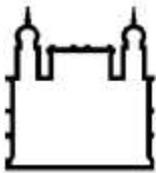


INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

**Caracterização do perfil dos genes *KIR* e seus
ligantes em uma população naturalmente
exposta à malária e sua relação com a infecção
malárica por *P. falciparum* e *P. vivax***

LUCIENE DE AQUINO DA SILVA

Rio de Janeiro
2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

LUCIENE DE AQUINO DA SILVA

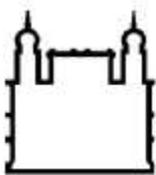
Caracterização do perfil dos genes *KIR* e seus ligantes em uma população naturalmente exposta a malária e sua relação com a infecção malárica por *P. falciparum* e *P. vivax*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadora: Prof. Dra. Dalma Maria Banic

RIO DE JANEIRO

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: LUCIENE DE AQUINO DA SILVA

**Caracterização do perfil dos genes KIR e seus ligantes em uma população naturalmente
exposta e sua relação com a infecção malárica por *P. falciparum* e *P. vivax***

Orientadora: Prof. Dra. Dalma Maria Banic

Aprovada em: 22 / 08 /2011

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira (Presidente)

Prof. Dr. José Leonardo de Moura Carvalho (Revisor)

Prof. Dra. Sandra do Lago Moraes de Avila

Prof. Dra. Paula Melo de Luca

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Luciene de Aquino da

Caracterização do perfil dos genes KIR e seus ligantes em uma população naturalmente exposta a malária e sua relação com a infecção malárica por *P. falciparum* e *P. vivax* / Luciene de Aquino da Silva. – Teresina, 2011.

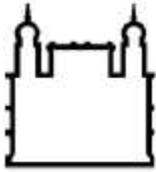
94 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2011.

Bibliografia: f. 83-94

1. Malária. 2. Células NK. 3. Genes KIR. 4. HLA. I. Título.

CDD 616.9362



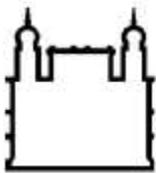
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, sob orientação da Doutora *Dalma Maria Banic*.

Agencias financiadoras: Fiocruz e CNPq.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

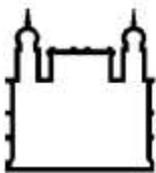
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS GENES KIR E SEUS LIGANTES EM UMA POPULAÇÃO NATURALMENTE EXPOSTA À MALÁRIA E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO MALÁRICA POR *P. falciparum* E *P. vivax*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciene de Aquino da Silva

A malária é a doença parasitária que mais causa mortes em todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública. Os mecanismos exatos envolvidos na patogênese e na produção de uma resposta imune eficaz ainda não foram bem esclarecidos. O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e as células *NK* são uma importante subpopulação de linfócitos atuantes na fase aguda da resposta imunológica na malária. O controle da ação das células *NK* se dá através de receptores de membrana, dentre os quais estão os receptores *KIR* que reconhecem moléculas *HLA* de classe I expressas pela maioria das células do organismo. Esses receptores, altamente polimórficos, desempenham função significativa no controle da resposta imune inata e adaptativa de cada indivíduo. Dentro deste contexto, nosso trabalho caracterizou geneticamente a frequência dos receptores *KIR* e seus ligantes *HLA*-I de indivíduos ($n=377$) naturalmente expostos à malária (Porto Velho - RO), verificando uma possível associação entre a presença desses genes e a infecção. Após a extração de DNA, a genotipagem da população estudada foi realizada através da técnica *PCR-SSO* e a leitura pelo equipamento *Luminex*. Observamos uma maior frequência dos genes *KIR2DL1*, *3DL1*, *2DS4* e *2DL3* (>89% em todos), *HLA*-C1, -Bw4 e -C2 (>66% em todos) e os pares *KIR2DL2_3/C1*, *KIR3DL1/Bw4* e *KIR2DL1/C2* (>66% em todos) na população de Porto Velho, que é semelhante às de outras regiões brasileiras. Não observamos influência do perfil da distribuição gênica dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA* (-A, -B e -C) na susceptibilidade a malária. Caracterizamos 48 genótipos *KIR*, todos com distribuição cosmopolita. Os mais frequentes foram os genótipos 42/*BAF*-1 (30,8%) e 33/*BAF*-2 (15,2%). Nos indivíduos do grupo dos nativos de Porto Velho foram encontradas: uma maior variabilidade genotípica (43/48); uma maior frequência do genótipo 33/*BAF*-2 quando comparado aos migrantes ($P<0,01$); e um grande número de genótipos exclusivos desse grupo (27/43). Os indivíduos nativos portadores de genótipos exclusivos relataram um menor número de malárias anteriores e um maior tempo desde a última infecção, sugerindo que esses genótipos possam conferir uma maior proteção à malária. Nos indivíduos com malária e portadores de genótipos com maior gradiente de genes inibidores apresentavam maiores níveis plasmáticos de *INF*- γ ($r = 0,3328$; $P<0,013$), sugerindo que a presença desses genótipos não esteja associada à produção desta citocina. Além disso, esses indivíduos apresentavam uma maior parasitemia ($r = 0,3262$; $P = 0,001$), sugerindo que a presença desses genes inibidores possa estar associada a um menor controle/eliminação dos parasitos. Observamos que a presença do par *KIR2DS2_C1* estava associado a níveis de parasitemia mais elevados ($P = 0,01$), indicando que a presença desse par possa também estar associada a um menor controle/eliminação dos parasitos. Os dados obtidos nesse trabalho poderão contribuir para futuros estudos sobre o impacto funcional desses genes na regulação da resposta imune, na relação com a incidência e na evolução clínica da doença não só na malária como de outras doenças infecciosas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF THE GENETIC FREQUENCY OF KIR RECEPTORS AND THEIR HLA-I LIGANDS PROFILES IN INDIVIDUALS NATURALLY EXPOSED TO MALARIA AND THEIR ASSOCIATION WITH *P. falciparum* AND *P. vivax* INFECTION

ABSTRACT

MASTER THESIS

Luciene de Aquino da Silva

Malaria remains one of the most important parasitic disease that causes more deaths in the world, representing a serious public health problem. However, the mechanisms involved in the pathogenesis and /or production of an effective immune response remain unclear. The innate immune system is the first line of defense against infection and NK cells are an important subpopulation of lymphocytes in the acute phase of active immune response in malaria. The control of the action of NK cells is via membrane receptors, among which are the KIR receptors that recognize HLA class I molecules expressed by the majority of cells of the human body. These receptors, highly polymorphic, play a significant role in controlling innate and adaptive immune response of each individual. Within this context, our work characterized the genetic frequency of KIR receptors and their ligands HLA-I in subjects (n = 377) naturally exposed to malaria (Porto Velho - RO) and the association between the presence of these genes and infection. After DNA extraction, genotyping of the population was performed by PCR-SSO and Luminex equipment for reading. We observed a higher frequency of the genes KIR2DL1, 3DL1, 2DS4 and 2DL3 (> 89% in all), HLA-C1,-Bw4 and -C2 (> 66% in all) and pairs KIR2DL2_3/C1, KIR3DL1/Bw4 and KIR2DL1 / C2 (> 66% in all) in the population of Porto Velho, which is similar to other Brazilian regions. No influence in the profile of the gene distribution and its KIR ligands (HLA-A,-B and -C) and susceptibility to malaria. We identified 48 KIR profile, all with a cosmopolitan distribution. The most frequent profile were 42/BAF-1 (30.8%) and 33/BAF-2 (15.2%). Individuals in the group of natives of Porto Velho presented a greater genotypic variability (43/48), a higher frequency of genotype 33/BAF-2 compared to migrants (P <0.01), and a large number of profile exclusive to that group (27/43). Individuals native presenting a exclusive profile reported less malarias in the past and longer time since the last infection, suggesting that these profile may confer protection against malaria. In individuals with malaria and those carrying high gradient of gene inhibitors had higher plasma levels of INF- γ (r = 0.3328, P <0.013), suggesting that the presence of these profile are not associated with the production of this cytokine. In addition, these individuals had a higher parasitemia (r = 0.3262, P = 0.001), suggesting that the presence of inhibitors of these genes may be associated with a lower control / elimination of parasites. We observed that the presence of the pair KIR2DS2_C1 was associated with higher levels of parasitemia (P = 0.01), indicating that the presence of this pair could also be associated with lack of control / elimination of parasites. The data obtained in this work may contribute to future studies on the functional impact of these genes in regulating the immune response in relation to the incidence and clinical course of the disease not only in malaria as well as in other infectious diseases.

Dedicações

Dedico esta dissertação primeiramente à Deus, por me permitir vencer mais uma batalha. E também aos meus grandes incentivadores, Jurcelena de Aquino e José Teodoro que sempre me apoiaram e me deram suporte ao longo desta caminhada. Estes foram, são e serão o alicerce da minha vida e o combustível que me leva adiante. Hoje ultrapasso mais esta etapa do caminho graças a vocês. Obrigado!

A minha irmã Luziana de Aquino da Silva pela amizade, amor, entusiasmo, paciência e pelas lições de vida. A rosa da profunda amizade não se colhe sem ferir a mão em muitos espinhos da contradição. No abnegar é que está o vencer de muitas resistências invencíveis ao império da vontade.

A minha grande amiga **Daiana de Souza Perce da Silva**. Algumas vezes na vida, você encontra uma amiga especial. Alguém que muda sua vida simplesmente por estar nela. Alguém que te faz rir até você não poder mais parar. Alguém que faz você acreditar que realmente tem algo bom no mundo. Alguém que te convence que lá tem uma porta destrancada só esperando você abri-la. Isso é uma amizade pra sempre. Quando você está pra baixo e o mundo parece escuro e vazio, sua amiga pra sempre te põe pra cima e faz com que o mundo escuro e vazio fique bem claro. Sua amiga pra sempre te ajuda nas horas difíceis, tristes e confusas. Se você se virar e começar a caminhar, sua amiga pra sempre te segue. Se você perder seu caminho, ela te guia e te põe no caminho certo. Sua amiga pra sempre segura sua mão e diz que vai ficar tudo bem. Sua amiga é pra sempre, e pra sempre não tem fim.

Aos meus amigos Alan, Grazielle, Julio e Liliane, pois cada amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos, além de ser o conforto indescritível de nos sentirmos seguros, sem ser preciso pensar o que se pensa, nem medir o que se

Agradecimentos

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos e tantos adorados familiares e amigos – tanto aos ‘velhos’ e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo. Bem sei que corro o risco de não dar conta desse ‘muitíssimo obrigado’ como é merecido, porque será difícil exprimir o que foi esse movimento de energias e impulsos.

Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma estrada larga! Uma estrada – cujo nome é esperança e cuja base é a busca de saberes.

Talvez esta dissertação seja o resultado mais visível desse processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma, dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Meu primeiro agradecimento tem que ser feito a pessoa que acreditou no meu potencial e se dedicou a me orientar, desde que eu entrei no Laboratório de Pesquisas em Malária (LabMal). A **Dra. Dalma Maria Banic**, que sempre buscou extrair o melhor de mim, contribuindo na construção do meu pensamento crítico-científico. Seu apoio e sua incansável ajuda em qualquer tarefa que eu precisei só me fez (e ainda faz) admirá-la cada vez mais. Um exemplo de profissional competente, disciplinada, ética e paciente (muito paciente), sendo sempre muito educada e gentil mesmo com os eventuais e necessários “puxões de orelha”. A **Dra. Joseli Ferreira** (Lila, como é mais conhecida), que apesar de nunca ter me orientado diretamente, sempre me ajudou com suas críticas pertinentes.

Nesse longo período que estou no laboratório estabeleci relações com muitos estudantes que por lá passaram e que eu gostei de conhecer, no entanto gostaria, em especial, de agradecer: ao **Fabricio Dias da Silva**, que foi meu colega de trabalho em longos e complicados experimentos, agradeço a ajuda e paciência incondicional; a **Raquel Pina** pela ajuda nos momentos difíceis e conturbados, ao amigo **Josué da Costa Lima Junior** pelos comentários, sugestões pessoais e/ou profissionais sempre pertinentes; ao **Rodrigo Nunes**, amigo de laboratório, do mestrado, da mesa de bar e vida toda, sua paciência, ajuda e amizade

me ajudou muito nessa caminhada; ao **Thiago Lopes** sempre muito disciplinado e responsável, mas sem deixar o senso de humor de lado; aos amigos **Paulo Totino** e **Cesare Bianco** que sempre prestativos estiveram prontos a me ajudar ao longo desses anos; a **Vanessa Tosta**, pelas agradáveis conversas na escada sobre amenidades, sempre ajudando a aliviar a pressão nos momentos difíceis; à **tia Vilma**, pelas orações e por todo carinho dedicado a mim em todos os momentos; aos outros integrantes do LabMal, **Aline, Anne, Beatriz, Bianca, Bruno, Cristiane, Elisa, Jeane, Larissa Gomes, Larissa Longui, Luanda, Natália, Carol** e **Victor** que sempre alegraram, uns mais do que outros, o dia-a-dia de trabalho.

Quando começamos a nos dedicar em período integral a um trabalho, passamos mais tempo nesse local do que em nossas próprias casas, por isso agradeço aos pesquisadores, **Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro** e **Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz**, que por chefiarem o LabMal, proporcionam aos estudantes uma das melhores infra-estruturas do IOC. Ao **Dr. Leonardo de Carvalho** por aceitar a tarefa de ser o revisor desta dissertação e pela colaboração na minha formação acadêmica; a **Dra. Lilian Rose Pratt Riccio**, pela colaboração na minha formação acadêmica; a **Claudia Castro** e **Dauto Freitas**, que são pessoas essenciais para o bom funcionamento do LabMal.

Agradeço em especial, ao grupo do **Laboratório de Histocompatibilidade da UERJ**, ao **Dr. Luis Cristovão**, a **Dra. Juliana Cardoso**, ao doutorando **Gustavo Milson** pela colaboração que foram fundamentais na execução dos experimentos dessa dissertação.

Preciso também agradecer ao **CNPq** e à **FAPERJ** por terem financiado meus estudos e o projeto de pesquisa, possibilitando o desenvolvimento do trabalho. À **Fundação Oswaldo Cruz**, em especial: à **Pós-Graduação em Medicina Tropical**, por financiar, no que pode, a minha participação em congressos.

Aos amigos da PGMT - amigos que me fizeram aprender muito com as discussões, comentários e sugestões nesse processo inquietador de elaboração de uma dissertação.

Não posso deixar de registrar a importância dos meus amigos (extra-Fiocruz) e parentes que sempre compreenderam a minha ausência e correria ao longo desse tempo.

E por fim, a todos os voluntários do estudo que confiaram no nosso trabalho e gentilmente aceitaram participar do projeto.

