proteína (Izilda Curado, comunicação pessoal). Os dados completos do inquérito sorológico e molecular realizado no foco em questão serão posteriormente publicados.

TLR1 I602S. Este polimorfismo já foi avaliado em relação à malária em um estudo brasileiro⁷⁹ e em um estudo indiano⁸⁹, em ambos os estudos o alelo G (602S) foi considerado um fator de risco para malária. No presente estudo não foi encontrado, em nenhum dos modelos, associação deste marcador à doença. Essa divergência pode estar relacionada à: (i) ancestralidade dos indivíduos analisados: no estudo amazonense a maioria dos indivíduos era fenotipicamente Ameríndios⁷⁹ e o estudo de Panigrahi *et al.*⁸⁹ foi realizado com indianos; (ii) espécies e virulência dos parasitas: na Amazônia as espécies predominantes são *P. vivax* e *P. falciparum*^{187,191}, no estudo Indiano⁸⁹ foram usadas amostras de indivíduos infectados apenas com *P. falciparum* e em Juquitiba são descritos apenas casos *P. vivax* e *P. malariae*^{197,200,195,248}.

TLR2 P631H. Com relação à malária esse polimorfismo só foi avaliado em um estudo com amostras africanas⁸⁷ e assim como no presente estudo não foi encontrada relação com a doença.

TLR2 R753Q. O polimorfismo R753Q no TLR2 também foi estudado em relação à malária em amostras indianas^{82,252}, africanas^{45,83,211} e oceânicas²¹¹ assim como aqui, não foi encontrada associação.

TLR2 GTn. A relação deste marcador e malária já foi estudada em Greene *et al.*^{42,211} e, assim como neste estudo, os autores não observaram um relacionamento.

TLR4 D299G. Esse marcador foi extensamente avaliado com relação à malária em estudos com amostras africanas (Camarões⁸¹, Burundi⁸³, Quênia²¹¹, Gana^{45,86}, Uganda⁸⁷, Mali²⁵³), asiáticas (Índia^{61,82,141},²⁵² e Irã¹³⁹), oceânicas (Papua Nova Guiné²¹¹) e Sul-Americanos (Brasil^{79,80,94}). Apesar do grande número de estudos visando esse marcador ele só foi relacionado com malária em quatro estudos^{45,81-82} com resultados conflitantes. Nos estudos ganenses, o alelo mutante G (299G) foi associado com aumento do risco para malária grave⁴⁵, anemia materna e baixo peso ao nascer⁸¹. Divergindo destes resultados, o estudo indiano⁸² associou o genótipo ancestral AA (299DD) ao aumento da parasitemia média e no estudo brasileiro⁸⁰ a

mutação G (299G) foi relacionada com redução das manifestações clínicas. O presente estudo está de acordo com os resultados da maioria dos trabalhos anteriores, onde não foi encontrada relação da malária e o SNP D299G no TLR4.

TLR4 T399I. Assim como o marcador anterior, o SNP T399I foi avaliado em um grande número de estudos^{45,80-83,139,141,211,252}. Novamente em Mockenhapt *et al.*⁴⁵ o 399I predispôs à malária grave, enquanto Basu *et al.*⁸² associaram o alelo ancestral C (399T) com parasitemia. Assim como neste estudo, os demais trabalhos não associaram este marcador à doença.

TLR6 P249S. Esse marcador foi analisado com relação à malária em cinco estudos anteriores: com amostras de Camarões⁸¹, com amostras de Mali²⁵³, com amostras da Índia⁸⁹ e em dois estudos com amostras brasileiras de Região Amazônica^{79,80}. Um estudo brasileiro⁷⁹ mostrou que o genótipo homozigoto ancestral CC (249PP) foi mais prevalente em assintomáticos. O estudo indiano⁸⁹ descreve esse mesmo alelo ancestral C (249P) em associação com malária não complicada e o alelo mutante T (249S) como um fator de risco para malária grave. Nos estudos africanos^{81,253} e no segundo estudo brasileiro⁸⁰, assim como neste estudo, não foi encontrada associação entre o genótipo no TLR6 P249S e malária. Entretanto, os cinco estudos divergem muito na ancestralidade dos indivíduos analisados e nas espécies de *Plasmodium* que circulam nas áreas estudadas. Ainda, é importante ressaltar que os dois primeiros estudos que encontraram associações, analisaram apenas pacientes positivos para malária^{79,89}, enquanto os outros dois^{80,81}, assim como neste presente estudo, onde nenhuma associação foi encontrada, foram analisadas uma população positiva para malária e uma população controle, sem malária.

TLR9 -1486T/C. Há um grande número de estudos buscando associação entre malária e polimorfismos nesse SNP. Neste marcador os resultados são conflitantes. Em vários estudos^{61,81-85,141,148,211,253}, não foi encontrada associação. Por outro lado, houve associação à malária grave em Apinjoh *et al.*⁸¹, a altas parasitemias em Leoratti *et al.*⁷⁹ e a baixo peso ao nascer em Mockenhaupt *et al.*⁸⁵. A heterozigosidade foi um fator protetor contra a malária em Sawian *et al.*⁸⁸. Em Leoratti *et al.*⁷⁹, a associação do alelo C a altas parasitemias diverge do encontrado na Mata Atlântica, onde o alelo C foi protetor para a doença. Porém esse resultado deve ser considerado com cautela já que o valor de *p* (0,0489) encontrado foi muito

próximo ao limite de significância. Entretanto, quando a presença desse alelo foi analisada em associação ao TLR6, o efeito protetor foi maior com valor de p (0,0242) mais significativo.

TLR9 -1237T/C. Não foi encontrada associação deste marcador e malária em alguns trabalhos com amostras africanas^{45,81,148,211}, asiáticas^{61,82} e oceânicas²¹¹. Entretanto, outros estudos encontraram associações. Na África, Esposito *et al.*⁸³ associou o alelo C à gravidade da doença; Omar *et al.*⁸⁶ associou o genótipo TT com baixa parasitemia; e Sam-Agudu *et al.*⁸⁷ associou o alelo C com altos níveis de IFN- γ em crianças com malária complicada. Na Ásia, Sawian *et al.*⁸⁸ associou o alelo C à presença de malária grave. O único estudo Sul-Americano publicado até o momento que avaliou este SNP em relação à malária foi Leoratti *et al.*⁷⁹ onde o genótipo TT foi associado com baixa parasitemia. Mais recentemente, trabalho apresentado em congresso demonstrou associação do genótipo CC com alta parasitemia em pacientes com *P. vivax* do Estado do Amazonas²⁵⁴. Nossos resultados, onde o alelo C foi associado à presença da doença, apontam para a mesma direção, a de que a mutação está ligada a suscetibilidade à malária. Entretanto, devido à ausência de casos graves na região de Mata Atlântica, também indicam que essa associação não está diretamente relacionada à gravidade da doença, e que outros fatores devem ser considerados nessa relação.