Sumário

Lista de Tabelas	XVII
Lista de Figuras	XVIII
Lista de Abreviaturas	XIX
1. Introdução e Revisão de literatura	21
1.1 Situação atual da malária no mundo	21
1.2 A malária no Brasil	22
1.2.1 Nos dias de hoje	22
1.2.2 Dados históricos	23
1.3 Ciclo biológico do <i>Plasmodium spp.</i>	25
1.4 Aspectos gerais da resposta imune frente ao <i>Plasmodium spp.</i> na fase eritrocítica.....	28
1.4.1 O <i>IFN-γ</i>	30
1.4.2 Células <i>Natural Killer</i>	31
1.4.3 Receptores <i>KIR</i>	32
1.4.4 Genes <i>KIR</i>	33
1.4.4.1 Nomenclatura dos genes <i>KIR</i>	34
1.4.4.2 Interações entre receptores <i>KIR</i> e seus ligantes.....	36
1.5 Receptores <i>KIR</i> em associação com patologias.....	37
2.	Objetivos
.....	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3. Justificativa	40
4. Material e métodos	41
4.1 Área de estudo	41
4.1.1 Estado de Rondônia	41
4.1.2 Município de Porto Velho	42

4.2 Aspectos Éticos da Pesquisa	43
4.3 Voluntários	43
4.4 Critérios de exclusão dos voluntários	44
4.5 Grupo de estudo	44
4.6 Coleta de material.....	44
4.7 Exame parasitológico para o diagnóstico de malária e avaliação da parasitemia.....	45
4.8 Dosagem de níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> em indivíduos com malária.....	45
4.9 Caracterização dos receptores <i>KIR</i> e seus ligantes na população do estudo	46
4.9.1 Extração do DNA genômico	46
4.9.2 Genotipagem <i>KIR</i> e <i>HLA</i>	47
4.9.3 Amplificação do DNA genômico	47
4.9.4 Hibridização para genotipagem	48
4.10 Análises estatísticas	48
5. Resultados.....	49
5.1 População geral (indivíduos com e sem malária).....	49
5.1.1 Perfil da população geral.....	49
5.1.2 Distribuição das frequências dos genes <i>KIR</i> na população estudada.....	50
5.1.3 Distribuição das frequências dos ligantes de <i>KIR</i> : <i>HLA</i> (-A; -B e -C) na população estudada.....	51
5.1.4 Distribuição das frequências gênicas dos pares <i>KIR-HLA</i> (-A; -B e -C) na população estudada.....	52
5.1.5 Distribuição das frequências genotípicas da população estudada.....	53
5.1.6 Correlação entre a proporção dos genes inibidores e ativadores (razão INIB/ATIV) dos genótipos exclusivos do grupo nativo com os dados epidemiológicos.....	60
5.2 Grupo de indivíduos infectados	62
5.2.1 Perfil do grupo dos indivíduos com malária.....	62

5.2.2 Distribuição gênica dos receptores <i>KIR</i> , dos ligantes <i>HLA</i> (-A; -B e -C) e dos pares <i>KIR-HLA</i> (-A; -B e -C) em função da infecção malárica.....	64
5.2.3 Distribuição dos genótipos <i>KIR</i> em função da infecção malárica.....	66
5.2.4 Relação entre os genótipos <i>KIR</i> , níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> , níveis de parasitemia e dados epidemiológicos.....	67
5.2.5 Perfil epidemiológico, níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> e parasitemia dos indivíduos de acordo com a espécie plasmodial infectante.....	72
5.2.5.1 Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos dos indivíduos dos grupos <i>Pv</i> e <i>Pf</i> com os dados epidemiológicos, níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> e parasitemia.....	73
5.2.6 Distribuição das frequências dos genes <i>KIR</i> em função dos seus ligantes nos indivíduos com malária.....	73
6. Discussão.....	77
7. Referências.....	78
8. Anexos.....	89

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Características funcionais e estruturais dos receptores <i>KIR</i>	37
Tabela 4.1: Série histórica do número de casos de malária registrados na Amazônia Legal, 1993 a 2009.....	42
Tabela 4.2: Concentração dos padrões de amostras	46
Tabela 5.1: Principais características epidemiológicas da população do estudo	50
Tabela 5.2: Distribuição da frequência dos genes <i>KIR</i> na população do estudo	51
Tabela 5.3: Distribuição das frequências dos ligantes <i>KIR: HLA (-A; -B e -C)</i> na população do estudo	52
Tabela 5.4: Distribuição da frequência da associação <i>KIR-HLA (-A; -B e -C)</i> em população de área endêmica brasileira de malária	52
Tabela 5.5: Distribuição da frequência dos genótipos <i>KIR</i> observados na população de área endêmica de malária	54
Tabela 5.6: Distribuição dos genótipos comuns entre os grupos de nativos e migrantes.....	57
Tabela 5.7: Distribuição dos genótipos na população estudada em função de infecções prévias de malária.....	59
Tabela 5.8: Resumo do perfil clínico, epidemiológico e parasitológico dos indivíduos com malária	63
Tabela 5.9: Distribuição da frequência dos genes <i>KIR</i> em função da infecção malárica.....	64
Tabela 5.10: Distribuição das frequências dos ligantes <i>KIR: HLA (-A; -B e -C)</i> em função da infecção malárica.....	65
Tabela 5.11: Distribuição da frequência dos pares <i>KIR-HLA (-A; -B e -C)</i> em função da infecção malárica.....	65
Tabela 5.12: Distribuição das frequências dos genótipos <i>KIR</i> em função da infecção malárica.....	66

Tabela 5.13: Perfil epidemiológico e parasitológico dos indivíduos do grupo com malária portadores dos genótipos 33 e 42	67
Tabela 5.14: Níveis de parasitemia e níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> em função do genótipo dos indivíduos com malária.....	68
Tabela 5.15: Parasitemia, níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> e dados epidemiológicos em função da razão INIB/ATIV dos genótipos dos indivíduos com malária.....	71
Tabela 5.16: Perfil epidemiológico dos indivíduos de acordo com a espécie plasmodial infectante.....	72
Tabela 5.17: Níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> e parasitemia em função da presença dos pares <i>KIR-HLA</i> e/ou <i>HLA-C1</i>	73

Lista de Figuras

Figura 1.1: Distribuição mundial da malária, WHO 2009	22
Figura 1.2: Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA) nos anos de 2000 e 2009	23
Figura 1.3: Série histórica brasileira da incidência de casos de malária por espécie plasmodial, 1960 a 2010	25
Figura 1.4: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	27
Figura 1.5: Organização do conjunto dos genes <i>KIR</i> e representação dos haplótipos A e B.....	34
Figura 1.6: Esquema estrutural dos receptores <i>KIR</i>	35
Figura 1.7: Esquema da nomenclatura para os genes <i>KIR</i> adotada pelo HUGO (da sigla em inglês, <i>Human Genome Organization</i>).....	36
Figura 4.1: Localização geográfica de Rondônia	41
Figura 5.1: Distribuição dos genótipos na população estudada	55
Figura 5.2: Distribuição das frequências dos genótipos nos indivíduos nativos e migrantes.....	56
Figura 5.3: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos exclusivos do grupo dos nativos e número de malárias anteriores.....	61
Figura 5.4: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos exclusivos do grupo dos nativos e tempo desde a última malária (meses)	61
Figura 5.5: Níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> em indivíduos com malária	63
Figura 5.6: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos em relação à parasitemia.....	69
Figura 5.7: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos em relação aos níveis plasmáticos de <i>IFN-γ</i> D15..	69

Lista de Abreviaturas

- 19q:** Braço longo do cromossomo 19
ADCI: Inibição celular dependente de anticorpo
ATIV: Ativadores
BAF: Banco de dados *Allele frequencies* (www.allelefrequenciest.net)
CD4: Molécula expressa na superfície de células T auxiliares e em subpopulações de células *NKT* e *NK*
CD8: Molécula expressa na superfície de linfócitos T citotóxicos, e em subpopulações de células *NKT* e *NK*
CD16: Receptor de células *NK*, neutrófilos, monócitos e macrófagos
CD94: Receptor de células *NK* (também conhecida como *KLRD1 - killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1*)
CD94/NKG2: Receptor do tipo Lectina-C (formado pela associação covalente da proteína *CD94* e uma molécula de *NKG2*)
CpG: Dinucleotídeo ou sítio citosina-fosfato-guanina
DAPI12: Adaptador proteico transmembrana 12 (*DNAX activation protein of 12 kD*)
DP: Desvio padrão
DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano; Inseticida sintético
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
HLA: Antígenos Leucocitários Humanos (*Human Leucocyte Antigen*)
HUGO: *Human Genome Organization*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC: Intervalo de Confiança
IFN- γ : Interferon-gama
IgG: Imunoglobulina G
IL: Interleucina
INCRA: Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
INIB: Inibidores
IPA: Índice Parasitário Anual
ITIM: Imunoreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina
ITAM: Imunoreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina
Kb: Quilobyte
Km: Quilômetro
KIR: Receptores de células *NK* semelhantes à imunoglobulina (*Killer-cell Ig-like Receptor*)
LIR: Receptores de leucócitos semelhantes à imunoglobulina (*Leukocyte Ig-like Receptor*)
mL: Mililitros
min: Minutos
 μ L: Microlitros
 μ g: Miligrama
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)
min: minutos
N: Número de amostras
np: número de positivos
ng: nanograma
NK: célula *Natural killer*
NKG2: Receptor de ativação de células *NK* (também conhecido como *CD159a*)
NKT: célula T do tipo *Natural killer*

NO: Óxido nítrico
OMS (WHO): Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)
pb: Pares de bases
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
pg: picograma
PIACM: Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PNCM: Plano Nacional de Controle da Malária
PV: Porto Velho
Pv: *Plasmodium vivax*
Pf: *Plasmodium falciparum*
RO: Rondônia
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIVEP: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SISMAL: Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária
SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde
TA: Temperatura ambiente
TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta (também conhecido como Fator de Crescimento Transformante Beta)
Th1: Célula T *helper* do tipo 1
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
Vf: Volume final

1. Introdução e Revisão da Literatura

A malária é uma doença que acomete a humanidade desde a pré-história. É uma doença infecciosa de elevada prevalência, morbidade e letalidade, sendo causada por hematozoários do filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*. São cinco as espécies que parasitam naturalmente o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo esse último um parasito simiano recentemente descrito como causador de infecções entre humanos (1,2). Dentre essas espécies, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, sendo *P. falciparum* predominante no continente Africano e considerada a espécie de maior impacto na saúde pública em virtude de sua associação com as formas mais graves da doença e por apresentar multirresistência aos fármacos antimaláricos. Já a infecção por *P. vivax*, que nem sempre apresenta-se benigna, pode ser altamente debilitante causando importantes perdas sócio-econômicas (2,3). Os vetores de *Plasmodium* spp. são mosquitos do gênero *Anopheles*, destacando-se *An. gambiae* e *An. darlingi* como principais vetores na África e no Brasil, respectivamente (3, 4).

1.1 Situação atual da malária no mundo

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais da metade da população mundial está exposta à malária. Estima-se que 3,3 milhões de pessoas no mundo estejam expostas ao risco de infecção. Em 2009, foram estimados 225 milhões de casos no mundo com aproximadamente 781.000 mortes, a grande maioria proveniente das regiões tropicais do continente africano (Figura 1.1) (5). Apesar do continente africano ter superioridade no número de casos, as Américas vêm colaborando expressivamente com a estatística mundial. Nas Américas a malária ocorre em 21 países (Figura 1.1), sendo o *P. vivax* responsável por quase 80% dos casos (5). Devido ao sucesso nas estratégias de controle, o número de casos neste continente foi reduzido em aproximadamente 45% nos últimos nove anos, passando de 1,18 milhões de casos registrados em 2000 para 526 mil em 2009. Apesar dos resultados promissores, o Brasil ainda é responsável por mais de 50% do total de casos nas Américas (5,6).



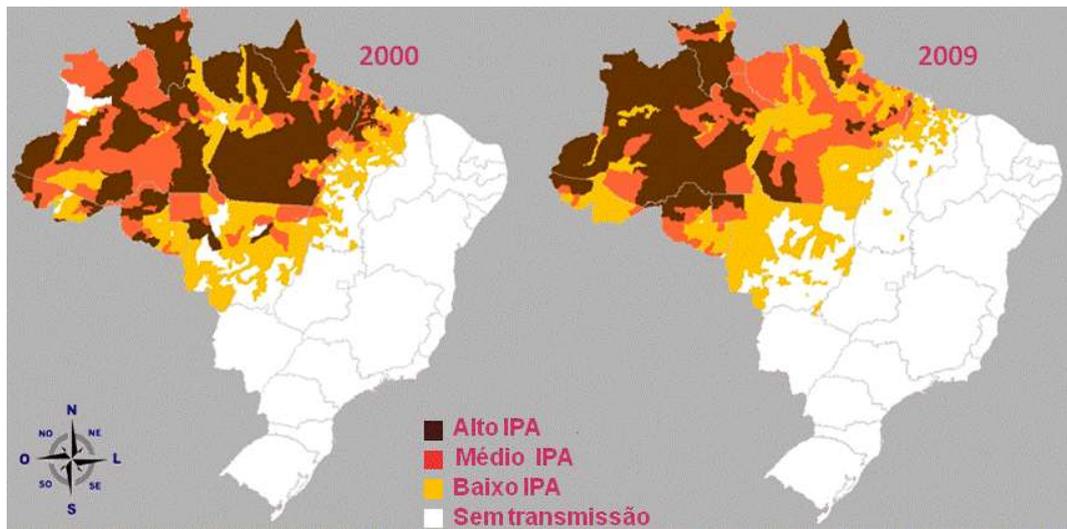
Figura 1.1: Distribuição mundial da malária, WHO 2009 (5).

1.2 A malária no Brasil

1.2.1 Nos dias de hoje

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária notificados ocorrem na Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 1.2) (7). Em 2010, foram registrados 334 mil casos de malária no Brasil, sendo 283.022 por *P. vivax*, 47.243 *P. falciparum*, 171 por *P. malariae*, 4 por *P. ovale*, além de 3.564 infecções mistas (*P. vivax* e *P. falciparum*) (8).

Segundo a estratificação epidemiológica estabelecida pela OMS, o padrão atual de endemicidade no Brasil é heterogêneo, com predomínio de áreas de alto risco, onde o número de casos positivos por 1000 habitantes (Índice Parasitário Anual – IPA) é maior que 50, em cinco dos nove estados da Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia) (Figura 1.2). Além da heterogeneidade, a transmissão nessas áreas endêmicas é considerada instável com flutuações sazonais anuais. É comum nessas áreas ocorrerem surtos epidêmicos que afetam adultos e crianças, podendo ser potencialmente grave quando a epidemia é causada por *P. falciparum* (8).



Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS (8).

Figura 1.2: Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA) nos anos de 2000 e 2009.

1.2.2 Dados históricos

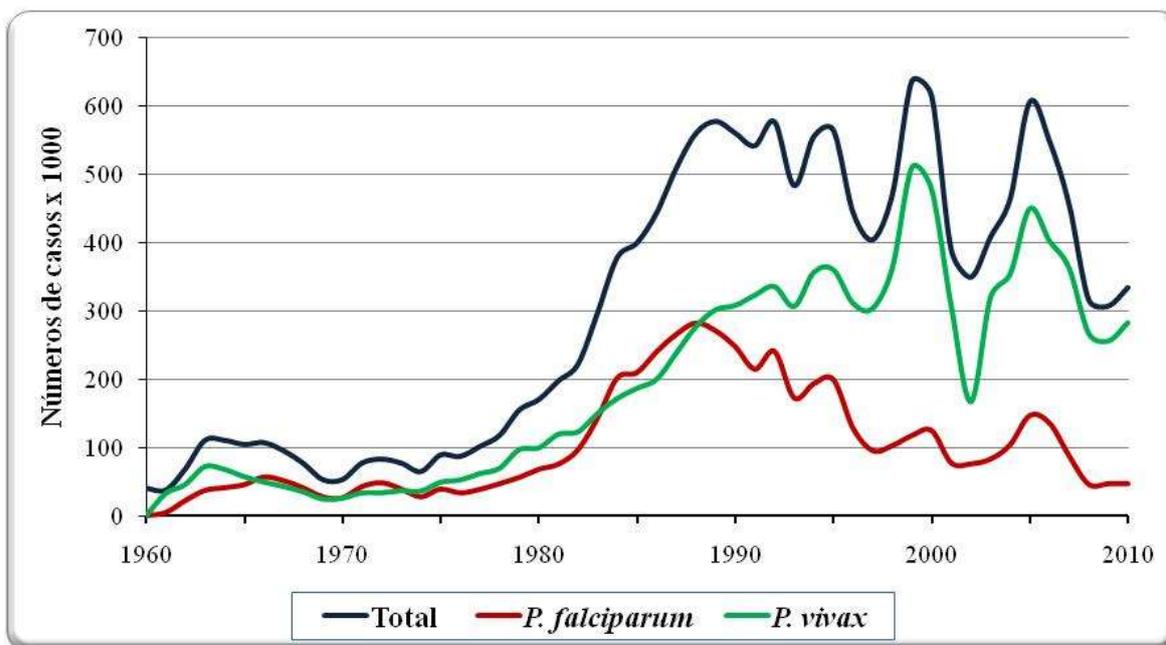
A malária foi identificada pela primeira vez nos registros médicos brasileiros no século XVI. Em meados de 1870, na era da borracha, ocorreu a primeira grande epidemia de malária na Amazônia, decorrente da migração de indivíduos não imunes para áreas endêmicas de malária atraídos pela extração de látex (9). Nesse mesmo período, no Sudeste do país, a transmissão crescia acentuadamente na Baixada Fluminense e no Vale do Paraíba, em decorrência da abolição da escravatura que fizeram cessar os trabalhos de combate à malária até então realizados pelos escravos (10). No início do século XX, a malária encontrava-se disseminada em todo o território nacional, exceto em alguns estados do Sul (9). Duas grandes epidemias de malária ocorreram no século XX: uma durante a construção da Ferrovia Madeira-Mamoré que resultou em uma nova onda de migração de indivíduos não imunes para áreas de elevada endemicidade da doença e outra no Nordeste brasileiro, na década de 1930, quando navios franceses que faziam a rota postal França-Natal via Dakar trouxeram o *An. gambiae* que invadiu o Nordeste brasileiro, este apresentando elevada capacidade vetorial gerou um aumento estrondoso na transmissão da doença. O vetor introduzido foi erradicado após grandes esforços e investimentos realizados pelo Governo Federal e pela Fundação Rockefeller (10-12).

Com o uso intensivo do DDT e o tratamento em massa da população, houve uma drástica redução da malária em diversos países do mundo, inclusive no Brasil, onde a doença ficou restrita, quase que exclusivamente, à região Amazônica. Porém, a partir da década de

60, a malária reemergiu em várias localidades do planeta. Esta ascensão está relacionada a diversos fatores como, por exemplo, o aparecimento de resistência tanto dos anofelinos aos inseticidas quanto dos parasitos aos antimaláricos e a dificuldade na manutenção de medidas de controle da doença em determinadas áreas devido a condições precárias de habitação (ausência total ou parcial de paredes para aplicação de inseticida), ao acesso difícil a muitas localidades, pela hidrografia da região e a precariedade dos serviços de saúde (13).

Na década de 70, com investimentos do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) que favoreceram o crescimento agrícola na região norte brasileira acelerando mais uma vez o processo migratório, houve como esperado um aumento do número de casos de malária na região, visto que este processo de migração não foi acompanhado por melhoras na infraestrutura de saúde (13,14).

No ano 2000 o Ministério da Saúde do Brasil deu início ao Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), que resultou em uma série de ações que reduziu significativamente, em torno de 50%, a incidência de casos da malária na região Amazônica, conforme pode ser observado na Figura 1.3 (15). Em 2003 o PIACM foi substituído pelo Plano Nacional de Controle a Malária (PNCM) que buscava a manutenção dos ganhos obtidos no plano anterior além de uma melhora do mesmo. Contudo, o número de casos de malária voltou a aumentar em 2003. Este aumento tem sido relacionado com a ocupação desordenada de periferias de cidades como Manaus (Amazonas), Porto Velho (Rondônia) e Cruzeiro do Sul (Acre), além de atividades extrativistas, agrícolas, de aquicultura e estabelecimento de assentamentos ilegais (16).



Fonte: Adaptado SVS, 2010 (14).

Figura 1.3: Série histórica brasileira da incidência de casos de malária por espécie plasmodial, 1960 a 2010.

Após três anos de aumento consecutivo, a partir de 2006 o número de casos de malária no Brasil começou a decair como resultado de ações integradas de controle, realizadas no âmbito federal, estadual e municipal. Diversos fatores estão relacionados a este decréscimo, dentre os quais se destacam a implementação de diagnóstico e tratamento rápidos e precisos, que também são responsáveis pela diminuição acentuada no número de infecções decorrentes por *P. falciparum* (17).

1.3 Ciclo biológico do *Plasmodium spp.*

O ciclo biológico dos plasmódios é complexo, apresentando duas fases no hospedeiro vertebrado: fase pré-eritrocítica e eritrocítica. Durante o repasto sanguíneo a fêmea do anofelino infectada inocula esporozoítos na pele do hospedeiro vertebrado (18). Trabalhos realizados em modelo experimental murino demonstraram que os esporozoítos inoculados se mantêm viáveis na derme durante várias horas, alguns atingem vasos sanguíneos e outros vasos linfáticos, e os invadem ativamente (18,19). Os esporozoítos que seguem pelos vasos linfáticos atingem os linfonodos e podem se desenvolver em formas exoeritrocíticas (modelo

experimental murino) gerando merozoítos infectantes, sendo liberados através de merossomos, assim como observado no ciclo hepático (18-20).

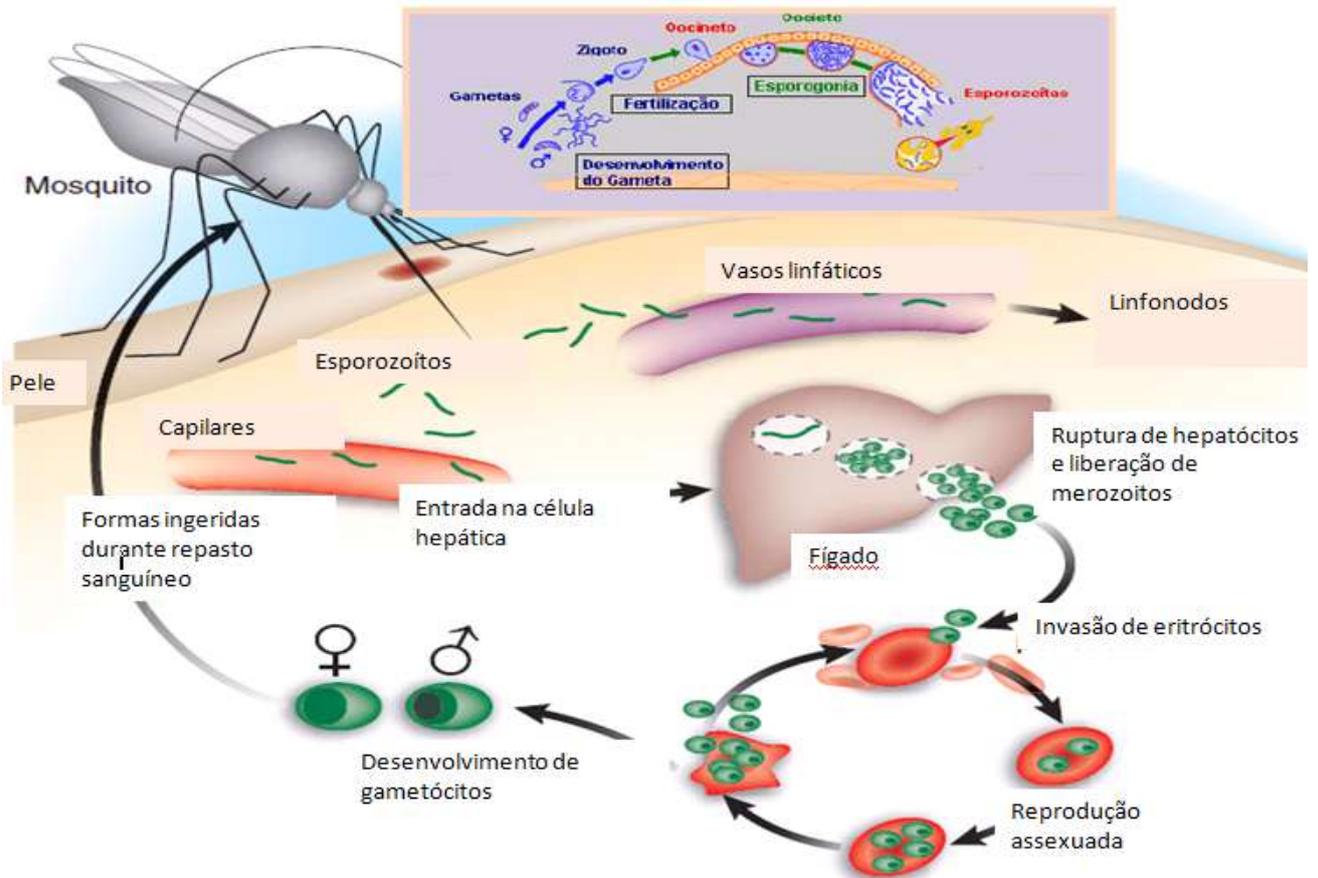
Os esporozoítos que chegam ao fígado logo se aderem às células endoteliais dos sinusóides hepáticos e iniciam o processo de movimentação denominado de *gliding*, na qual eles fazem um deslizamento. Em seguida eles atravessam a barreira sinusal, provavelmente via células de Kupfer. Uma vez no parênquima hepático estes parasitos migram através de diversos hepatócitos de forma ativa. Em um determinado momento o esporozoíto promove uma adesão mais firme em um hepatócito e inicia simultaneamente a formação de um vacúolo parasitóforo. Os fatores que tornam um hepatócito adequado para o desenvolvimento do esporozoíto ainda não estão esclarecidos (20).

No vacúolo parasitóforo, os esporozoítos iniciam um processo de maturação e de divisão celular (reprodução assexuada-esquizogonia extra-eritrocítica). Como resultado desta fase há o desenvolvimento de esquizontes hepáticos, repletos de merozoítos no seu interior. Durante esta etapa do ciclo a infecção é assintomática e seu tempo de duração, que varia entre as espécies, é estimado em: 8-11 dias em *P. falciparum*, 8-17 em *P. vivax*, 10-17 em *P. ovale*, 18-40 em *P. malariae* e de 9-12 em *P. knowlesi* (21). Em um determinado momento há liberação dos merozoítos para a circulação sanguínea, ou por ruptura do hepatócito/esquizonte ou através de merossomas, dando início ao estágio eritrocítico (3).

Os merozoítos invadem os eritrócitos de forma ativa através de interações ligante-específicas como: reconhecimento e adesão do merozoíto à membrana do eritrócito; reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula; formação de uma junção no ponto de contato entre o cone apical do parasito e a membrana do eritrócito, e movimento da junção ao redor do merozoíto, até que o parasito se encontre dentro da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo (22-24). No vacúolo parasitóforo o parasito se diferencia em trofozoíta jovem (anel), que posteriormente se diferencia em trofozoíta maduro. Esses iniciam novamente um processo de reprodução assexuada gerando a formação de esquizontes sanguíneos, também repletos de merozoítos. Os merozoítos recém formados são liberados e invadem outros eritrócitos, repetindo o ciclo eritrocítico, esse momento coincide com manifestações clínicas da doença. Alguns merozoítos, porém, se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos (forma sexuada do parasita). Estes, quando ingeridos pelos anofelinos, dão continuidade ao ciclo no interior do hospedeiro invertebrado (25).

No interior do anofelino os gametócitos se diferenciam em gametas, há a fecundação (reprodução sexuada) com formação do zigoto. O zigoto se diferencia em uma forma móvel (oocineto) que penetra a membrana peritrófica do intestino médio do anofelino. Nessa fase, inicia-se o processo de multiplicação celular que resulta na formação de diversos

esporozoítos, parte dos esporozoítos liberados na hemocele migra para as glândulas salivares do mosquito. A fêmea do anofelino, ao realizar repasto sangüíneo, inoculará essas formas no hospedeiro vertebrado (3), conforme mostrado na Figura 1.4.



Fonte: adaptado de Jones MK & Good MF, 2006 (26).

Figura 1.4: Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

Cada espécie de plasmódio apresenta peculiaridades no seu ciclo biológico, dentre elas: em *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam formas dormentes intra-hepáticas conhecidas como *hipnozoítos que* meses ou anos depois da infecção primária podem reativar-se resultando nas recidivas típicas da infecção humana por essas espécies; o *P. vivax* invade reticulócitos, enquanto o *P. falciparum invade* eritrócitos em qualquer estágio de maturação

sendo responsável, na maioria dos casos, por intensa parasitemia. A elevada parasitemia aliada ao seqüestro de hemácias parasitadas por *P. falciparum* na microcirculação são responsáveis pela maior mortalidade observada na infecção por esta espécie.

Apesar de muitas vezes ser considerada benigna, casos de malária por *P. vivax* com complicações graves e fatais vêm sendo relatados desde 1998, inclusive no Brasil (27). A sintomatologia da malária por *P. vivax* em geral é até mais intensa do que a maioria das infecções por *P. falciparum*, embora a noção popular seja o contrário. Esta noção equivocada associada à preocupação com os altos níveis de mortalidade relacionados ao *P. falciparum*, torna, muitas vezes, a infecção por *P. vivax* negligenciada (27).

1.4 Aspectos gerais da resposta imune frente ao Plasmodium spp. na fase eritrocítica

A fase eritrocítica do ciclo biológico dos plasmódios é responsável pelas manifestações patológicas da doença, uma vez que os sintomas clínicos são decorrentes do desenvolvimento parasitário durante essa fase. Diversos trabalhos tem demonstrado que a imunidade direcionada ao estágio eritrocítico pode contribuir tanto para a redução/eliminação dos parasitos quanto para o desenvolvimento das manifestações clínicas da doença (28).

A aquisição de uma imunidade protetora direcionada à infecção malárica natural pode ser adquirida, após sucessivas infecções, por populações de área endêmica. Essa imunidade, denominada de premunição, torna os sintomas clínicos da doença geralmente ausentes (imunidade clínica ou antidoença) e os níveis de parasitos sanguíneos extremamente baixos (imunidade antiparasito) atingindo níveis subpatentes (29-31). O processo de aquisição de imunidade na malária é, ainda hoje, pouco compreendido, sendo que inúmeros fatores o influenciam, como: a complexidade do ciclo biológico dos plasmódios, sua extensa diversidade antigênica, o perfil de transmissão da área endêmica, a maturidade do sistema imunológico relacionado à idade, *status* imunológico do indivíduo e/ou os mecanismos inatos de resistência que diferem intra e inter-etnicamente (31).

Em regiões de alta transmissão no continente Africano, onde o *P. falciparum* é a espécie predominante, os recém-nascidos são relativamente resistentes à infecção durante os primeiros meses de vida. Essa resistência é atribuída principalmente pela transferência passiva de anticorpos protetores da classe IgG da mãe para o feto durante a gestação e a lactação (32,33). O papel protetor dos anticorpos na infecção malárica foi claramente demonstrado a partir de experimentos de transferência passiva de anticorpos de soro de adultos imunes para crianças com malária, realizados nas décadas de 60 e 90 (34,35). Os anticorpos passivamente transferidos reduziam a parasitemia e protegiam as crianças da forma grave da doença (36).

Experimentos em modelos simianos evidenciaram que a proteção conferida pela transferência passiva de soro imune era mediada por anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 (37,38). Experimentos *in vitro* demonstraram que os anticorpos anti-*P. falciparum* agiriam dificultando a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas, seu desenvolvimento intra-eritrocítico em cooperação com monócitos e macrófagos (inibição celular dependente de anticorpo - *ADCI*) (39,40). Corroborando estes dados, alguns trabalhos verificaram que os anticorpos citofílicos têm um papel central na mediação do fenômeno de premunicação na malária, visto que tais subclasses são predominantes em indivíduos protegidos (41-44). Estudos realizados em seres humanos demonstraram que depois de repetidos inóculos com doses ultra-baixas de eritrócitos infectados com *P. falciparum* em voluntários sadios e sem história prévia de malária, estes foram capazes de desenvolver uma imunidade protetora contra a doença, com ausência de parasitemia e sintomas clínicos. Estes indivíduos apresentaram resposta imune caracterizada por uma resposta proliferativa de células T $CD4^+$ e $TCD8^+$ e secreção de *IFN- γ* , mas não apresentaram secreção de IL-4 e IL-10, consistindo em uma resposta imunológica do tipo *Th1*. Também foi observado nestes indivíduos uma alta concentração da atividade da enzima óxido nítrico sintase em células mononucleares do sangue periférico (45). Trabalhos têm sugerido que as interações iniciais entre os parasitos e as células do sistema imunológico inato são importantes no controle e resolução da infecção (46). O principal papel da imunidade inata parece estar relacionado à produção de citocinas imuno-reguladoras, como a interleucina IL-12 e *IFN- γ* que são críticas para o desenvolvimento de resposta imune tipo *Th1* envolvendo células T $CD4^+$, células B e células efetoras que mediam a resposta imune adaptativa tanto celular e quanto humoral (47).

1.4.1 O *IFN- γ*

O *IFN- γ* é uma citocina pró-inflamatória que tem um importante papel na limitação da progressão da infecção malárica e de suas complicações atuando em todas as fases do ciclo do plasmódio (pré-eritrocítica e eritrocítica) tanto em humanos quanto em modelo animais (48). Na fase eritrocítica, o *IFN- γ* pode atuar por diferentes mecanismos, dentre eles: ativando fagócitos a produzirem *TNF- α* , *TGF- β* , IL-1, IL-6, radicais de oxigênio, óxido nítrico (*NO*) e intermediários reativos de nitrogênio que, individualmente ou em conjunto com *IFN- γ* , inibem o crescimento e/ou eliminam o parasito (48-50) intensificando a fagocitose de merozoítos e hemácias parasitadas por macrófagos/monócitos (51-53) induzindo a troca de subclasses IgG nas células B, acarretando no predomínio de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3, em humanos) que promovem o mecanismo de *ADCI* parecendo assim ter um papel importante na inibição do crescimento do parasito intra-eritrocítico em associação com monócitos (54), além

de ser um importante direcionador da resposta imune para uma resposta do tipo *Th1* (pró-inflamatória) mais intensa na fase inicial da doença.