TLR9 1174G/A. Este SNP foi avaliado para malária em seis estudos africanos^{83,85-87,148,211} e, com exceção de Campino *et al.*¹⁴⁸ que encontraram uma fraca associação entre o alelo G e gravidade e Sam-Agudu *et al.*⁸⁷ que associaram o alelo G com altos níveis de IFN- γ em crianças com malária complicada, todos os outros estudos não encontram associação com a doença. O mesmo aconteceu com as amostras de Juquitiba.

Esse é o primeiro estudo que busca associação entre polimorfismos em TLR e malária em área de Mata Atlântica. Também pela primeira vez a ancestralidade genética de indivíduos dessa região foi analisada. O papel dos polimorfismos no TLR6 e TLR9 na doença ficou caracterizado. Apesar de a malária ser uma doença de impacto socioeconômico principalmente na região Amazônica, estudar os fenômenos relacionados à malária residual da Mata Atlântica ajuda nos esforços para eliminação da doença, preenchendo muitas lacunas que ainda existem²⁵⁵.

6 CONCLUSÕES

- a) De forma geral, as frequências dos alelos encontradas na população de Juquitiba foram similares às encontradas em outros estudos brasileiros, com exceção dos polimorfismos no TLR1 I602S e no TLR6 P249S, onde foram maiores que nas populações da Região Amazônica;
- b) A população de Juquitiba possui ancestralidade predominantemente europeia;
- c) O alelo G no TLR1 I602S e o alelo T no TLR6 P249S foram relacionados com ancestralidade europeia;
- d) A presença de pelo menos um alelo C no TLR9 -1237T/C aumentou, em média, 2,3 vezes o risco de uma pessoa contrair malária. Considerando o intervalo de confiança, o aumento variou entre 1,2 e 4,5 vezes;
- e) A presença de pelo menos um alelo C no TLR9 -1486T/C, em indivíduos de mesmo sexo, idade e unidade domiciliar, reduziu em média 1,9 vezes o risco para malária. Considerando o intervalo de confiança, reduziu entre 1,003 e 3,7 vezes;
- f) A presença de pelo menos um alelo T no TLR6 P249S e um alelo C no TLR9 -1486T/C, em indivíduos de mesmo sexo, idade e ancestralidade, reduziu em média 4,4 vezes o risco de uma pessoa contrair malária. Considerando o intervalo de confiança, reduziu entre 1,21 e 16,5 vezes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lin YT, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Curr Genomics*. 2012 Dec; 13(8):633-45.
2. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373–384.
3. Eisenacher K, Krug A. Regulation of RLR-mediated innate immune signaling – it is all about keeping the balance. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(1):36–47
4. Kingeter LM, Lin X. C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol*. 2012 Mar;9(2):105-12.
5. Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol*. 2011 Nov; 72(11):1095-116
6. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86:973-83.
7. Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res*. 2010; 59:791–808.
8. Gao D, Li W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins*. 2017 Jan; 85(1):3-9.
9. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal–ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988;52:269 –79
10. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, *et al*. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate Toll-like receptors. *BMC Genomics*. 2007;8:124.
11. Bell JK, Mullen GED, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*. 2003;24:528 –33.
12. Takada E, Okahira S, Sasai M, Funami K, Seya T, Matsumoto M. C-terminal LRRs of human Toll-like receptor 3 control receptor dimerization and signal transmission. *Mol Immunol*. 2007; 44:3633– 40.

13. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394–7.
14. Huyton T, Rossjohn J, Wilce M. Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85:406–10.
15. Jin MS, Lee JO. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 2008; 29:182–91.
16. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv*. 2003 Dec;3(8):466-77.
17. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.
18. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:353–64.
19. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Building an immune system from nine domains. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec; 35(Pt 6):1437-44.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
21. Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*. 2004; 40:861– 8.
22. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1:625–35.
23. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 644 –58.
24. Wong Y, Sethu C, Louafi F, Hossain P. Lipopolysaccharide regulation of Toll like receptor-4 and matrix metalloprotease-9 in human primary corneal fibroblast cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:2796 – 803.
25. Zhu J, Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways—therapeutic opportunities. *Mediat Inflamm*. 2010, 2010:781235
26. Akira S1, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.

27. Fukata M, Chen AL, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, *et al.* Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006; 131:862–77.
28. Brown SL, Riehl TE, Walker MR, Geske MJ, Doherty JM, Stenson WF, *et al.* Myd88-dependent positioning of Ptgs2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury. *J Clin Invest*. 2007;117:258–69
29. Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, *et al.* A critical role of Toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem*. 2007;282:14975–83
30. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Role of Toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73:555– 61.
31. Corr SC, O'Neill LAJ. Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases. *J Innate Immun*. 2009;1: 350–357.
32. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, *et al.* Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307:906 –22.
33. Thomas KH, Meyn P, Suttorp N. Single nucleotide polymorphism in 5'–flanking region reduces transcription of surfactant protein B gene in H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291:L386 –90.
34. Zysow BR, Lindahl GE, Wade DP, Knight BL, Lawn RM. C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the apolipoprotein(a) gene introduces an upstream ATG and reduces in vitro translation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:58 – 64
35. Cheung, VG, Spielman RS. The genetics of variation in gene expression. *Nat Genet*. 2002;32 Suppl, 522-5.
36. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, *et al.* Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol*. 2007; 178:7520-4.
37. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, *et al.* TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 16;104(42):16645-50.
38. Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H, Laval G, Patin E, Pickrell JK, *et al.* Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet*. 2009 Jul;5(7):e1000562.