Cabe ressaltar que, embora um perfil de resposta imune pró-inflamatória seja relevante para o controle da infecção malárica, sua estimulação exacerbada pode acarretar danos ao hospedeiro (55,56). Em relação ao *IFN- γ* , resultados conflitantes vêm sendo descritos entre diferentes estudos que avaliam a associação entre os altos níveis de *IFN- γ* e o *status* clínico da infecção malárica. Na infecção humana, há trabalhos que relatam que altos níveis *IFN- γ* estão associados com a susceptibilidade e a patogenia da doença, contribuindo para a potencialização de sintomas agudos da malária, como febre, náusea e dores de cabeça através da indução de *TNF- α* e IL-1 e o aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (57-59). Entretanto, há outros estudos realizados seja em indivíduos naturalmente infectados seja em ensaios vacinais com *P. falciparum*, utilizando doses ultra-baixas de eritrócitos infectados, esporozoítos através de picadas de mosquitos infectados ou construções vacinais RTS, S/AS01/02, que vêm demonstrando que tais níveis de *IFN- γ* têm um papel crítico no controle da malária e com uma função maior de proteção do que qualquer ação relacionada com o agravamento da doença humana tanto natural quanto experimental (45, 50, 60-62). Vários fatores podem estar contribuindo para essa divergência de resultados, dentre eles: i) o *status* imunológico dos indivíduos; ii) a espécie plasmodial infectante e sua diversidade genética; iii) o nível de endemicidade da área e/ou; iv) as diferenças étnicas assim como o polimorfismo genético intrapopulacionais, por exemplo: polimorfismos dos genes *HLA*, *IFN- γ* , receptores de *IFN- γ* e *KIR* (45, 49, 51, 62).

As células *Natural Killer (NK)* são uma das principais fontes de *IFN- γ* na fase inicial da infecção malárica (50). Na malária humana por *P. falciparum*, foi demonstrado in vitro que as células *NK* são as primeiras a serem ativadas quando células mononucleares são expostas a hemácias infectadas por *P. falciparum* e que as concentrações séricas de *IFN- γ* e de granzimas A e B se elevam logo após a detecção de parasitas na circulação e no início dos sintomas (63,64). Estudos in vitro demonstraram que a produção de *IFN- γ* por células *NK* apresenta variações interindividuais, seja quando expostas a hemácias infectadas por *P. falciparum* ou a células tumorais (65). Essas variações podem estar associadas a diversos fatores, dentre eles os polimorfismos genéticos tanto dos parasitos quanto dos receptores das células *NK* e de seus ligantes (66).

1.4.2 Células Natural Killer

As células *Natural Killer* (*NK*) são grandes linfócitos granulares derivados da medula óssea, presentes tanto em órgãos linfóides quanto em tecidos não linfóides periféricos. As células *NK* compõem de 10 a 15% das células mononucleares sanguíneas. Baseado em sua linhagem de origem, repertório de receptores e funções efetoras, as células *NK* podem atuar: lisando diretamente as células alvo (granzimas e perforinas) secretando citocinas *IFN- γ* , *TNF- α* e GM-CSF, além de interagir com células dendríticas e ativar macrófagos a destruir microorganismos fagocitados e secretarem citocinas pró-inflamatórias direcionando para uma resposta imune tipo *Th1*. Tais células são componentes cruciais no controle imune de células tumorais, infectadas e sob estresse.

A participação de células *NK* em múltiplos aspectos da resposta imune inata e adaptativa é implementada por um amplo arranjo de receptores ativadores e inibidores presentes em sua superfície que interagem com moléculas ligantes na superfície de células alvo (67), sendo suas respostas dependentes das citocinas de IL-12 e IL-18 (50). Quando células *NK* interagem com células saudáveis sinais inibidores predominam sobre os sinais ativadores e elas, em geral, não são ativadas. No entanto, ao encontrarem células infectadas, tumorais ou sob estresse, sinais ativadores devem predominar capacitando as células *NK* a produzirem citocinas ou lisarem as células alvo.

Nos últimos anos, vários receptores de células *NK* e seus ligantes vem sendo identificados e caracterizados, contribuindo para o entendimento da reatividade e especificidade das células *NK*. Dentre eles estão os receptores que reconhecem moléculas *HLA* (Antígenos Leucocitários Humanos, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) de classe I, como: i) os semelhantes à imunoglobulina das células *NK-KIR* (da sigla em inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*); ii) os semelhantes à imunoglobulina de leucócito-*LIR* (da sigla em inglês, *Leukocyte Ig-like Receptors*); e iii) os *CD94/NKG2*. Contudo, há receptores de células *NK* que reconhecem um grupo heterogêneo de ligantes, dentre eles, o *CD16* que reconhece a porção Fc de anticorpos IgG1 e IgG3 e os chamados de receptores de citotoxicidade natural, que incluem os NKp46, NKp30 e NKp44 que reconhecem ligantes como Fc ϵ RI γ , Fc ϵ RI Σ e DAP2, respectivamente. Dentre esses receptores, os receptores *KIR*, assim como seus ligantes (*HLA*), são os que apresentam uma alta diversidade genética e haplotípica na população humana. Vários estudos vêm demonstrando associações de determinados genes *KIR* e genótipos *KIR/HLA* à incidência e à progressão de diversas doenças, como as: autoimunes, inflamatórias, tumorais e infecciosas, dentre elas a malária (68-72).

1.4.3 Receptores *KIR*

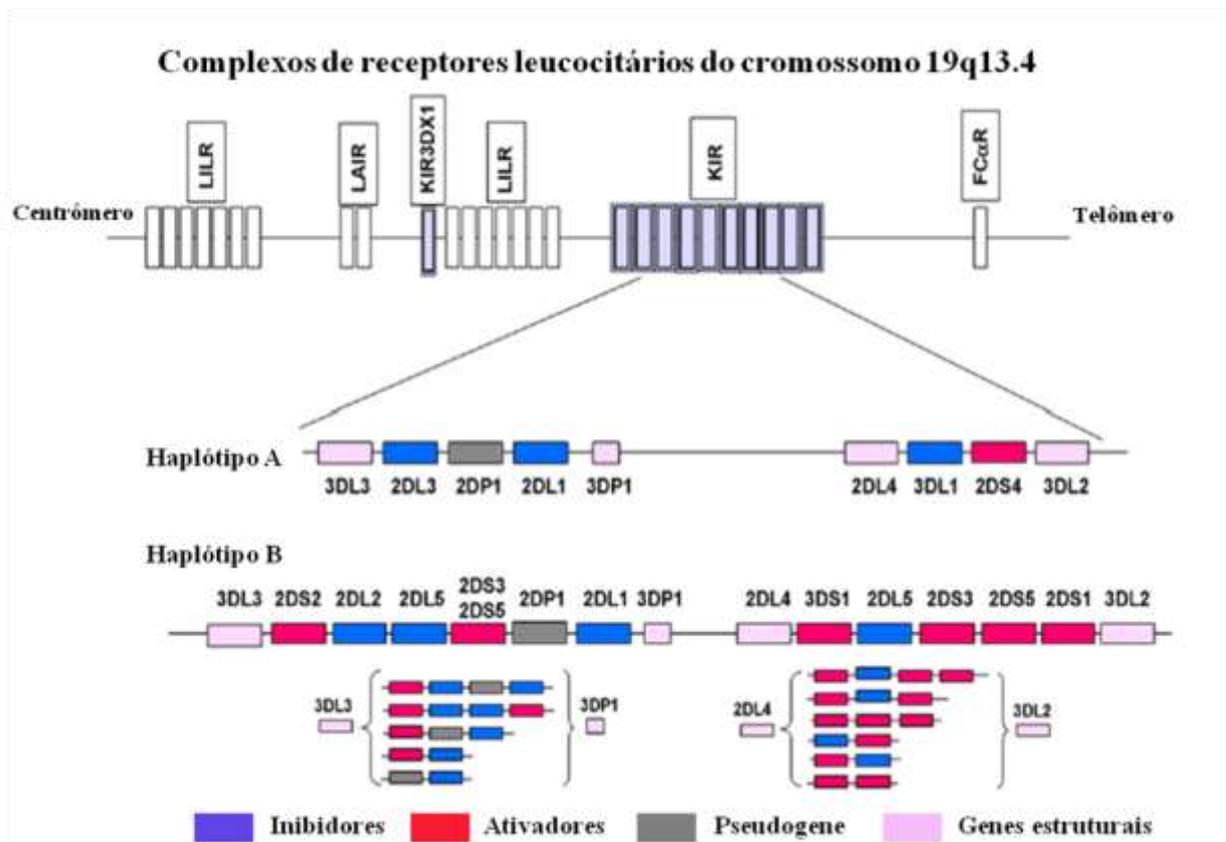
Os receptores *KIR* foram, primeiramente, identificados por sua habilidade de conferir alguma especificidade na citólise mediada por células *NK*. Esta especificidade se dá através da interação de moléculas *KIR* com moléculas *HLA* de classe I, podendo esta interação proteger células não alteradas da destruição causada pela citólise mediada por células *NK*, ou estimular essa atividade. Diferentes tipos de receptores *KIR* podem ser expressos na superfície das células *NK*, estes podem ser ativadores ou inibidores (72), havendo uma seleção combinatória de receptores a serem expressos pela célula. Portanto, em um indivíduo, as células *NK* podem expressar, aleatoriamente, um conjunto diferente de receptores ativadores e inibidores, ou seja, nem todas as células *NK* de um indivíduo apresentam os mesmos receptores. Essa expressão diferencial entre as células *NK* pode contribuir para a heterogeneidade nos níveis de ativação das células *NK*, observada tanto entre diferentes indivíduos quanto entre diferentes subpopulações de células *NK* de um mesmo indivíduo. Além disso, determinadas interações *KIR/HLA* também contribuem para essa heterogeneidade (73). Os mecanismos moleculares que regulam a expressão e distribuição celular dos receptores *KIR* ainda são desconhecidos. Entretanto, mecanismos epigenéticos, como a metilação de citosinas nos dinucleotídeos CpG, parecem ter um papel importante no estabelecimento e na manutenção de diferentes padrões de expressão dos genes *KIR* (74,75).

1.4.4 Genes *KIR*

Os receptores *KIR* são codificados por uma família de genes altamente polimórficos localizada no cromossomo 19 (19q13.4) dentro do complexo receptor leucocitário (LCR), e são expressos pelas células *NK* e subtipos de células T ($\gamma\delta$, $\alpha\beta$ efetora e de memória) (76). Até o momento foram identificados 17 genes *KIR* e dois pseudogenes, dispostos em *tandem* em um segmento de aproximadamente 150 Kb de *DNA* (77).

Os genes *KIR* formam diferentes haplótipos que são um conjunto de genes do mesmo cromossomo e que são herdados em bloco. Os haplótipos variam entre os seres humanos em relação ao número de genes ativadores e inibidores e as suas formas alélicas. Diante essa variação do conteúdo gênico, vários grupos de haplótipos *KIR* foram descritos, sendo os grupos de haplótipos A e B os mais prevalentes. Os haplótipos do grupo A contêm nove genes *KIR* e tem como característica a presença de somente um gene que codifica um receptor ativador, o *KIR2DS4* (78). Esse haplótipo tem baixa variabilidade genética, mas apresenta vários genes com grande variação alélica. Por outro lado, o haplótipo B tem entre um a cinco genes que codificam receptores ativadores e apresenta extrema diversidade em termos de

conteúdo gênico, entretanto possui menor variabilidade alélica. Os genes *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR2DL4* e *KIR3DP1* estão presentes em ambos os haplótipos e por isso são denominados de *framework* (genes estruturais ou genes moldura) (Figura 1.5) (78).



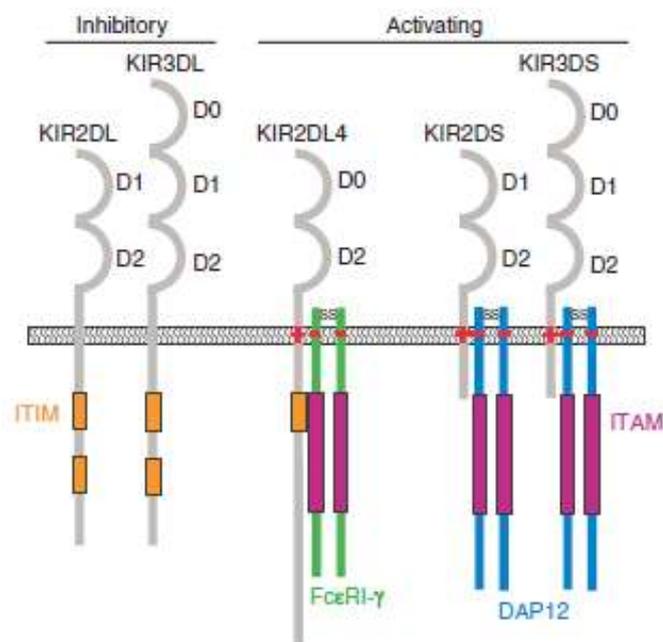
Fonte: adaptado de Kulkarni, S. *et.al.*, 2008 (79).

Figura 1.5: Organização do conjunto de genes *KIR* e representação dos haplótipos A e B.

1.4.4.1 Nomeclatura dos Genes *KIR*

Os genes *KIR* foram nomeados de acordo com duas características de sua estrutura proteica: o número de domínios “D” (D0, D1 e/ou D2) extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (dois domínios = 2D ou três domínios = 3D, *ex: KIR2D ou KIR3D*) e o tamanho da cauda citoplasmática, sendo “L” para caudas longas (do inglês, *long*; *ex: KIR2DL*) e “S” para caudas curtas (do inglês, *short*; *ex: KIR2DS*) (Figura 1.7). De modo geral, moléculas *KIR* que possuem caudas longas promovem sinais inibidores, em virtude da presença de Imunoreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático que são responsáveis pela inibição da transdução dos sinais ativadores nas células *NK* (80) enquanto os receptores de caudas curtas promovem sinais ativadores, em virtude da presença de Imunoreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina

(ITAM) que geralmente associados à molécula DAP12 (da sigla em inglês, *DNAX activation protein of 12 kD*), induzindo a produção de citocinas e quimiocinas que acarretam na ativação e diferenciação das células *NK* (81). O gene *KIR2DL4* excepcionalmente promove ambos os sinais inibidor e ativador (80, 81). Os pseudogenes *KIR* são identificados pela letra “**P**” logo após o dígito correspondente ao tipo de domínio, como, por exemplo, nos pseudogenes *KIR2DP* ou *KIR3DP* (69). Como demonstrado na Figura 1.8, após a nomeação destas duas características, o dígito seguinte é correspondente aos diferentes loci. A diversidade alélica dos genes *KIR* e os nomes dos alelos são baseados na nomenclatura utilizada para locos *HLA*. Assim, os três primeiros dígitos, após a designação do loci, distinguem alelos cujas diferenças nas seqüências de éxons conferem mudanças não sinônimas. O quarto e quinto dígitos indicam alelos que se distinguem por diferenças na seqüência de bases dos éxons, mas que se referem a mutações sinônimas (78).



Fonte: Campbell K S & Purdy A K, 2010 (78).

Figura 1.6: Esquema estrutural dos receptores *KIR*.



Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> (69).

Figura 1.7: Esquema da nomenclatura para os genes *KIR* adotada pelo *HUGO* (da sigla em inglês, *Human Genome Organization*).

1.4.4.2 Interações entre receptores *KIR* e seus ligantes

Para vários receptores *KIR* ainda não se conhece os ligantes (Tabela 1). Entretanto, os ligantes considerados mais importantes são as moléculas *HLA-C*. Os receptores *KIR* reconhecem dois grupos distintos de *HLA-C*, cuja diferença está no dimorfismo de aminoácidos na posição 77. O grupo 1 de epítomos de *HLA-C* apresenta serina na posição 77 (Cw1, w3, w7, w8 e outros alelos relacionados) e são reconhecidos por *KIR2DL2* e *KIR2DL3*. As moléculas do grupo 2 de *HLA-C* possuem asparagina na posição 77 (Cw2, w4, w5, w6 e outros alelos relacionados) e são reconhecidos por *KIR2DL1*. Outro receptor *KIR* cujo ligante está bem definido é o *KIR3DL1*, que reconhece o epítomo de *HLA-B* Bw4 (B*08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57 e 58). Outros *KIR* têm especificidades menos definidas, como *KIR3DL2*, que reconhece algumas variantes de *HLA-A* (A3, A11), ou não têm nenhum ligante conhecido até o momento. Apesar do receptor *KIR2DL4* apresentar cauda intracitoplasmática longa, este promove ativação de células *NK* em repouso, resultando em produção de *IFN-γ* sem atividade citotóxica. Isso ocorre, segundo evidências recentes, pela ligação deste receptor ao *HLA-G*. Apesar dos receptores *KIR* ativadores apresentarem uma estrutura de reconhecimento do ligante muito semelhante a receptores inibidores, como no par 2DL1/2DS1 e no trio de 2DL2/2DL3/2DS2, a afinidade de ligação das variantes ativadoras é fortemente reduzida em comparação às variantes inibidoras. Por isso, quando há ligação de receptores inibidores e ativadores ao mesmo tempo, acredita-se que o sinal inibidor prevaleça.

É importante salientar que os genes *KIR* e os genes *HLA* de classe I estão mapeados em cromossomos diferentes, assim a herança de ambos os genes é independente. Conseqüentemente, um determinado *KIR* ou o seu ligante *HLA* específico pode estar ausente em um indivíduo, acarretando em uma situação funcional nula (82). Entretanto o papel central atribuído a interação *KIR-HLA* na modulação das respostas imunes sugere que estes genes evoluíram conjuntamente, mantendo relações funcionais apropriadas, de modo que algumas moléculas codificadas por determinados alelos *KIR* possuam maior ou menor afinidade às moléculas *HLA* (83).

Tabela 1.1: Características funcionais e estruturais dos receptores *KIR*.

Receptores humanos	Região extracelular (Domínio Ig)	Ligantes	Função
<i>KIR2DS1</i>	D1D2	<i>HLA-C</i> Lys80	Ativador
<i>KIR2DS2</i>	D1D2	<i>HLA-C</i> Asn80	Ativador
<i>KIR2DS3</i>	D1D2	?	Ativador
<i>KIR2DS4</i>	D1D2	<i>HLA-C</i>	Ativador
<i>KIR2DS5</i>	D1D2	?	Ativador
<i>KIR3DS1</i>	D1D2	?	Ativador
<i>KIR2DL1</i>	D1D2	<i>HLA-C</i> Lys80	Inibidor
<i>KIR2DL2</i>	D1D2	<i>HLA-C</i> Asn80	Inibidor
<i>KIR2DL3</i>	D1D2	<i>HLA-C</i> Asn80	Inibidor
<i>KIR2DL5</i>	D0D2	?	Inibidor
<i>KIR3DL1</i>	D0D1D2	<i>HLA-Bw4</i>	Inibidor
<i>KIR3DL2</i>	D0D1D2	<i>HLA-A3</i>	Inibidor
<i>KIR3DL3</i>	D0D1D2	?	Inibidor
<i>KIR2DL4</i>	D0D2	<i>HLA-G?</i>	Ativ/Inib

Fonte: adaptado de Vilches C *et.al*, 2005 (84).

1.5 Receptores *KIR* em associação com patologias

A atividade das células *NK*, entre outros fatores, resulta de um balanço da interação entre receptores *KIR* de superfície ativadores e inibidores, e ligantes presentes nas moléculas *HLA* de classe I. Além disso, o elevado grau de polimorfismo tanto nos genes *KIR* quanto nos ligantes *HLA* podem afetar tanto função quanto o nível de especificidade e sensibilidade das células *NK* (85, 86). Recentemente, vários estudos vem associando a incidência e a progressão de diversas doenças com determinados genes *KIR*, dentre as quais doenças auto-imunes, neoplásicas e infecciosas (70).

Nas doenças infecciosas, estudos apontam que a interação entre receptores *KIR* e ligantes *HLA-C* tem um papel importante na progressão da hepatite pelo HCV (da sigla em inglês, *Hepatitis C Virus*). A maior frequência do genótipo *KIR2DL3/2DL3 – HLA-C1C1* foi

observada em indivíduos que respondiam bem ao tratamento, baixando os níveis de viremia (87). Por outro lado, a maior frequência dos genótipos *KIR2DL2/2DL3* ou *KIR2DL2/2DL3-HLA-C1C1* estava associada aos indivíduos com hepatite C crônica que não respondiam ao tratamento (88). Em relação à hepatite pelo *HBV* (da sigla em inglês, *Hepatitis B Virus*), foi observado que a combinação entre os receptores *KIR2DL1* e *HLA-C2* estava associada à susceptibilidade à hepatite B crônica, enquanto a presença do par *KIR2DL3 - HLA-C1C1* conferia uma expressiva vantagem no combate ao vírus da hepatite B (89). Nas infecções pelo *HIV* (da sigla em inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) a progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é mais lenta nos pacientes que possuem o receptor *KIR3DS1* e o ligante *HLA-Bw4* com isoleucina na posição 80 (90, 91). Por outro lado, uma progressão rápida da SIDA foi observada em indivíduos portadores do gene *KIR2DS2* quando comparado aos demais (92).

Na malária, em 2003, Artavanis-Tsakonas e colaboradores descreveram, *in vitro*, o primeiro relato sobre o possível envolvimento dos receptores *KIR* na ativação de células *NK* frente a hemácias infectadas por *P. falciparum*. As células *NK* que apresentavam o gene *KIR3DL2*002* secretavam altos níveis de *IFN-γ* em relação ao demais. Resultado, esse, intrigante visto que as hemácias não expressam os ligantes *HLA* em sua superfície. Entretanto, alguns trabalhos tem demonstrado que linhagens de células *NK* são capazes de formar rosetas com hemácias infectadas com *P. falciparum* (64, 93-95). Como alguns ligantes *KIR* ainda não foram identificados, esses resultados sugerem que essa interação seja mediada por ligantes não *HLA-I* como proteínas plasmodiais expressas na superfície das hemácias (93, 94). Um único estudo desenvolvido por Taniguchi e Kawabata (96) associando malária aos receptores *KIR* foi realizado em área de intensa transmissão na Oceania (Ilhas Salomão). Nesse estudo, foi observado uma maior frequência dos genes *KIR3DL1/S1* e *KIR2DS4* nos indivíduos infectados por *P. falciparum*. Sugerindo, portanto, que esses genes possam influenciar na suscetibilidade à malária nessa população, visto que as frequências tanto alélica como genotípica e haplotípica dos genes *KIR* variam enormemente entre diferentes populações como resultados de diferentes pressões seletivas (96).

2.1 Objetivo Geral:

Caracterizar o perfil da frequência gênica dos receptores *KIR* e seus ligantes *HLA* (-A, -B e -C) de indivíduos naturalmente expostos à malária e investigar uma possível associação entre esses genes e a infecção malárica.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Caracterizar o perfil da frequência gênica dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA* (-A, -B, -C) na população naturalmente exposta à malária e nos indivíduos infectados por *P. falciparum* e *P. vivax* em uma localidade da Amazônia brasileira – Porto Velho.

2.2.2 Investigar a possível influência dos genes *KIR* e de seus ligantes *HLA* (-A, -B e -C) sobre a susceptibilidade à malária através de parâmetros como número de malárias anteriores, tempo da última malária e espécies infectantes anteriores da população estudada.

2.2.3 Avaliar a influência do perfil gênico dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA* (-A, -B e -C) sobre a infecção malárica, avaliando parâmetros como intensidade de parasitemia e níveis plasmáticos de *IFN- γ* , na fase aguda (D0) e de convalescença (D15) dos pacientes com malária.

A malária é a doença parasitária que mais causa mortes em todo o mundo, representando um grande problema de saúde pública. A resposta imune na malária pode interferir tanto na manifestação quanto na proteção clínica da doença. Os mecanismos exatos envolvidos na patogênese e na produção de uma resposta imune eficaz ainda não foram bem esclarecidos. Sabe-se que além de fatores ligados ao grau de endemidade da área e a espécie plasmodial infectante, fatores genéticos do hospedeiro têm um papel fundamental tanto na suscetibilidade como na evolução clínica da infecção (45, 49, 51, 62). O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e as células *NK* são uma importante subpopulação de linfócitos atuantes na fase aguda da resposta imunológica na malária. Além disso, essas células também são importantes no desencadeamento das respostas imunológicas adaptativas contra malária (97, 98). O controle da ação das células *NK* se dá através de receptores de membrana, entre os quais estão os receptores *KIR* que reconhecem moléculas *HLA* de classe I expressas pela maioria das células do organismo. Devido ao extenso polimorfismo genético dos receptores *KIR*, assim como na regulação da sua expressão e sua ativação em diferentes clones de células *NK*, os receptores *KIR* desempenham função significativa no controle da resposta imune inata e adaptativa de cada indivíduo.

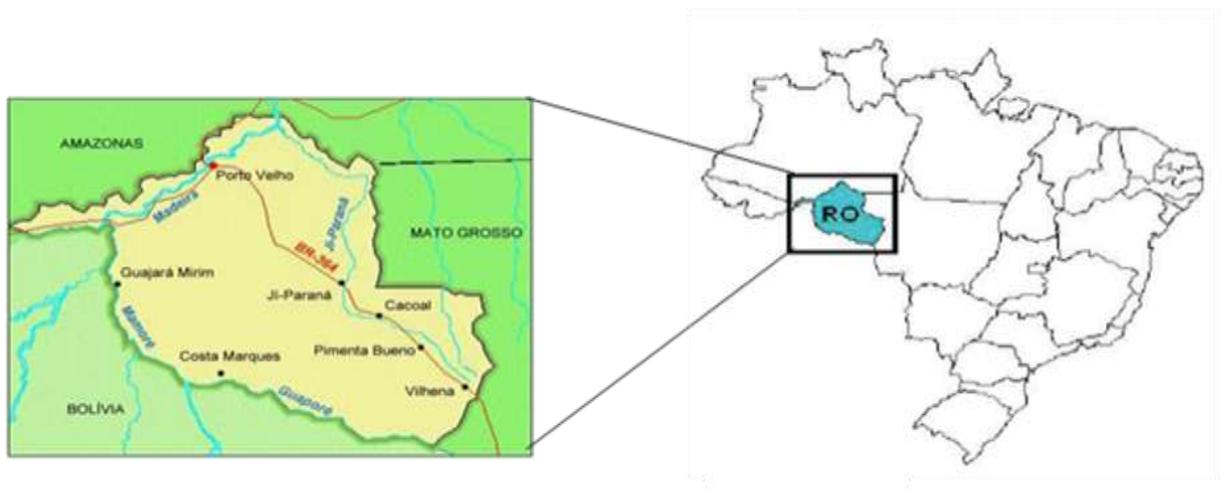
O conhecimento da distribuição da frequência gênica dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA* de classe I em populações de área endêmica de malária é essencial para o entendimento de seu papel na regulação da resposta imune, na relação com a incidência e a evolução clínica da doença.

4.1 Área de estudo

A área escolhida para realizar o estudo foi o município de Porto Velho, capital do Estado de Rondônia.

4.1.1 Estado de Rondônia

O estado de Rondônia se localiza na Região Norte, limitando-se com Amazonas ao norte, Mato Grosso a leste, Acre a oeste, e com a República da Bolívia ao sul. O estado faz parte da Amazônia Legal e possui dois terços da sua área cobertos pela floresta Amazônica. (Figura 4.1). Seus 52 municípios estão compreendidos em uma área total de 237.590,864 km² e conforme a contagem populacional estimada pelo IBGE em 2010, o número de habitantes foi de 1.560.501, sendo considerado, portanto, o 3º estado mais populoso da região Norte, perdendo somente para o Amazonas e Pará (99).



Fonte: Adaptado de Katsuragawa 2008 (100) e <http://www.brasilrepublica.com/rondonia.htm> (101).

Figura 4.1: Localização geográfica de Rondônia.

Entre os anos de 2004 e 2009, a posição de Rondônia em número de casos ficou oscilando entre o 2º e 3º lugar do país, mostrando que, comparado a outros estados endêmicos brasileiros, Rondônia ocupa uma posição de destaque na transmissão da malária (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Série histórica do número de casos de malária registrados na Amazônia Legal, 1993 a 2009.

Estado \ Anos	Pará	Rondônia	Acre	Amazonas	Roraima	Amapá	Tocantins	Maranhão	Mato Grosso
1993	137.195	101.298	15.431	55.422	16.283	5.020	2.551	16.222	129.711
1994	155.442	133.821	26.548	68.395	24.954	12.254	2.106	28.588	99.000
1995	185.900	134.231	36.063	52.602	39.574	17.031	3.716	32.819	59.089
1996	146.334	96.654	13.868	70.044	35.471	19.056	2.275	20.125	37.638
1997	144.012	69.182	6.125	94.382	25.949	24.868	1.633	20.981	15.976
1998	179.572	77.995	9.840	114.748	21.263	22.569	2.758	29.271	11.966
1999	248.233	63.296	23.730	167.722	36.238	28.646	2.031	54.800	10.950
2000	278.204	54.074	21.560	96.026	35.874	35.278	1.640	78.818	11.767
2001	186.367	57.679	7.774	48.385	16.028	24.487	1.244	39.507	6.832
2002	149.088	71.224	9.216	70.223	8.036	16.257	1.130	16.000	7.085
2003	115.510	93.852	12.264	141.005	11.818	16.651	1.211	11.432	5.022
2004	109.778	107.115	31.720	147.579	26.200	20.671	850	14.505	6.484
2005	123.406	118.633	57.242	226.413	31.964	28.059	717	11.196	8.437
2006	101.763	101.646	93.863	185.642	20.646	29.290	379	9.519	6.650
2007	76.207	81.929	51.277	197.141	15.236	21.975	288	6.621	6.760
2008	69.213	49.807	27.704	133.660	10.235	15.132	165	4.757	4.081
2009	98.756	41.355	27.491	98.551	14.425	14.599	126	5.661	3.269

Casos de malária em Rondônia, aproximadamente 10% do total de casos registrados no Brasil.

(14).

4.1.2 Município de Porto Velho

Porto Velho é a capital e o maior município do Estado de Rondônia, tanto em extensão territorial (abrange uma área de 34.068 km²) quanto em população (estima-se 426.558 habitantes em 2010) (99). Esse município fica localizado ao norte do estado de Rondônia e a margem direita do rio Madeira - que corta o município por cerca de 300 km - fazendo desse município um dos principais pontos de chegada de imigrantes e visitantes provenientes de outras localidades da bacia amazônica (100). Esta cidade é formada por planícies com serras de baixa altitude. Esta área é coberta por floresta tropical e apresenta temperatura média acima de 28°C e umidade relativa do ar elevadas além de chuvas abundantes (99). Esses fatores aliados a grande prevalência do vetor *An. darlingi* fazem da maioria das localidades dentro do município de Porto Velho e adjacências regiões de alto risco de transmissão.

Ainda hoje, tanto o Estado de Rondônia quanto sua capital permanecem apresentando elevados índices de casos de malária. Em 2010 foram diagnosticados 42.576 casos em Rondônia e Porto Velho foi responsável por 22.690 desses casos. Dentre os casos notificados, o *P. vivax* contribuiu com 91,5% deles, seguido de 8% de casos por *P. falciparum* e 0,5% de casos por infecções mistas (*P. vivax* e *P.falciparum*). O IPA de Porto Velho em 2010 foi de 59,2 (6).

4.2 Aspectos Éticos da Pesquisa

O protocolo de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz- CEP/FIOCRUZ sob o no 354/06 (Anexo 1).

4.3 Voluntários

A população de estudo foi constituída por 377 indivíduos naturalmente expostos a infecção malárica residentes no município de Porto Velho. Essa população é composta por indivíduos residentes às margens do rio Madeira e alguns de seus afluentes como os rios Candeias e Jamari e indivíduos residentes de área rural, constituída por estradas de barro denominadas de “Linhas” (perpendiculares à BR 364), que penetram por dezenas de quilômetros no interior da floresta. Destes indivíduos, 93 estavam com malária, sendo 64 por *P. vivax*, 28 por *P. falciparum* e uma infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*). Os indivíduos infectados foram avaliados no dia do diagnóstico, antes do início do tratamento (D0) e aproximadamente 15 dias após (D15). Os pacientes que apresentaram diagnóstico positivo para malária (independente da participação em nosso trabalho) foram submetidos ao tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (cloroquina associada à primaquina para infecções por *P. vivax* e artemeter com lufemantrina (COARTEM®) para os indivíduos com *P. falciparum*) (8). Todos os indivíduos foram informados sobre as formas de transmissão da malária, medidas profiláticas e sobre o projeto de pesquisa. Todos assinaram um termo de consentimento que formaliza a participação desses indivíduos como voluntários. Após o consentimento dos indivíduos, foi obtida a assinatura do voluntário ou de seu responsável formalizando a sua participação no projeto (Anexo 2). Os voluntários foram avaliados clinicamente por um médico e participaram de uma entrevista que teve como objetivo o preenchimento de um questionário de investigação de dados pessoais, clínicos e epidemiológicos (Anexo 3).

4.4 Critérios de exclusão dos voluntários

Foram excluídos de nosso estudo indivíduos de populações indígenas, grupos religiosos, militares, presidiários, doentes mentais, parturientes e gestantes, além de indivíduos abaixo de 10 anos de idade.