39. Exome Aggregation Consortium (ExoAC). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285-91.
40. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, *et al*. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):68-74.
41. Yim JJ, Lee HW, Lee HS, Kim YW, Han SK, Shim YS, *et al*. The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans, *Genes Immun*. 2006;7:150-5.
42. Greene JA, Sam-Agudu N, John CC, Opoka RO, Zimmerman PA, Kazura JW. Toll-like receptor polymorphisms and cerebral malaria: TLR2 Delta22 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria in a case control study. *Malar J*. 2012;11:47.
43. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, van de Vosse E, Velez Edwards DR, Smith PB, *et al*. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis*. 2012;205:934-43.
44. Quach H, Rotival M, Pothlichet J, Loh YE, Dannemann M, Zidane N, *et al*. Genetic Adaptation and Neandertal Admixture Shaped the Immune System of Human Populations. *Cell*. 2016 Oct 20;167(3):643-56.e17.
45. Mockenhaupt FP, Hamann L, von Gaertner C, Bedu-Addo G, von Kleinsorgen C, Schumann RR, *et al*. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis*. 2006;194:184–88.
46. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789-96.
47. NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Exome Variant Server. Seattle: University of Washington; 2011. [acessado em setembro de 2016] Disponível em: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
48. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, *et al*. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1;29(1):308-11.
49. Daniel R, Sanchez JJ, Nassif NT, Hernandez A, *et al*. SNPs associated with physical traits-A valuable tool for the inference of biogeographical ancestry. *Forensic Sci. Int*. 2008;1:538-40.
50. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol*. 2010;22:187-92.

51. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. PLoS One. 2011 Feb 16;6(2):e17063.
52. Moura RR, Coelho AV, Balbino Vde Q, Crovella S, Brandão LA. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. Am J Hum Biol. 2015 Sep-Oct;27(5):674-80.
53. Manta FSN, Pereira R, Vianna R, de Araújo ARB, Gitaí DLG, da Silva DA, *et al.* Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. PLoS One. 2013 Sep 20;8(9):e75145.
54. Santos HC, Horimoto AV, Tarazona-Santos E, Rodrigues-Soares F, Barreto ML, Horta BL, *et al.* A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. Eur J Hum Genet. 2016 May;24(5):725-31.
55. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. PLoS One. 2013 Apr 24;8(4):e62005.
56. Ramos BR, D'Elia MP, Amador MA, Santos NP, Santos SE, da Cruz Castelli E, *et al.* Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. Genetica. 2016 Jun;144(3):259-65.
57. Silbiger VN, Hirata MH, Luchessi AD, Genvigir FD, Cerda A, Rodrigues AC, Willrich MA, *et al.* Differentiation of African components of ancestry to stratify groups in a case-control study of a Brazilian urban population. Genet Test Mol Biomarkers. 2012 Jun;16(6):524-30.
58. Nascimento AF, Oliveira JS, Silva Junior JC, Barbosa AA. Genomic ancestry evaluated by ancestry-informative markers in patients with sickle cell disease. Genet Mol Res. 2016 Mar 31;15(1):gmr7604.
59. Kimura L, Ribeiro-Rodrigues EM, De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Batista Santos SE, Mingroni-Netto RC. Genomic ancestry of rural African-derived populations from Southeastern Brazil. Am J Hum Biol. 2013 Jan-Feb;25(1):35-41.
60. Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. C. R. Biol. 2006;329 (11), 858–62.
61. Kar A, Panigrahi S, Tripathy S, Mohapatra MK, Tayung K, Dhangadamajhi G. Influence of common variants of TLR4 and TLR9 on clinical outcomes of

- Plasmodium falciparum* malaria in Odisha, India. Infect Genet Evol. 2015 Dec;36:356-62.
62. Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kum-arb U, Hemmi H, Akira S, Krieg AM, *et al.* Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. J Immunol. 2004 Apr 15;172(8):4926-33.
 63. McCall MB, Netea MG, Hermesen CC, Jansen T, Jacobs L, Golenbock D, *et al.* *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. J Immunol. 2007 Jul 1;179(1):162-71.
 64. Eriksson EM, Sampaio NG, Schofield L. Toll-Like Receptors and Malaria – Sensing and Susceptibility. J Trop Dis. 2013;2:126.
 65. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, *et al.* A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. Nat Genet. 2007;39:523-8.
 66. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, *et al.* Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. J Biol Chem. 2005 Mar 4; 280(9):8606-16
 67. Zhu J, Krishnegowda G, Li G, Gowda DC. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. Exp Parasitol. 2011;128:205-11
 68. Barrera V, Skorokhod OA, Baci D, Gremo G, Arese P, Schwarzer E. Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-4 and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action. Blood. 2011 May 26;117(21):5674-82.
 69. Furuta T, Imajo-Ohmi S, Fukuda H, Kano S, Miyake K, Watanabe N. Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like receptor 4 by malarial peroxiredoxin. Eur J Immunol. 2008 May;38(5):1341-50.
 70. Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, *et al.* Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. PLoS Pathog. 2010 Jan 29;6(1):e1000744.
 71. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, *et al.* Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20221-9.

72. Baccarella A, Fontana MF, Chen EC, Kim CC. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infect Immun*. 2013 Dec;81(12):4431-42.
73. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, *et al*. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 6;104(6):1919-24.
74. 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;184:4338-48.
75. Kordes M, Matuschewski K, Hafalla JC. Caspase-1 activation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. *Infect Immun*. 2011;79:3633-41.
76. Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, *et al*. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol*. 2007;19:67-79.
77. Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, *et al*. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 108:3689–3694.
78. Loharungsikul S, Troye-Blomberg M, Amoudruz P, Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Looareesuwan S, *et al*. Expression of toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with *falciparum* malaria. *Acta Trop*. 2008 Jan;105(1):10-5.
79. Leoratti FM, Farias L, Alves FP, Suarez-Mútiis MC, Coura JR, Kalil J, Camargo EP, *et al*. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *J Infect Dis*. 2008;198:772-80.
80. da Silva Santos S, Clark TG, Campino S, Suarez-Mutis MC, Rockett KA, Kwiatkowski DP, *et al*. Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. *PLoS One*. 2012;7(5):e36692.
81. Apinjoh TO, Anchang-Kimbi JK, Njua-Yafi C, Mugri RN, Ngwai AN, Rockett KA, *et al*. Association of cytokine and Toll-like receptor gene polymorphisms with severe malaria in three regions of Cameroon. *PLoS One*. 2013 Nov 27;8(11):e81071.
82. Basu M, Maji AK, Chakraborty A, Banerjee R, Mullick S, Saha P, *et al*. Genetic association of Toll-like-receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha

- polymorphisms with *Plasmodium falciparum* blood infection levels. *Infect Genet Evol.* 2010 Jul;10(5):686-96.
83. Esposito S, Molteni CG, Zampiero A, Baggi E, Lavizzari A, Semino M, *et al.* Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. *Malar J.* 2012 Jun 12;11:196.
 84. Hahn WO, Harju-Baker S, Erdman LK, Krudsood S, Kain KC, Wurfel MM, *et al.* A common TLR1 polymorphism is associated with higher parasitaemia in a Southeast Asian population with *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 2016 Jan 6;15:12.
 85. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, *et al.* Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:177-182.
 86. Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, *et al.* Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study. *Malar J.* 2012 May 17;11:168.
 87. Sam-Agudu NA, Greene JA, Opoka RO, Kazura JW, Boivin MJ, Zimmerman PA, *et al.* TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:548-55.
 88. Sawian CE, Lourembam SD, Banerjee A, Baruah S. Polymorphisms and expression of TLR4 and 9 in malaria in two ethnic groups of Assam, northeast India. *Innate Immun.* 2013;19(2):174-83.
 89. Panigrahi S, Kar A, Tripathy S, Mohapatra MK, Dhangadamajhi G. Genetic predisposition of variants in TLR2 and its co-receptors to severe malaria in Odisha, India. *Immunol Res.* 2016 Feb;64(1):291-302.
 90. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Borba SC, Teixeira PC, Ferreira SC, *et al.* Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2009 Jun 15;199(12):1838-45.
 91. Moura SB, Almeida LR, Guerra JB, Rocha GA, Camargos Rocha AM, Melo FF, *et al.* Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer. *Microbes Infect.* 2008 Nov-Dec;10(14-15):1477-83.
 92. Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L, Jamieson SE, Peixe RG, Elias Lde S, *et al.* Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence

- for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Dec;104(8):1187-90.
93. Queiroz DM, Saraiva IE, Rocha GA, Rocha AM, Gomes LI, Melo FF, *et al.* IL2-330G polymorphic allele is associated with decreased risk of *Helicobacter pylori* infection in adulthood. *Microbes Infect*. 2009 Oct;11(12):980-7.
 94. Soares SC, Abé-Sandes K, Nascimento Filho VB, Nunes FM, Silva WA Jr. Genetic polymorphisms in TLR4, CR1 and Duffy genes are not associated with malaria resistance in patients from Baixo Amazonas region, Brazil. *Genet Mol Res*. 2008 Oct 7;7(4):1011-9.
 95. Carregaro F, Carta A, Cordeiro JA, Lobo SM, Silva EH, Leopoldino AM. Polymorphisms IL10-819 and TLR-2 are potentially associated with sepsis in Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Aug;105(5):649-56.
 96. Oliveira LB, Louvanto K, Ramanakumar AV, Franco EL, Villa LL; Ludwig-McGill Cohort Study. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. *J Gen Virol*. 2013 Aug;94(Pt 8):1858-64.
 97. Franchim CS, Sass N, Mattar R, Pendeloski KP, Lin LH, Torloni MR, *et al.* Inflammatory mediators gene polymorphisms in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2011;30(3):338-46.
 98. Rocha AM, De Souza C, Rocha GA, De Melo FF, Saraiva IS, Clementino NC, *et al.* IL1RN VNTR and IL2-330 polymorphic genes are independently associated with chronic immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2010 Sep;150(6):679-84.
 99. Bagarolli RA1, Saad MJ, Saad ST. Toll-like receptor 4 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2010 May-Jun;24(3):192-8.
 100. Nogueira E, Salomao R, Brunialti MK, Ozaki KS, Marques GD, Cenedeze MA, *et al.* Expression of TLR-4 and -2 in peripheral mononuclear cells in renal transplant patients with TLR-4 gene polymorphism. *Int Immunopharmacol*. 2010 Dec;10(12):1481-5.
 101. Nogueira E, Ozaki KS, Macusso GD, Quarim RF, Câmara NO, Pacheco-Silva A. Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):412-4.
 102. de Oliveira LC, Ramasawmy R, Borges JD, Marin MLC, Muller NG, *et al.* Frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo, Brasil. *Einstein*. 2011; 9(3 Pt 1):359-66

103. de Oliveira JG, Silva AE. Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. *World J Gastroenterol*. 2012 Mar 21;18(11):1235-42.
104. de Oliveira JG, Rossi AF, Nizato DM, Miyasaki K, Silva AE. Profiles of gene polymorphisms in cytokines and Toll-like receptors with higher risk for gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2013 Apr;58(4):978-88.
105. Proença MA, de Oliveira JG, Cadamuro AC, Succi M, Netinho JG, Goloni-Bertolo EM, *et al*. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Jul 7;21(25):7730-41.
106. Machado NP, Nogueira E, Oseki K, Ebbing PC, Origassa CS, Mohovic T, *et al*. Clinical characteristics and frequency of TLR4 polymorphisms in Brazilian patients with ankylosing spondylitis. *Rev Bras Reumatol*. 2016;56(5):432-40.
107. Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Fernandes MN, Piveta CS, Cipolli JA, *et al*. Toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism is associated with lower left ventricular wall thickness and inflammatory response in hypertensive women. *Am J Hypertens*. 2010;23:649-54.
108. Valverde-Villegas JM, dos Santos BP, Machado MB, Jobim M, Jobim LF, Flores C, *et al*. G2848A and T-1237C polymorphisms of the TLR9 gene and susceptibility to inflammatory bowel disease in patients from southern Brazil. *Tissue Antigens*. 2014 Mar;83(3):190-2.
109. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 20;95(2):588-93.
110. Veltkamp M, van Moorsel CH, Rijkers GT, Ruven HJ, Grutters JC. Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 2012 Jan;79(1):25-32.
111. Gene. Bethesda: National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information; 2004. [acessado em abril de 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
112. Georgel P, Macquin C, Bahram S. The heterogeneous allelic repertoire of human toll-like receptor (TLR) genes. *PLoS One*. 2009;4:e7803.
113. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, *et al*. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis*. 2009;199:1816-9.

114. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, Radella F, Strout J, Kajikawa O, *et al.* Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:710-20.
115. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NT, Quy HT, *et al.* A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol.* 2007;37:2280-9.
116. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis.* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S408-15.
117. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Association between toll like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation.* 2007;84: 511–516.
118. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007;44: 1315–1320.
119. Merx S, Neumaier M, Wagner H, Kirschning CJ, Ahmad-Nejad P. Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. *Hum Mol Genet.* 2007;16: 1225–1232.
120. Lorenz E, Mira J P, Cornish K L, Arbour N C, Schwartz D A. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun.* 2000;68:6398–6401.
121. Schröder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis.* 2005 Mar;5(3):156-64.
122. Tabel Y, Berdeli A, Mir S. Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int J Immunogenet.* 2007;34:399–405.
123. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, *et al.* The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J.* 2004;23:219-223.
124. Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine.* 2002;20:56–62.
125. Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001 Jul;31(1):53-8.

126. Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AV, Day NP. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Nov;11(6):1194-7.
127. Xue Y, Zhao ZQ, Wang HJ, Jin L, Liu CP, Wang Y, *et al*. Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a southeastern Chinese population with tuberculosis. *Int J Immunogenet*. 2010 Apr;37(2):135-8.
128. Ajdary S, Ghamilouie MM, Alimohammadian MH, Hosseini M, Pakzad SR.. Lack of association of Toll-Like Receptor 2 Arg753Gln with cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Int*. 2010 Sep;59(3):466-8.
129. Yim JJ, Ding L, Schäffer AA, Park GY, Shim YS, Holland SM. A microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene: functional implications and racial differences. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;40:163-9.
130. Boraska Jelavic T, Barisic M, Drmic Hofman I, Boraska V, Vrdoljak E, Peruzovic M, *et al*. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. *Clin Genet*. 2006; 70:156-160.
131. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
132. Flier A, Krediet TG. Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn. *Neonatology*. 2007;92(3):145-57
133. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114:347-360.
134. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, *et al*. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002 Jul 18;347(3):185-92.
135. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem*. 2012;287:40611-7.
136. Long H, O'Connor BP, Zemans RL, Zhou X, Yang IV, Schwartz DA. The Toll-Like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly but Not Thr399Ile Influences TLR4 Signaling and Function. *PLoS One*. 2014;9:e93550.
137. Figueroa L, Xiong Y, Song C, Piao W, Vogel SN, Medvedev AE. The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *J Immunol*. 2012;188:4506-15.

138. Montes AH, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocaña MG, Meana A, *et al.* The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2006 143(3):404-13.
139. Pirahmadi S, Zakeri S, Abouie Mehrizi A. Multiple Genotypes of the Commonly Co-Segregating Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile in Baluchi Malaria Patients from Iran. *Cell J.* 2013 Summer;15(2):182-9.
140. May L, van Bodegom D, Frölich M, van Lieshout L, Slagboom PE, Westendorp RG, *et al.* Polymorphisms in TLR4 and TLR2 genes, cytokine production and survival in rural Ghana. *Eur J Hum Genet.* 2010 Apr;18(4):490-5.
141. Zakeri S, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND. Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients. *Malar J.* 2011;10:77.
142. Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol Res.* 2015 Jun;62(2):234-52.
143. Randhawa A K, Shey M S, Keyser A, Peixoto B, Wells R D, de Kock M, *et al.* Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002174.
144. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3):362-71.
145. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408:740–745
146. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):863-9.
147. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics.* 2003 Jan;81(1):85-91.
148. Campino S, Forton J, Auburn S, Fry A, Diakite M, Richardson A, *et al.* TLR9 polymorphisms in African populations: no association with severe malaria, but evidence of cis-variants acting on gene expression. *Malar J.* 2009 Mar 13;8:44.

149. Jahantigh D, Salimi S, Alavi-Naini R, Emamdadi A, Owaysee Osquee H, Farajian Mashhadi F. Association between TLR4 and TLR9 Gene Polymorphisms with Development of Pulmonary Tuberculosis in Zahedan, Southeastern Iran. *ScientificWorldJournal*. 2013 May 26;2013:534053.
150. Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, *et al*. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infect Immun*. 2010 Mar;78(3):1345-52.
151. Sanders MS, van Well GT, Ouburg S, Morré SA, van Furth AM. Toll-like receptor 9 polymorphisms are associated with severity variables in a cohort of meningococcal meningitis survivors. *BMC Infect Dis*. 2012;May 11;12:112.
152. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, *et al*. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens*. 2012 Mar;79(3):190-7.
153. Bochud PY, Hersberger M, Taffé P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, *et al*. HIV Cohort Study: Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 2007; 21:441-446.
154. Chen KH, Zeng L, Gu W, Zhou J, Du DY, Jiang JX. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. *Br J Surg*. 2011 Sep;98(9):1252-9.
155. World Health Organization. World Malaria Report 2016. Geneva: WHO;2016. 186 p.
156. Centers for Disease Control (CDC). Impact of Malaria [acessado em julho 2017] Disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html
157. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2014 Feb 22;383(9918):723-35.
158. Brasil. Ministério da Saúde. Malária – Brasil. [acessado em julho de 2017]; Disponível em: <https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/>
159. Githeko AK, Brandling-Bennett AD, Beier M, Atieli F, Owaga M, Collins FH. The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992 Jul-Aug;86(4):355-8.
160. Bharti AR, Chuquiyauri R, Brouwer KC, Stancil J, Lin J, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM. Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):610-6.

161. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.
162. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2001 Dec;2(12):967-77.
163. Williams TN, Maitland K, Bennett S, Ganczakowski M, Peto TE, *et al*. High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature*. 1996 Oct 10;383(6600):522-5.
164. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Jan-Feb;28(1-2):51-60.
165. de Koning-Ward TF, Dixon MW, Tilley L, Gilson PR. *Plasmodium* species: master renovators of their host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Aug;14(8):494-507.
166. Cogswell, FB. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 1992 Jan;5(1):26-35.
167. São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Vetores. [acessado em fevereiro 2012] Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/sucensuperintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/doenca>.
168. Cowman AF, Healer J2, Marapana D3, Marsh K4. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016 Oct 20;167(3):610-624.
169. Hopp CS, Sinnis P. The innate and adaptive response to mosquito saliva and *Plasmodium* sporozoites in the skin. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Apr;1342:37-43.
170. Prudêncio M1, Mota MM, Mendes AM. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol*. 2011 Dec;27(12):565-74.
171. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, *et al*. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med*. 2013 May 6;210(5):905-15.
172. Herrera R, Anderson C, Kumar K, Molina-Cruz A, Nguyen V, Burkhardt M, *et al*. Reversible Conformational Change in the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Masks Its Adhesion Domains. *Infect Immun*. 2015 Oct;83(10):3771-80.
173. Holder AA. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitology*. 1994;108 Suppl:S5-18.
174. Lin CS, Uboldi AD, Epp C, Bujard H, Tsuboi T, Czabotar PE, *et al*. Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate

- Merozoite Binding to Human Erythrocytes. *J Biol Chem.* 2016 Apr 1;291(14):7703-15.
175. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, *et al.* The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors.* 2010 Aug 16;3:72.
 176. Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Apr 29;0.
 177. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, *et al.* An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Feb;110(1):23-47.
 178. Coatney G, Collins W, Warren M, Contacos P. The primate malarias. Bethesda: U.S. National Institute of Allergy and Infections Diseases; 1971.
 179. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Oct;20(4):579-92.
 180. Tuteja R. Malaria: an overview. *FEBS J.* 2007 Sep;274(18):4670-9.
 181. Scotto G. Aggiornamenti sulla malaria. *Malaria: an update. Infez Med.* 2010 Dec;18(4):213-34.
 182. MALWEST Integrated Surveillance and control programme for West Nile Virus and malaria in Greece. [acessado em setembro de 2016] Disponível em: <http://www.malwest.gr/en-us/malaria/informationforhealthcareprofessionalsplasmodiumlifecycle.aspx>
 183. Centers for Disease Control (CDC). Malaria Parasites; [acessado em julho de 2017] Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>
 184. Global Malaria Mapper. % of Population at risk, 2013. [acessado em março de 2017] Disponível em: <http://worldmalariaireport.org/node/68>
 185. Sellge G1, Kufer TA2. PRR-signaling pathways: Learning from microbial tactics. *Semin Immunol.* 2015 Mar;27(2):75-84.
 186. World Health Organization. World Malaria Report 2015. Geneva: WHO;2015. 186 p.
 187. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010;9:115.

188. Rezende HR, Soares RM, Cerutti Jr C, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, *et al.* Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo state, Brazil. *Neotrop Entomol.* 2009;38: 272-280.
189. Duarte AM, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, *et al.* Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. *Parasit Vectors.* 2013;6: 58.
190. Neves A, Urbinatti PR, Malafronte RS, Fernandes A, Paganini WS, Natal D. Malaria outside the Amazon Region: natural *Plasmodium* infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil. *Acta Trop.* 2013;125: 102-106.
191. de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Aug;109(5):618-33.
192. Carvalho ME, Glasser CM, Santos LA, Ciaravolo RMC. Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária *vivax* por meio de técnica sorológica em São Paulo. *Cad Saude Publica.* 1985;1:250-2.
193. Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária *vivax* no foco Aldeia dos Índios, município de Peruíbe, estado de São Paulo, 1984 a 1986. *Cad Saude Publica.* 1988;4:276-92.
194. Barata RCB. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cad Saude Publica.* 1995;11:128-36.
195. Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JM, Tubaki R, *et al.* Infection of *Anopheles* (Kerteszia) *cruzi* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Jquitiba, São Paulo. *Rev Panam Salud Publica.* 1997;3:189-93.
196. Couto RD, Latorre MR, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no estado de São Paulo, 1980 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:52-8.
197. Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *BMJ.* 2005; 331:576.
198. Di Santi SM, Carvalho ME, Costa MJ, Kirchgatter K, Pereira BF, Toniolo CRC, *et al.* Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38supl1:333.

199. Scuracchio P1, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, Lima GF, Inoue J, Sanchez MC, Di Santi SM. Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2011 Jan-Feb;53(1):55-9.
200. Hristov AD, Sanchez MC, Ferreira JJ, Lima GF, Inoue J, Costa-Nascimento Mde J, *et al.* Malaria in pregnant women living in areas of low transmission on the southeast Brazilian Coast: molecular diagnosis and humoral immunity profile. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Dec;109(8):1014-20.
201. Deane LM. Simian malaria in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87:1–20.
202. Guimarães LO, Bajay MM, Monteiro EF, Wunderlich G, Santos SE, Kirchgatter K. Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. Hum Immunol. 2017 Nov 23. pii: S0198-8859(17)30548-7. doi:10.1016/j.humimm.2017.11.007.
203. dos Santos LC, Curotto SM, de Moraes W, Cubas ZS, Costa-Nascimento Mde J, de Barros Filho IR, *et al.* Detection of *Plasmodium* sp. in capybara. Vet Parasitol. 2009;163:148-51.
204. Costa MJ, Toniolo CRC, Lima GFMC, Araujo RAS, Kirchgatter K, Wunderlich G, *et al.* Malária Autóctone Em Região De Mata Atlântica Do Estado De São Paulo: Benignidade Ou Risco Oculto? In: Seminário Henrique Aragão e a pesquisa sobre a Malária, 2007, Rio de Janeiro.
205. Kirchgatter K, Lima GFMC, Araujo RAS, Costa MJ, Santi SMF, Wunderlich G. Maximização Da Detecção De *Plasmodium* Em Amostras De Sangue De Indivíduos Assintomáticos De Área De Mata Atlântica Do Estado De São Paulo Com Transmissão De Malária. In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2007, Campos do Jordão. (Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; v. 40, p. 146.)
206. Levitus G, Mertens F, Speranca MA, Camargo LM, Ferreira MU, del Portillo HA. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 1994 Jul;51(1):68-76.
207. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, *et al.* Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:5261-6.
208. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, *et al.* Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Gene. 2008;410:105-12.

209. Guimarães LO, Bajay MM, Wunderlich G, Bueno MG, Röhe F, Catão-Dias JL, *et al.* The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Trop.* 2012 Oct;124(1):27-32.
210. Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. *J Immunol Methods.* 2004;285:281-291.
211. Greene JA, Moormann AM, Vulule J, Bockarie MJ, Zimmerman PA, Kazura JW. Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic populations. *Malar J.* 2009; 8:50
212. Toonen RJ, Hughes S. Increased Throughput for Fragment Analysis on ABI Prism 377 Automated Sequencer Using a Membrane Comb and STRand Software, *Biotechniques.* 2001;31:1320-1324.
213. Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol.* 2013 Jan;40(1):94-8.
214. Zaumsegl D, Rothschild MA, Schneider PM. A 21 marker insertion deletion polymorphism panel to study biogeographic ancestry. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Feb;7(2):305-12.
215. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INDEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):184-90.
216. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One.* 2013 Apr 24;8(4):e62005.
217. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics.* 2003;164:1567–1587.
218. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles, *Mol. Ecol. Notes.* 2007; 7:574–578.
219. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics.* 2000; 155: 945–959.

220. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations, *Am. J. Hum. Genet.* 67 2000;170–181.
221. Francez PA, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SE. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Jan;6(1):132-5.
222. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing; 2016. [acessado em março de 2017] Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
223. Warnes G, Gorjanc G, Leisch F, Man M. Genetics: population genetics, R package version 1.3.6. 2011 [acessado em março de 2017]. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=genetics>, 2011.
224. Sinnwell JP, Schaid DJ. Haplo.stats: Statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous, R package version 1.4.4. 2009. [acessado em março de 2017]. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>, 2009.
225. Mendiburu F, Simon R. Agricolae - Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology, *PeerJ PrePrints.* 2015; e1748.
226. Wickham H. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer; 2009.
227. Mardia KV, Kent JT, Bibby JM. Multivariate Analysis. London: Academic Press; 1979.
228. Becker RA, Chambers JM, Wilks AR. The New S Language: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. Pacific Grove: Wadsworth & Brooks/Cole; 1988.
229. Venables, WN, Ripley, BD. Modern Applied Statistics with S. 4th ed. New York: Springer; 2002.
230. McCullagh P, Nelder JA. Generalized Linear Models. 2nd ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 1989.
231. Hastie TJ, Pregibon D. Generalized linear models. In: Chambers JM, Hastie TL, editors. Statistical Models in S. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 1982.
232. Venzon DJ, Moolgavkar SH. A method for computing profile-likelihood-based confidence intervals. *Applied Statistics.* 1988;37:87–94.
233. Firth, D. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika.* 1993;80:27-38

234. Heinze G, Schemper M. A Solution to the Problem of Separation in Logistic Regression. *Stat Med.* 2002;21, 2409-19.
235. Heinze G, Ploner M. Fixing the nonconvergence bug in logistic regression with SPLUS and SAS. *Comput Methods Programs Biomed.* 2003;71:181-7.
236. Heinze G, Ploner M. Technical Report 2/2004: A SAS-macro, S-PLUS library and R package to perform logistic regression without convergence problems. Viena: Medical University of Vienna; 2004. [acessado em março de 2017] Disponível em: http://www.meduniwien.ac.at/user/georg.heinze/techreps/tr2_2004.pdf.
237. Heinze G. A comparative investigation of methods for logistic regression with separated or nearly separated data. *Stat Med.* 2006;25, 4216 - 4226.
238. Rajeevan H, Osier MV, Cheung KH, Deng H, Druskin L, Heinzen R, *et al.* ALFRED: the ALlele FREquency Database. Update. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):270-1.
239. Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:447-91.
240. Smelaya TV, Belopolskaya OB, Smirnova SV, Kuzovlev AN, Moroz VV, Golubev AM, *et al.* Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci Rep.* 2016; 6: 35021.
241. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):187-91.
242. Paradowska E, Jabłońska A, Studzińska M, Skowrońska K, Suski P, Wiśniewska-Ligier M, *et al.* TLR9 -1486T/C and 2848C/T SNPs Are Associated with Human Cytomegalovirus Infection in Infants. *PLoS One.* 2016 Apr 22;11(4):e0154100.
243. Nédélec Y, Sanz J, Baharian G, Szpiech ZA, Pacis A, Dumaine A, *et al.* Genetic Ancestry and Natural Selection Drive Population Differences in Immune Responses to Pathogens. *Cell.* 2016 Oct 20;167(3):657-669.e21.
244. Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, Western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33: 489-92.
245. Curado I, Dos Santos Malafronte R, de Castro Duarte AM, Kirchgatter K, Branquinho MS, Bianchi Galati EA. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta*

Trop. 2006 Nov;100(1-2):54-62

247. Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MC, Falqueto A, Rezende HR, *et al.* Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.* 2007;6:33.
248. Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte RS, Alves IC, Lima GF, Guimarães Lde O, *et al.* *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomiliary area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014 Sep-Oct;56(5):403-9.
249. Guimarães LO, Wunderlich G, Alves JM, Bueno MG, Röhe F, Catão-Dias JL, *et al.* Merozoite surface protein-1 genetic diversity in *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from Brazil. *BMC Infect Dis.* 2015 Nov 16;15:529.
250. Deane LM, Ferreira-Neto JA, Lima MM. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79:461-3.
251. Duarte AM, Malafronte Rdos S, Cerutti C Jr, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, *et al.* Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop.* 2008 Aug;107(2):179-85.
252. Bali P, Pradhan S, Sharma D, Adak T. Toll like receptor 2 and 4 polymorphisms in malaria endemic populations of India. *Hum Immunol.* 2013 Feb;74(2):223-9.
253. Toure O, Konate S, Sissoko S, Niangaly A, Barry A, Sall AH, *et al.* Candidate polymorphisms and severe malaria in a Malian population. *PLoS One.* 2012;7(9):e43987.
254. Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, Xábregas LA, Sampaio VS, Melo GC, *et al.* TLR9 variant -1237C/C is associated with high parasitaemia in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon population [abstract]. In: 6th International Conference on *Plasmodium vivax* Research; 2017 Jun 11-14; Manaus, Brasil (Resumo No. 63809). [acessado em julho de 2017] Disponível em: <https://proceedings.galoa.com.br/icpvr/trabalhos/tlr9-variant-1237cc-is-associated-with-high-parasitaemia-in-plasmodium-vivax-malaria-in-the>.
255. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J.* 2016 May 20;15(1):284.

APÊNDICE A –

Artigo: “Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil”
publicado na revista Human Immunology.

Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil

Lilian O. Guimarães^{a,1,*}, Miklos Maximiliano Bajay^{b,1,*}, Eliana F. Monteiro^a,
Gerhard Wunderlich^c, Sidney E. Santos^d, Karin Kirchgatter^{a,*}

^a Malaria Research Center, Superintendence for Endemic Disease Control, Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Genetics, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil

^c Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Laboratory of Human and Medical Genetics, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

TLRs
Genetic polymorphism
Gene frequency
Brazilian population

ABSTRACT

The innate immune system governed by toll-like receptors (TLRs) provides the first line of defense against pathogens. Surface-localized TLR1 and TLR6 are known to detect parasite components. TLR encoding genes were shown to display signatures of recent positive selection in Europeans and might be involved in local adaptation at immune-related genes. To verify the influence of Brazilian population admixture on the distribution of polymorphisms in TLRs, we analyzed the genotype frequencies of 24 polymorphisms distributed across five TLR genes in a Southeastern Brazilian population where autochthonous cases of malaria occur in small foci of transmission. The estimation of ancestry showed mainly European ancestry (63%) followed by African ancestry (22%). Mean proportions of European ancestry differed significantly between the genotypes of the TLR1 (I602S) gene and in the TLR6 (P249S) gene. The chance of having the G allele in TLR1 gene increases as European ancestry increases as well as the chance of having the T allele in the TLR6 gene. The 602S allele is related to a “hypo-responsiveness” possibly explaining the high prevalence of asymptomatic malaria cases in areas of Southeastern Brazil. Our results underline the necessity to include informative ancestry markers in genetic association studies in order to avoid biased results.

1. Introduction

The first line of defense against pathogens is provided by the innate immune system including toll-like receptors (TLRs) [1]. Ten TLR encoding genes have been described in humans dispersed all over the genome [1]. TLR1, TLR6, and TLR10 occur on the cell surface and are known to be activated by bacterial, fungal, and parasite components including flagellin and glycolipids [1]. TLRs are highly conserved, although cell-surface TLRs are less strictly constrained than intracellular TLRs [2]. In fact, the region including the TLR1/TLR6/TLR10 genes is under natural selection [3–5] and has been shown to have signatures of recent positive selection in Europeans [2,6] suggesting that they might be involved in local adaptation.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are present in variable frequencies in different populations. They play an important role in different diseases to which populations are differently exposed, therefore, their analysis is important for genetic studies in humans. SNPs in TLR genes have been associated with susceptibility to various infectious

diseases [1], including malaria [7–11]. Analysis of the genetic structure of human populations has become an important practical issue for the study of complex genetic disorders. Recent studies have shown that genetic ancestry and natural selection drive population differences in immune responses to pathogens [12]. Differences in frequency of alleles between ethnic groups and subgroups and admixture between different ethnic groups may result in frequent false-positive results or reduced power in genetic studies [13]. Thus, with the prospect of future genetic Association studies using SNPs in TLRs and malaria susceptibility, it is first necessary to characterize the genetic structure of the study population in order to avoid biases and falsely interpreted results.

Currently, one of the most diverse populations in the world is the Brazilian population, which resulted from five hundred years of inter-ethnic admixture among European, African and Amerindian ancestors. Estimates of ancestry results produced by genetic studies have shown that the Brazilian population has a major contribution of European ancestry (around 75–77%) followed by African and Amerindian contributions [14,15]. The population from the southern region has

* Corresponding authors.

E-mail addresses: lilianguimaraes@usp.br (L.O. Guimarães), mmabajay@gmail.com (M.M. Bajay), karink@usp.br (K. Kirchgatter).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.11.007>

Received 3 March 2017; Received in revised form 10 November 2017; Accepted 18 November 2017

0198-8859/ © 2017 Published by Elsevier Inc. on behalf of American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

APÊNDICE B -

Artigo submetido à revista Acta tropica (Influence of polymorphisms in Toll-like receptors (TLRs) on malaria susceptibility in low-endemic area of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil).

Manuscript Details

Manuscript number	ACTROP_2017_1203
Title	Influence of polymorphisms in Toll-like receptors (TLRs) on malaria susceptibility in low-endemic area of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil
Article type	Research Paper

Abstract

In low-endemic areas for malaria transmission, asymptomatic individuals play an important role as reservoirs for malarial infection. Understanding the dynamics of asymptomatic malaria is crucial for its efficient control in these regions. Genetic host factors such as Toll-like receptor (TLR) polymorphisms may play a role in the maintenance or elimination of infection. In this study, the effect of TLR polymorphisms on the susceptibility to malaria was investigated among individuals living in the Atlantic Forest of São Paulo, Southern Brazil. A hundred and ninety-five Brazilian individuals were enrolled and actively followed up for malaria for three years. Twenty-four polymorphisms in five toll-like receptor (TLR) genes were genotyped by RFLP, direct sequencing or fragment analysis. The genotypes were analyzed for the risk of malaria. Current malaria was identified by the positive results in PCR tests and previous malaria was assumed when antiplasmodial antibodies against MSP119 were detected by ELISA. An evaluation of genomic ancestry was conducted using biallelic ancestry informative markers and the results were used as correction in the statistical analysis. Nine SNPs and one microsatellite were found polymorphic and three variant alleles in TLR genes were associated to malaria susceptibility. The regression coefficient estimated for SNP TLR9.-1237.T/C indicated that the presence of at least one allele C increased, on average, 2.3 times the malaria risk, compared to individuals with no allele C in this SNP. However, for individuals with the same sex, age and household, the presence of at least one allele C in SNP TLR9.-1486.T/C reduced, on average, 1.9 times the malaria risk, compared to individuals with no allele C. Moreover, this allele C plus an S allele in TLR6.P249S in individuals with same sex, age and ancestry, reduced, on average, 4.4 times the malaria risk. Our findings indicate a significant association of TLR9.-1237.T/C gene polymorphism with malarial infection and contribute to a better knowledge of the role of TLRs in malaria susceptibility in an epidemiological setting different from other settings.

Keywords	Malaria; toll-like receptors; Genetic polymorphism; Association study; Logistic regression model; Principal components; Population structure correction.
Corresponding Author	Lilian Guimaraes
Order of Authors	Lilian Guimaraes, Francisco Fernandes, Eliana Monteiro, Izilda Curado, Marcia Holcman, Gerhard Wunderlich, Sidney Santos, Júlia Soler, karin kirchgatter
Suggested reviewers	Rajendranath Ramasawmy, Ivo Mueller, Anna Rosanas-Urgell

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

CoverLetterActaTropica.pdf [Cover Letter]

GuimarãesActa_04dez.docx [Manuscript File]

Figure1.jpeg [Figure]

Figure2.docx [Figure]

Figure3.jpeg [Figure]

Tables.docx [Table]

Supplemental File.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Anexo A -
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

São Paulo, 24 de outubro de 2011.

PARECER 1022/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 19.10.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Estudo de polimorfismos genéticos em genes relacionados com a imunidade inata em população de área de baixa endemicidade para malária*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. GERHARD WUNDERLICH e a pesquisadora Dra. KARIN KIRCHGATTER.

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

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **19.10.2012.**

Atenciosamente,

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