4.5 Grupos de estudo

Para análise dos dados os indivíduos estudados foram classificados primeiramente de acordo com sua procedência. Essa classificação deu origem ao grupo de Nativos (grupo de indivíduos oriundos de área endêmica de malária) e Migrantes (grupo de indivíduos oriundos de área não endêmica de malária). Esses indivíduos também foram classificados pela presença ou ausência de infecção malárica em grupo de indivíduos com malária e sem malária. O grupo de indivíduos com malária ainda foi subdividido de acordo com a espécie plasmodial infectante. Essa classificação deu origem ao grupo *P. vivax* (Grupo *Pv*) e ao grupo *P. falciparum* (Grupo *Pf*). Um grupo controle foi criado para análises dos níveis plasmáticos de *IFN- γ* . Este grupo era composto de indivíduos residentes no centro de Porto Velho, apresentavam exame negativo para malária (gota espessa), com idade superior a 12 anos, sem história pregressa de malária ou que relataram no máximo quatro infecções, sendo que a última havendo ocorrido há um ano ou mais.

4.6 Coleta de material

Após o preenchimento do questionário com os dados epidemiológicos e as informações pessoais dos indivíduos, amostras de sangue foram coletadas por venipunctura em tubos tipo *vacutainer* (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) contendo heparina sódica (20 mL) para a obtenção do plasma e contendo EDTA (10 mL) para extração de DNA. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (3500 x g) por 10 min para a separação do plasma dos elementos figurados do sangue. O sedimento (papa de hemácias e leucócitos) foi distribuído em alíquotas de 1 mL e estocado a -20 °C até o momento do uso. O plasma obtido deste processo também foi distribuído e armazenado a -20°C em alíquotas de 5 mL até o momento do uso.

4.7 Exame parasitológico para diagnóstico de malária e avaliação da parasitemia

Para realização do diagnóstico de malária foram realizados o exame de gota espessa e distensão sanguínea, ambos corados pelo Giemsa (Sigma Chemical CO, St Louis, USA). As lâminas foram observadas inicialmente por um dos microscopistas do Laboratório de Microscopia da Gerência de Malária do Posto de Saúde da Policlínica Ana Adelaide, que identificava a espécie plasmodial e quantificava a parasitemia em cruces. Após a inclusão do paciente, a espécie plasmodial era confirmada por um pesquisador de nossa equipe e o número de parasitas era contabilizado em 200 leucócitos. Se nove ou menos parasitas fossem

encontrados, 300 leucócitos adicionais eram contados, a fim de obter uma maior precisão na parasitemia final destes pacientes.

$$\frac{\text{Número de parasitas} \times 8000}{\text{Número de leucócitos}} = \text{Parasitas}/\mu\text{L}$$

4.8 Dosagem de níveis plasmáticos de *IFN-γ* dos indivíduos com malária

Para verificarmos os níveis plasmáticos de *IFN-γ* dos indivíduos estudados foi utilizado um *kit* de tecnologia de análise múltipla para citocinas conhecido como Multiplex (do inglês *Multiplex Cytokine Analysis Technology*). O protocolo foi realizado seguindo as instruções do fabricante (17-plex human cytokine painel, N° catálogo 171-A11171, Bio-Rad, EUA). Em resumo, as amostras foram diluídas em tampão fornecido pelo kit, em seguida o padrão de citocina (também fornecido) foi diluído e plaqueado (Tabela 4.2). As *beads* específicas para cada citocina analisada foram adicionadas aos poços e foram incubadas. A placa foi lavada a vácuo e em seguida foi adicionado os anticorpos biotinizados específicos para cada citocina. Após a incubação, foi então adicionada estreptavidina-PE, prosseguindo de nova incubação. Uma solução “de parada” fornecida pelo kit foi adicionada e a placa foi então novamente lavada a vácuo. Após a ressuspensão das *beads* com tampão de amostra, foi realizada a leitura da placa no aparelho de Luminex. O cálculo das amostras foi processado pelo programa fornecido pelo aparelho.

Tabela 4.2: Concentração dos padrões de amostras.

Amostra padrão (μL)	Volume de Tampão - PBS (μL)	Concentração final da amostra padrão (Pg/mL)
128	72	32000
50	150	8000
50	150	2000
50	150	500
50	150	125
50	150	31,3
50	150	7,8
50	150	1,95

4.9 Caracterização dos receptores *KIR* e seus ligantes na população de estudo

4.9.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído seguindo o protocolo do kit QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi (Quiagen, Valencia, CA, USA). Aproximadamente 1 mL do sedimento, de cada amostra, previamente descongelada e a temperatura ambiente (TA), foi adicionado ao tubo do tipo *falcon* de 15 mL e acrescida de 100 µL de protease (Quiagen), a mistura foi então homogeneizada levemente. Em seguida, foram adicionados 1,2 mL do tampão AL (Quiagen) e o tubo foi novamente homogeneizado manualmente, por inversão, durante 15 seg, seguindo-se uma vigorosa agitação por pelo menos 1 min. A mistura foi incubada a 70°C por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de etanol 96% - 100% (Sigma) e o mesmo procedimento de homogeneização foi realizado. O lisado assim obtido foi, então, aplicado cuidadosamente na coluna (acoplado em um tubo coletor de 15 mL), a qual foi submetida à centrifugação a 1850 x g por 3 min (TA). O filtrado foi descartado e a coluna foi acoplada em um novo tubo coletor de 15 mL. Foram adicionados, 2 mL de tampão AW1 (Quiagen) na coluna, seguindo-se de uma centrifugação de 4500 x g por 1 min (TA). Novamente o filtrado foi descartado e a coluna foi acoplada em um novo tubo coletor de 15 mL, no qual foram adicionados 2 mL de tampão AW2 (Quiagen), repetindo-se o procedimento de centrifugação a 4500 x g por 15 min (TA). Após o descarte do filtrado, a coluna foi transferida para um novo tubo do tipo *falcon* de 15 mL e, logo após, foram acrescentados 200 µL de tampão AE (Quiagen) diretamente no centro da membrana. A coluna foi incubada por 5 min (TA) e, centrifugada a 4500 x g por 2 min (TA). O filtrado contendo o DNA isolado foi coletado e armazenado num tubo do tipo *epENDORF* de 1,5 mL previamente identificado e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.9.2 Genotipagem *KIR* e *HLA*

Foram utilizados os kits *One lambda Incorporation – LABType SSO Typing Test* para genotipagem de 16 genes *KIR* (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1, 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1 e 3DP1) e *HLA-A*, -Bw4 (locus A e B), -Bw6 e -C (Grupos C1 e C2). Estes kits possuem primers locus específicos e sondas oligonucleotídeas específicas imobilizadas em microesferas para identificação dos alelos.

4.9.3 Amplificação do DNA genômico

A análise do segmento gênico correspondente aos genes dos receptores *KIR* e *HLA* descritos anteriormente foi feita através da técnica de *PCR* (Reação em Cadeia da Polimerase). A reação de *PCR* foi realizada conforme os protocolos abaixo:

Reagentes	Quantidade (µL)	Condições de amplificação	
D-Mix	13,8	1 ciclo - 96° por 3min	
Primer	4,0	5 ciclos	96°C – 20s
<i>Taq</i>	0,2		60°C – 20s
Polimerase			72°C – 20s
		30 ciclos	96°C – 10s
			60°C – 15s
			72°C – 20s
		1 ciclo - 72°C – 20s	
		4°C ∞	

OBS.: A concentração do DNA genômico foi ajustada para 20 ng/µL.

Após amplificação, o material genético foi visualizado em gel de agarose por coloração de brometo de etídeo e exposto a luz ultravioleta.

4.9.4 Hibridização para genotipagem

Em uma placa de 96 poços foi adicionado 5 µL do *DNA* amplificado e 2,5 µL do tampão de desnaturação e incubada à TA por 10 min. Em seguida foi acrescentado 5 µL do tampão de neutralização e a placa foi colocada em banho de gelo. Durante a incubação foi realizada a diluição das *beads* (2 µL das *beads* em 16 µL de tampão de hibridização). Ao término da incubação foi adicionada a mistura das *beads* e a placa foi então incubada a 60°C por 15 min. Após três lavagens com 100 µL de solução de lavagem presente no *kit* por centrifugação a 9200 x g por 5 min foi adicionado estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE) diluído 1/100. A placa foi novamente incubada a 60°C por 5 min seguida de nova lavagem com 100 µL de tampão (fornecida pelo *kit*) e levada para leitura no equipamento *LABScan*TM 100 (Luminex - *One Lambda*, Canoga Park, CA, EUA). O resultado obtido foi analisado em *software* (*LABType*^r *HD*, *Luminex*^R *version 2.2*) fornecido pelo fabricante do material utilizado.

4.10 Análises estatísticas

Dados demográficos, clínicos, parasitológicos e epidemiológicos contidos no questionário e os resultados dos experimentos da dosagem plasmática de *INF- γ* e da genotipagem dos genes *KIR* e *HLA* dos indivíduos, foram armazenados no Banco de dados Epi-info (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA) e analisados através do programa Graphpad Prism versão 5.0 (San Diego, CA). O teste *t* de *Student* foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias dos parâmetros epidemiológicos observados. Diferenças de proporções foram avaliadas pelo teste do *chi-quadrado* (*c2*). Após comparações descritivas, as associações foram avaliadas por bipartição do *c2* usadas para *KIR*, *HLA* (-A,-B,-C), pares *KIR-HLA* (-A,-B,-C) e distribuição dos genótipo. O teste não paramétrico de *Spearman* foi utilizado na avaliação das correlações entre duas variáveis mensuradas ordinalmente, sendo a correlação calculada pelo coeficiente de *Spearman* (*r*). Foram considerados significativos dados que apresentavam $P < 0,05$.

5.1 População geral (indivíduos com e sem malária)

5.1.1 Perfil da população geral

A Tabela 5.1 resume as principais características epidemiológicas da população do estudo. Participaram do presente estudo 377 indivíduos independentes de estarem com malária ou não, no momento da coleta. Do total dos indivíduos, 93 (25%) estavam com malária no momento da coleta, sendo 64 indivíduos (69%) com malária vivax, 28 (30%) com malária falciparum e 1 (1%) com malária mista. A maioria dos indivíduos (59%) era do sexo masculino com idade entre 13 e 54 anos (34 ± 16). Segundo os relatos dos indivíduos, a maioria era nativa (297/79%) da região Amazônica e apenas 80 (21%) eram migrantes provenientes de regiões não endêmicas de malária e residiam em área endêmica de malária em média há 22 anos. Quanto à história pregressa de malária, foi relatada uma média de 12 episódios, sendo o último em média há 40 meses. Apenas nove indivíduos relataram nunca ter tido malária e estavam tendo a primeira infecção no momento do nosso estudo.

Tabela 5.1: Principais características epidemiológicas da população do estudo.

Gênero		
	Masculino (N/%)	223/59
	Feminino (N/%)	154/41
	Total (N)	377
Idade (\bar{x} + DP)		
		34+16
Anos de residência em área endêmica de malária (\bar{x} + DP)		
		22+17
Número de infecções maláricas anteriores (\bar{x} + DP)		
		12+9
Tempo desde a última infecção em meses (\bar{x} + DP)		
		40+60
Indivíduos com malária (N/%)		
		93/25
	<i>P. vivax</i> (N/%)	64/69
	<i>P. falciparum</i> (N/%)	28/30
	Mista: <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (N/%)	1/1
Espécies de <i>Plasmodium</i> contraídas em episódios prévios		
	Nenhuma (N/%)	32/8,5
	<i>P. vivax</i> (N/%)	83/22
	<i>P. falciparum</i> (N/%)	32/8,5
	<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (N/%)	187/50
	Não se lembra (N/%)	43/11
Procedência		
	Nativos de área endêmica (N/%)	297/79
	Migrantes de área não endêmica (N/%)	80/21

\bar{x} : média; DP: desvio padrão; N: número de indivíduos

5.1.2 Distribuição das frequências dos genes *KIR* na população estudada

Dentre os 16 genes *KIR* descritos os mais frequentes na população estudada foram: *KIR2DP1* (95,5%), seguido de *KIR2DL1* (94,9%), *KIR3DL1* (93,9%), *KIR2DS4* (93,6%), *KIR2DL3* (89,1%) e *KIR2DL5* (58,6%) ($P < 0,001$, em relação a todos os outros, exceto entre eles) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Distribuição da frequência dos genes *KIR* na população do estudo.

Receptores <i>KIR</i>	Positivos (N=377) np	Frequência (%)
Inibidores		
<i>KIR2DL1</i>	358*	94,9
<i>KIR2DL2</i>	175	46,4
<i>KIR2DL3</i>	336*	89,1
<i>KIR2DL5</i>	221*	58,6
<i>KIR3DL1</i>	354*	93,9
Ativadores		
<i>KIR2DS1</i>	163	43,2
<i>KIR2DS2</i>	156	41,4
<i>KIR2DS3</i>	85	22,5
<i>KIR2DS4</i>	353*	93,6
<i>KIR2DS5</i>	162	42,9
<i>KIR3DS1</i>	153	40,6
Estruturais		
<i>KIR2DL4</i> ^{#‡}	376	99,7
<i>KIR3DL2</i> [#]	376	99,7
<i>KIR3DL3</i> [#]	375	99,5
<i>KIR3DP1</i> [♦]	377	100
Pseudogene		
<i>KIR2DP1</i>	360*	95,5

N: número de indivíduos do estudo; np: número de indivíduos positivos; **KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR2DP1* versus todos os outros ($P < 0,0001$), exceto entre eles ($P > 0,05$); # : genes estruturais e inibidores; ‡: gene estrutural, inibidor e ativador e ♦ : gene estrutural e pseudogene.

5.1.3 Distribuição das frequências dos ligantes de *KIR*: *HLA* (-A; -B e -C) na população estudada

Dentre os cinco *HLA*-1 ligantes de *KIR* analisados, os mais frequentes foram: *HLA*-C1 (79,6%), seguido de *HLA*-Bw4 (70,8%) e *HLA*-C2 (66,8%) ($P < 0,001$, para todos) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Distribuição das frequências dos ligantes de *KIR*: *HLA* (-A; -B e -C) na população do estudo.

Receptores <i>HLA</i>-1	Positivos (N=377)	Frequência (%)
	np	
<i>HLA</i> -C1	300	79,6 ^a
<i>HLA</i> -C2	252	66,8 ^a
<i>HLA</i> -Bw4	267	70,8 ^a
<i>HLA</i> -A3 e/ou <i>HLA</i> -A11	88	23,3
<i>HLA</i> -Cw4	119	31,6

N: número de indivíduos do estudo; np: número de indivíduos positivos; ^a: *HLA*-C1, -C2, -Bw4 versus *HLA*-A3/A11 e -Cw4 ($P < 0,0001$ para todos).

5.1.4 Distribuição das frequências gênicas dos pares *KIR*-*HLA* (-A; -B e -C) na população estudada

Como demonstrado na Tabela 5.4 os pares receptor/ligante mais frequente na população foram: *KIR2DL2_3/C1* (79,6%), seguido dos pares *KIR3DL1/Bw4* (66,3%) e *KIR2DL1/C2* (64,4%), ($P < 0,001$ em relação a todos, exceto entre eles).

Tabela 5.4: Distribuição das frequências da associação *KIR*-*HLA* (-A; -B e -C) em população de área endêmica brasileira de malária.

Par Receptor-Ligante	Positivos (N=377)	Frequência (%)
(<i>KIR</i>-<i>HLA</i>-1)	np	
Inibidores		
<i>KIR2DL1_C2</i>	243	64,4 ^a
<i>KIR2DL2/3_C1*</i>	300	79,6 ^a
<i>KIR3DL1_Bw4</i>	250	66,3 ^a
<i>KIR3DL2_A3/A11</i>	88	23,3
Ativadores		
<i>KIR2DS1_C2</i>	112	29,7
<i>KIR2DS2_C1</i>	125	33,1
<i>KIR3DS1_Bw4</i>	114	30,2
<i>KIR2DS4_Cw4</i>	105	27,8

N: número de indivíduos do estudo; np: número de indivíduos positivos; *: soma das frequências de *KIR2DL2_C1* e *KIR2DL3_C1*; ^a: *KIR2DL2_C2*, *KIR2DL2/3_C1*, *KIR3DL1_Bw4* versus todos os outros, ($P = 0,0001$).

5.1.5 Distribuição das frequências genótípicas da população estudada

Os genótipos *KIR* descritos na população estudada foram listados na Tabela 5.5, juntamente com o número total de locos inibidores e ativadores. Dentre os 377 indivíduos que participaram do estudo, foram observadas 48 configurações genótípicas *KIR* numeradas de 1 a 48. Os genótipos encontrados na população estão descritos no banco de dados *Allele frequencies* - “*BAF*” (www.allelefrequencys.net) (103).

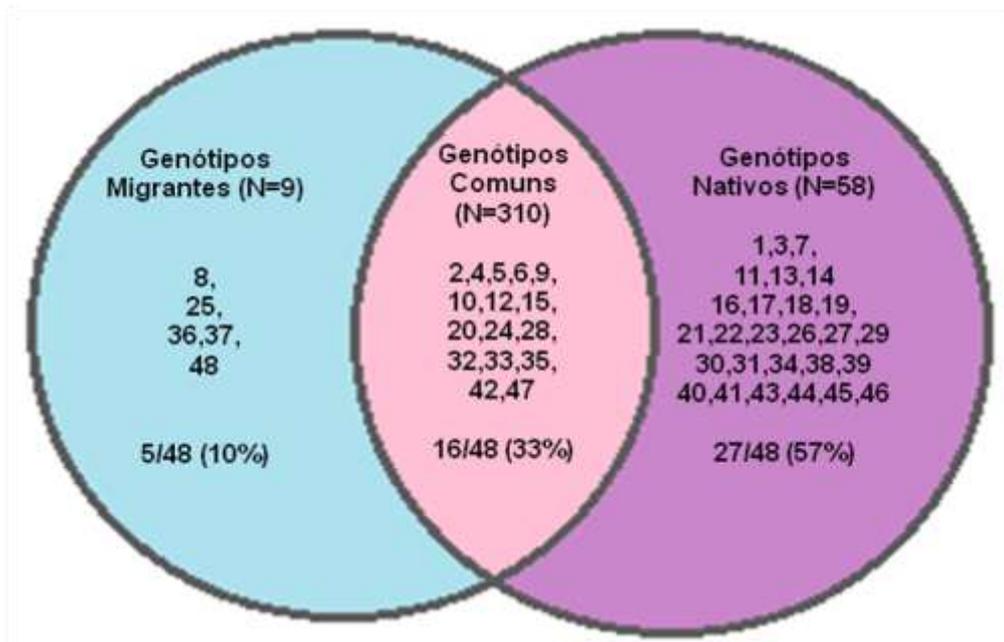
O número total de genes *KIR* presentes nos genótipos encontrados na população variou de 8 a 16 genes. Em relação ao número de genes inibidores e ativadores presentes nos genótipos houve uma variação de 4-7 genes inibidores e 1-6 ativadores. Observamos uma maior frequência na população do genótipo 42 (30,8%), seguido do 33 (15,2%), 20 (7,4%), 4 (6,1%) e 12 (5,6%) ($P \leq 0,0018$, para todos) (Tabela 5.5). A proporção de genes inibidores e ativadores apresentadas nesses genótipos foram de 5/1, 6/4, 6/2, 7/6 e 7/3, respectivamente.

Tabela 5.5: Distribuição da frequência dos genótipos *KIR* observados na população de área endêmica de malária.

Genótipo	KIR INIBIDORES					KIR ATIVADORES					N°	N°	Razão	PSEUDOGENES		TOTAL		ID "BAF"		
	2DL		3DL			2DS			3DS	INIB.				ATIV.	INIB/ATIV	2DP	3DP		N	%
	1	2	3	4	5	1	2	3	4							5	1			
1											7	6	1,17			9	2,39	6		
2											7	5	1,4			10	2,65	7		
3											7	4	1,75			1	0,27	11		
4 ^a											7	5	1,4			23	6,10	3		
5											7	4	1,75			5	1,33	9		
6											7	4	1,75			2	0,53	80		
7											7	5	1,4			2	0,53	58		
8											7	4	1,75			1	0,27	93		
9											7	4	1,75			4	1,06	18		
10											7	3	2,33			2	0,53	46		
11											7	4	1,75			1	0,27	13		
12 ^a											7	3	2,33			21	5,57	5		
13											7	4	1,75			1	0,27	24		
14											7	3	2,33			1	0,27	21		
15											7	2	3,5			11	2,92	20		
16											6	6	1			1	0,27	87		
17											6	5	1,2			3	0,80	70		
18											6	5	1,2			1	0,27	86		
19											6	4	1,5			4	1,06	68		
20 ^a											6	2	3			28	7,43	4		
21											6	1	6			5	1,33	19		
22											6	4	1,5			1	0,27	113		
23											6	6	1			3	0,80	73		
24											6	5	1,2			3	0,80	91		
25											6	5	1,2			1	0,27	325		
26											6	4	1,5			1	0,27	112		
27											6	4	1,5			2	0,53	94		
28											6	3	2			9	2,39	71		
29											5	5	1			1	0,27	81		
30											5	4	1,25			1	0,27	144		
31											6	4	1,5			1	0,27	56		
32											6	4	1,5			6	1,59	8		
33 ^a											6	4	1,5			58	15,38	2		
34											6	3	2			2	0,53	27		
35											6	2	3			6	1,59	30		
36											6	3	2			2	0,53	17		
37											6	2	3			4	1,06	32		
38											5	4	1,25			1	0,27	75		
39											5	3	1,67			3	0,80	69		
40											5	3	1,67			1	0,27	88		
41											5	2	2,5			1	0,27	10		
42 ^a											5	1	5			116	30,77	1		
43											5	2	2,5			1	0,27	293		
44											5	5	1			2	0,53	78		
45											5	5	1			1	0,27	76		
46											5	4	1,25			7	1,86	106		
47											4	4	1			6	1,59	320		
48											4	2	2			1	0,27	72		
N	358	175	336	377	221	354	377	375	163	156	85	353	162	153			360	376	377	100
%	95	46,4	89	100	59	94	100	99	43,2	41	23	94	43	40,6			95,49	99,73		

np: número de indivíduos positivos; N° INIB: quantidade de *KIR* inibidores presentes; N° ATIV: quantidade de *KIR* ativadores presentes; IC: Intervalo de confiança; As caixas preenchidas indicam presença do gene; as caixas rachuradas representam os genes de moldura e as caixas em branco indicam ausência do gene; ^a: genótipos 42, 33, 20, 12, 4 *versus* todos os outros ($P \leq 0,0018$).

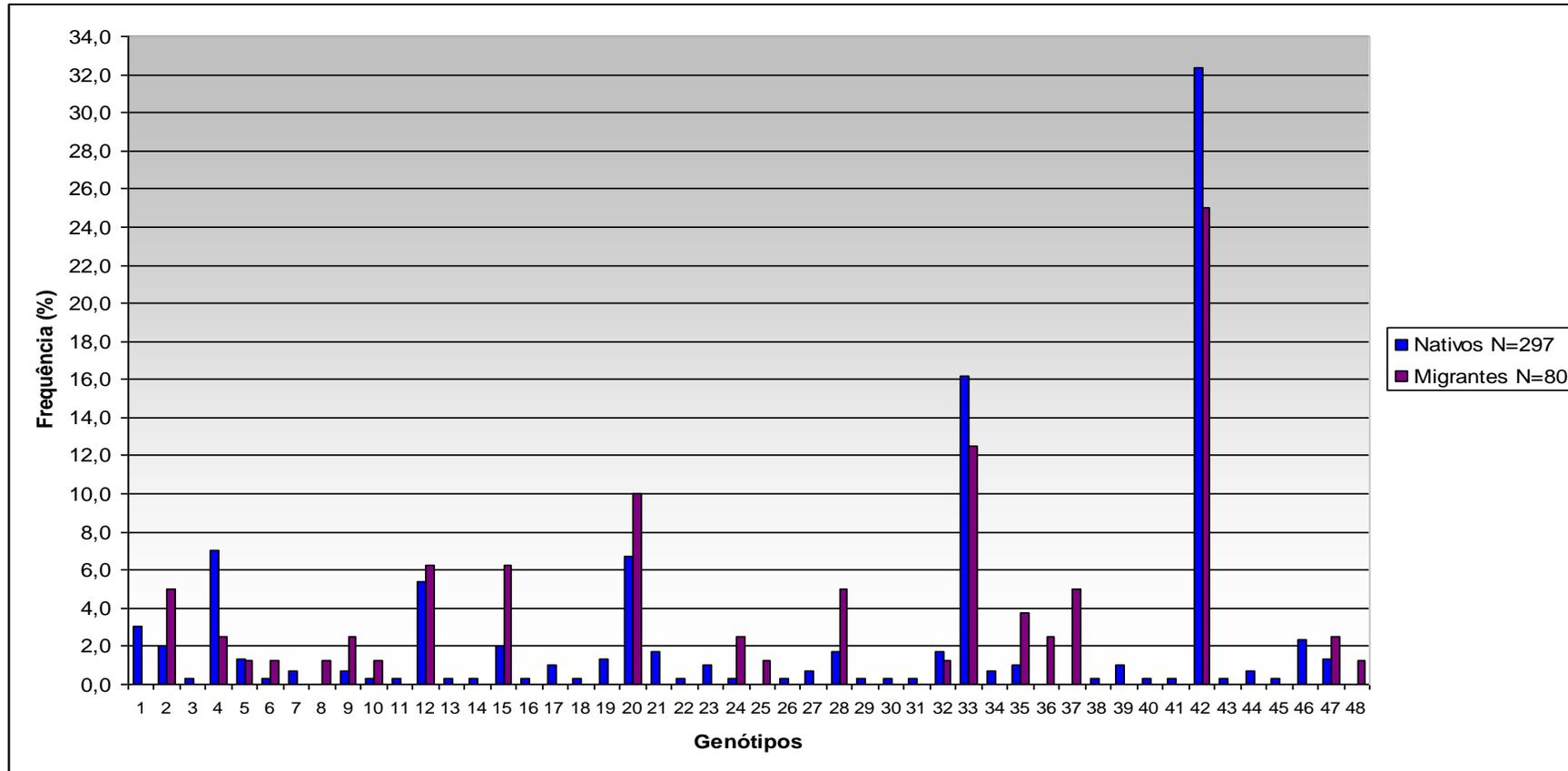
Para verificarmos possíveis particularidades na distribuição genotípica da população estudada em relação à procedência dos indivíduos, comparamos os genótipos dos indivíduos oriundos de área endêmica (grupo de nativos) e indivíduos de área não endêmica (grupo de migrantes). Observamos que dentre os 48 genótipos encontrados na população, 27 (57%) estavam presentes apenas no grupo de nativos, 5 (10%) apenas em indivíduos oriundos de área não endêmica (migrantes) e 16 (33%) foram encontrados tanto no grupo dos nativos quanto nos migrantes ($P < 0,001$, para todos) (Figura 5.1). Dentre os 27 genótipos exclusivos do grupo dos nativos, 19 (70%) apresentavam frequência menor que 2% (Figura 5.2).



N= indivíduos positivos; números de genótipo apresentados / total de genótipos encontrados (porcentagem).

Figura 5.1: Distribuição dos genótipos na população estudada.

Figura 5.1: Distribuição das frequências dos genótipos nos indivíduos nativos e migrantes.



Um fato curioso observado quando analisamos os dados epidemiológicos dos indivíduos do grupo dos nativos que apresentam genótipos exclusivos e dos indivíduos com genótipos não exclusivos, foi que os indivíduos que apresentam genótipos exclusivos tinham menos malárias anteriores (4 ± 4) quando comparados aos que apresentam genótipos não exclusivos (13 ± 13) ($P < 0,0001$) e podemos observar também que os portadores de genótipos exclusivos apresentavam um maior tempo desde a última malária (59 ± 23), quando comparados aos portadores dos genótipos não exclusivos (36 ± 33) ($P = 0,02$).

Quando analisamos as frequências dos genótipos comuns a ambos os grupos, a fim de verificarmos possíveis diferenças na distribuição genotípicas entre os grupos, observamos uma maior frequência do genótipo 33 no grupo dos nativos quando comparado aos dos migrantes ($P < 0,01$) (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Distribuição dos genótipos comuns entre os grupos de nativos e migrantes.

Genótipos	Indivíduos		Valores de <i>P</i>
	Nativos (N=297) np	Migrantes (N=80) np	
2	6	4	0,6
4	22	2	0,91
5	4	1	0,8
6	1	1	0,5
9	2	2	0,5
10	1	1	0,5
12	15	6	0,75
15	6	4	0,6
20	20	8	0,71
24	1	2	0,33
28	5	4	0,55
32	5	1	0,83
33	48	10	<0,01
35	3	3	0,5
42	96	20	0,82
47	4	2	0,66
Outros*	59	9	0,86

N: número de indivíduos do estudo; np: número de indivíduos positivos; *: incluem todos os genótipos cuja frequência é igual a zero em quaisquer dos grupos (1, 3, 7, 8, 11, 13, 14, 16-19, 21-23, 25-27, 29-31, 34, 36-41, 43-46 e 48).

Dentre os 377 indivíduos que participaram do nosso estudo alguns relataram infecções prévias por apenas uma espécie plasmodial: 32 (8,5%) somente por *P. falciparum*, 83 (22%) somente por *P. vivax*. Ao verificarmos possíveis particularidades na distribuição genotípica desses indivíduos, observamos que não houve diferença na frequência genotípica entre os indivíduos que relataram infecções prévias somente por *P. falciparum* ou *P. vivax* e dos que relataram ambas. Entretanto, os genótipos 7, 9 e 38 foram encontrados somente no grupo dos indivíduos que relataram infecção por *P. falciparum*, os genótipos 22, 25 e 48 estavam presentes apenas no grupo dos indivíduos que relataram malária por *P. vivax* enquanto os genótipos 3, 8, 13, 15, 31, 35, 41, 44, e 47 foram encontrados no grupo dos indivíduos que relataram malária pelas duas espécies. Como observados anteriormente na população os genótipos 33 e 42 foram os mais frequentes nos três grupos ($P \leq 0,004$ e $P \leq 0,0003$, respectivamente, para todos) (Tabela 5.7).

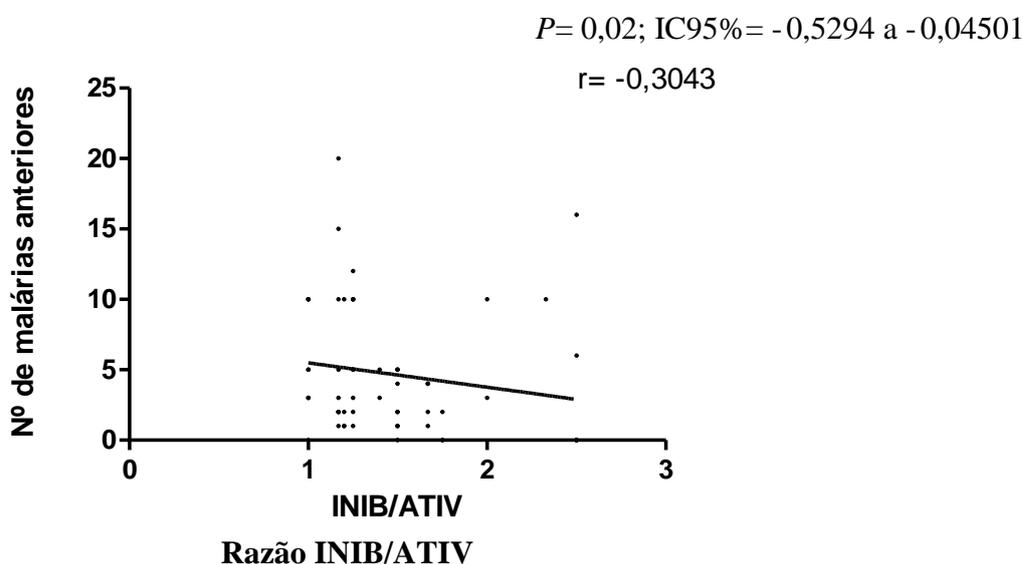
Tabela 5.7: Distribuição dos genótipos na população estudada em função de infecções prévias de malária

Genótipos	Infecções anteriores			KIR Inibidores Nº	KIR Ativadores Nº	Razão INIB/ATIV
	<i>P. falciparum</i> np/%	<i>P. vivax</i> np/%	<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> np/%			
1	0	4/5	1/0,5	8	6	1,33
2	0	1/1	4/2	8	5	1,6
3	0	0	2/1	8	4	2
4	4/12,5	2/2,4	12/6,4	8	5	1,6
5	1/3	1/1	1/0,5	8	4	2
7	1/3	0	0	8	5	1,6
8	0	0	1/0,5	8	4	2
9	1/3	0	0	8	4	2
10	2/6,25	0	2/1	8	3	2,67
12	2/6,25	3/3,7	13/7	8	3	2,67
13	0	0	1/0,5	8	4	2
14	0	6/7,2	5/2,7	8	3	2,67
15	0	0	1/0,5	8	2	4
16	0	2/2,4	3/1,6	7	6	1,17
17	0	1/1	1/0,5	7	5	1,4
18	2/6,25	0	4/2	7	5	1,4
19	1/3	7/8,4	21/11	7	4	1,75
20	1/3	1/1	0	7	2	3,5
22	0	1/1	0	7	4	1,75
23	1/3	1/1	0	7	6	1,17
25	0	1/1	0	7	5	1,4
26	0	2/2,4	1/0,5	7	4	1,75
27	1/3	1/1	5/2,7	7	4	1,75
31	0	0	1/0,5	7	4	1,75
32	0	3/3,7	2/1	7	4	1,75
33	6/19	10/12	29/15,5	7	4	1,75
35	0	0	4/2	7	2	3,5
37	0	1/1	2/1	7	2	3,5
38	1/3	0	0	6	4	1,5
39	0	1/1	1/0,5	6	3	2
40	0	1/1	1/0,5	6	3	2
41	0	0	1/0,5	6	2	3
42	10/31	27/32,5	54/29	6	1	6
44	0	0	1/0,5	6	5	1,2
45	1/3	1/1	1/0,5	6	5	1,2
46	0	3/3,7	2/1	6	4	1,5
47	0	0	1/0,5	5	4	1,25
48	0	1/1	0	5	2	2,5
N	32	83	187			

np: número de indivíduos positivos; N: número de indivíduos estudados; Razão INIB/ATIV: número de genes inibidores /nº de genes ativadores presentes no genótipo.

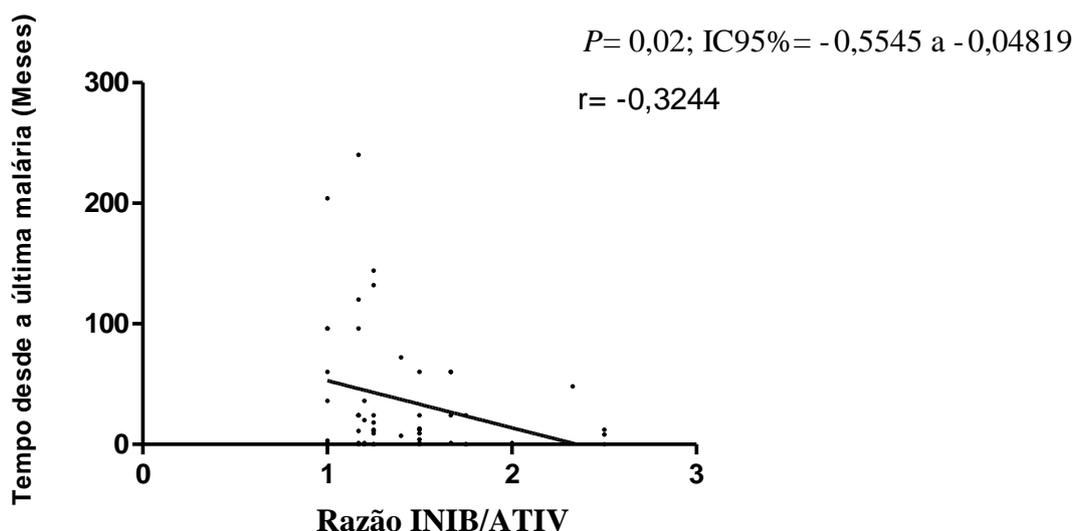
5.1.6 Correlação entre a proporção de genes inibidores e ativadores (razão INIB/ATIV) dos genótipos exclusivos do grupo nativo com os dados epidemiológicos

Com o objetivo de avaliar se a proporção de genes inibidores e ativadores presentes nos genótipos encontrados na população poderia estar atuando como um fator de susceptibilidade a malária, primeiramente definimos essa proporção através da razão de número de genes inibidores sobre ativadores (INIB/ATIV) da população e correlacionamos esta razão INIB/ATIV com as variáveis indicadoras de exposição/susceptibilidade/proteção à malária (idade, tempo de residência em área endêmica, número de malárias anteriores e tempo desde a última infecção). Não encontramos nenhuma correlação entre a razão INIB/ATIV da população e suas variáveis indicadoras de exposição/susceptibilidade/proteção ($P > 0,05$, para todos). Curiosamente quando analisamos a razão INIB/ATIV dos genótipos presentes apenas no grupo dos nativos e os dados epidemiológicos destes indivíduos, observamos correlação negativa entre a razão INIB/ATIV e o número de malárias anteriores ($r = -0,3043$; $P = 0,02$) e tempo desde a última malária ($r = -0,3244$; $P = 0,02$). Não encontramos correlações quando confrontamos a razão INIB/ATIV do grupo dos nativos com idade e tempo de residência em área endêmica, ($P > 0,05$, para todos). Esses dados sugerem que quanto mais genes inibidores os indivíduos apresentam em seu genótipo, menos malárias eles tem e menor é o tempo da última infecção (Figuras 5.3 e 5.4).



Razão INIB/ATIV: número de genes inibidores presentes no genótipo/número de genes ativadores.

Figura 5.3: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos exclusivos do grupo dos nativos e número de malárias anteriores.



Razão INIB/ATIV: número de genes inibidores presentes no genótipo/número de genes ativadores.

Figura 5.4: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos exclusivos do grupo dos nativos e tempo desde a última malária (meses).

5.2 Grupo de indivíduos infectados

5.2.1 Perfil do grupo dos indivíduos com malária

Como demonstrado na Tabela 5.7, dos 93 indivíduos com malária, 64 (69%) estavam infectados com *P. vivax*, 28 (30%) com *P. falciparum* e 1 (1%) com ambas as espécies. A maioria dos indivíduos com malária era do sexo masculino (68%) ($P < 0,0001$) e a média de idade dos indivíduos era de 30 anos. Segundo os relatos dos indivíduos, eles residiam em área endêmica de malária em média há 26 anos, não diferindo estatisticamente da média de residência dos indivíduos sem malária. Quanto à história progressiva de malária, foi relatada uma média de 5 episódios, diferindo estatisticamente da média relatada pelos indivíduos sem malária (10 episódios) ($P = 0,035$).

Como previamente descrito no Material e métodos, foram realizadas coletas de sangue nos indivíduos com malária em dois momentos distintos. A primeira coleta foi no dia do diagnóstico e antes do início do tratamento (D0) e outra 15 dias após o diagnóstico (D15), quando os indivíduos já haviam terminado o tratamento. A média de parasitemia dos indivíduos em D0 foi de 2124,2 parasitas/ μ L de sangue e todos os indivíduos apresentavam pelo menos um dos sintomas da tríade malárica: febre (78%), cefaléia (93%) e calafrio (69%). Em D15 nenhum dos indivíduos apresentava parasitas circulantes e sintomatologia (Tabela 5.7).

Ao avaliarmos os níveis plasmáticos de *IFN-γ* dos indivíduos do grupo com malária observamos que esses estavam mais elevados em D15 (N=56; 260 ± 358) quando comparados com D0 (N=71; 142 ± 159) ($P=0,0003$) (Figura 5.5 e Tabela 5.7). Considerando os níveis plasmáticos de *IFN-γ* acima de 55 pg/mL (*cut-off* = $\bar{x} + 2DP$ dos controles) como positivos, observamos que não há diferença na frequência de indivíduos positivos entre D0 55% (N=40) e D15 70% (N=50) ($P>0,05$) e nem nos níveis plasmáticos entre os indivíduos positivos de D0 ($\bar{x} = 229,3$; DP=168,1) e D15 ($\bar{x} = 286,6$; DP=370,6) ($P>0,05$). Não observamos correlação entre níveis plasmáticos de *IFN-γ* e de parasitemia dos indivíduos com malária ($r= 0,2609$; $P>0,05$).

Tabela 5.8: Resumo do perfil clínico, epidemiológico e parasitológico dos indivíduos com malária.

Gênero		
	Feminino (N/%)	30/32
	Masculino (N/%)	63/68
	Total	93
Idade ($\bar{x} \pm DP$)		30 \pm 11
Espécie plasmodial infectante		
	<i>P. vivax</i> (N/%)	64/69
	<i>P. falciparum</i> (N/%)	28/30
	<i>P. vivax/P. falciparum</i> (N/%)	1/1
Início da sintomatologia ($\bar{x} \pm DP$)		3 \pm 2
História progressa de malária		
		5 \pm 4
($\bar{x} + DP$)		
Anos de residência em área endêmica de malária ($\bar{x} \pm DP$)		26 \pm 12
Parasitemia (Parasitas/μL de sangue)		2124,2
Média geométrica (IC 95%)		(1.572 - 2.893)
<i>IFN-γ</i> pg/mL		
	D0 ($\bar{x} \pm DP$)	142 \pm 159
	D15 ($\bar{x} \pm DP$)	260 \pm 358
Sintomas		
	Febre (N/%)	73/78
	Cefaléia (N/%)	87/93
	Calafrio (N/%)	64/69

\bar{x} : média; DP: desvio padrão; N: número de indivíduos e IC: Intervalo de confiança.

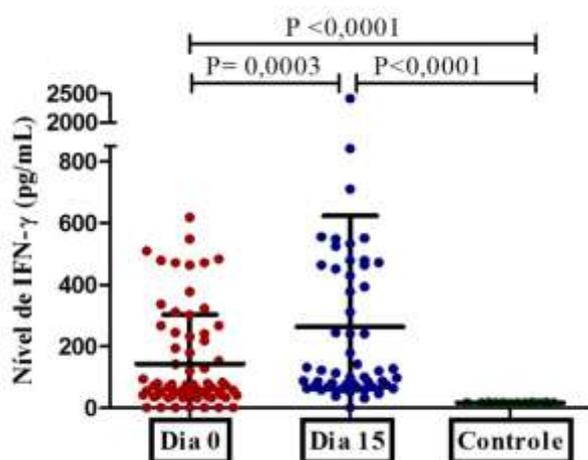


Figura 5.5: Níveis plasmáticos de *IFN- γ* em indivíduos com malária.

5.2.2 Distribuição gênica dos receptores *KIR*, dos ligantes *HLA* (-A; -B e -C) e dos pares *KIR-HLA* (-A; -B e -C) em função da infecção malárica

Ao analisarmos a distribuição das frequências dos genes *KIR*, *HLA* (-A; -B e -C) e dos pares *KIR-HLA* em função da infecção malárica não observamos nenhuma associação entre a distribuição das frequências desses genes com a presença ou ausência de infecções ($P > 0,05$, para todos) (Tabelas 5.8, 5.9 e 5.10).

Tabela 5.9: Distribuição das frequências dos genes *KIR* em função da infecção malárica.

Receptores <i>KIR</i>	Indivíduos		Valores de <i>P</i>
	Com malária (N=93)	Sem malária (N=284)	
	%	%	
Inibidores			
<i>KIR2DL1</i>	100	63,7	0,26
<i>KIR2DL2</i>	41,9	79,2	0,22
<i>KIR2DL3</i>	94,6	68,3	0,26
<i>KIR2DL5</i>	51,6	30,6	0,22
<i>KIR3DL1</i>	100	35,2	0,24
Ativadores			
<i>KIR2DS1</i>	21,5	50,3	0,21
<i>KIR2DS2</i>	93,5	24,3	0,24
<i>KIR2DS3</i>	36,6	17,9	0,23
<i>KIR2DS4</i>	93,5	93,7	0,25
<i>KIR2DS5</i>	100	24,3	0,21
<i>KIR3DS1</i>	100	21,1	0,25
Estruturais			
<i>KIR2DL4</i> * [†]	100	22,5	0,25
<i>KIR3DL2</i> *	36,6	31,3	0,25
<i>KIR3DL3</i> *	39,8	29,6	0,25
<i>KIR3DP1</i> ♦	100	100	0,25
Pseudogene			
<i>KIR2DP1</i>	100	94	0,26

N: número de indivíduos estudados; *: genes estruturais e inibidores; [†]: gene estrutural, ativador e inibidor; ♦: gene estrutural e pseudogene.

Tabela 5.10: Distribuição das frequências dos ligantes de *KIR*: *HLA* (-A; -B e -C) em função da infecção malárica.

Receptores <i>HLA</i>	Indivíduos		Valores de <i>P</i>
	Com malária (N=93)	Sem malária (N=284)	
	%	%	
<i>HLA-C1</i>	81,7	78,9	0,25
<i>HLA-C2</i>	66,7	66,9	0,25
<i>HLA-Bw4</i>	66,7	72,2	0,23
<i>HLA-A3_A11</i>	25,8	22,5	0,27
<i>HLA-Cw4</i>	27,9	32,6	0,23

N= número de indivíduos estudados

Tabela 5.11: Distribuição das frequências dos pares *KIR-HLA* (-A; -B e -C) em função da infecção malárica.

<i>KIR-HLA</i>	Indivíduos		Valores de <i>P</i>
	Com malária (N=93)	Sem malária (N=284)	
	%	%	
<i>KIR</i> ativadores			
<i>KIR2DL1_C2</i>	66,7	63,7	0,25
<i>KIR2DL2/3_C1*</i>	80,6	79,2	0,25
<i>KIR3DL1_Bw4</i>	60,2	68,3	0,25
<i>KIR3DL2_A3A11</i>	25,8	22,5	0,27
<i>KIR</i> inibidores			
<i>KIR2DS1_C2</i>	26,8	30,6	0,22
<i>KIR2DS2_C1</i>	26,8	35,2	0,2
<i>KIR3DS1_Bw4</i>	26,8	31,3	0,22
<i>KIR2DS4_Cw4</i>	22,6	29,6	0,2

N: número de indivíduos estudados; *: soma das frequências de *KIR2DL2_C1* e *KIR2DL3_C1*.

5.2.3 Distribuição dos genótipos *KIR* em função da infecção malárica

Dentre os 93 indivíduos infectados observamos uma maior frequência do genótipo 42 ($P=0,001$), enquanto que no grupo dos indivíduos sem malária o genótipo 33 foi o mais frequente ($P=0,025$) (Tabela 5.12).

Tabela 5.12: Distribuição das frequências dos genótipos *KIR* em função da infecção malárica.

Genótipo	Indivíduos		Valores de <i>P</i>
	Com malária (N=93) np / %	Sem malária (N=284) np / %	
1	1 / 1,1	7 / 2,5	0,12
2	2 / 2,2	8 / 2,8	0,2
4	9 / 9,7	17 / 6,0	0,34
7	1 / 1,1	1 / 0,4	0,5
9	1 / 1,1	3 / 1,1	0,25
12	5 / 5,4	15 / 5,3	0,25
13	1 / 1,1	1 / 0,4	0,5
15	1 / 1,1	6 / 2,1	0,14
17	1 / 1,1	3 / 1,1	0,25
19	3 / 3,2	1 / 0,4	0,75
20	8 / 8,6	24 / 8,5	0,25
27	1 / 1,1	2 / 0,7	0,33
28	1 / 1,1	8 / 2,8	0,11
32	2 / 2,2	4 / 1,4	0,33
33	11 / 11,8	49 / 17,3	0,025
34	1 / 1,1	1 / 0,4	0,5
35	1 / 1,1	2 / 0,7	0,33
37	1 / 1,1	3 / 1,1	25
42	37 / 39,8	79 / 27,8	0,001
Outros	5 / 5,4	50 / 17,6	0,09

np: número de indivíduos positivos para o respectivo genótipo; *: Incluem todos os genótipos cuja frequência é igual a zero em quaisquer dos grupos (3, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 16, 18, 21, 22, 24- 26, 29- 31, 36, 38- 40, 43- 48).

Quando analisamos os dados epidemiológicos dos indivíduos que apresentam os genótipos 33 e 42 observamos que nos indivíduos portadores do genótipo 42 há: a) predomínio de infecção por *P. vivax* (11Pf/26Pv, genótipo 42 versus 4Pf/7Pv, genótipo 33; $P < 0,0001$); b) níveis plasmáticos de *IFN-γ* mais elevados em D0; c) tendência de níveis de parasitemia mais elevados ($P > 0,05$) e d) maior tempo de residência em área endêmica de malária ($P = 0,02$) (Tabela 5.12).

Tabela 5.13: Perfil epidemiológico e parasitológico dos indivíduos do grupo com malária portadores dos genótipos 33 e 42.

	Genótipos		Valores de <i>P</i>
	33 (np=11)	42 (np=37)	
INIB	6	5	0,62
ATIV	4	2	0,63
Razão INIB/ATIV	1,5	2,5	
Parasitemia parasitas/ μL de sangues ($\bar{x} \pm DP$)	2374 ± 3238	3838 ± 4311	0,196
<i>IFN-γ</i> pg/mL			
D0	142,3 ± 159	229 ± 168	0,001 [□]
D15	260 ± 359	287 ± 370	0,339
Espécie Plasmodial			
<i>P. falciparum</i> (n/%)	(4/37)	(11/30)	0,01 [‡] 0,009 [*]
<i>P. vivax</i> (n/%)	(7/63)	(26/70)	0,0001 [♦]
Idade ($\bar{x} \pm DP$)	30 ± 10	29 ± 11	0,96
Tempo de residência em área endêmica (anos) ($\bar{x} \pm DP$)	21 ± 11	28 ± 9,5	0,02 [*]
Número de malárias anteriores ($\bar{x} \pm DP$)	4 ± 4	7 ± 8	0,21
Tempo desde a última malária (meses) ($\bar{x} \pm DP$)	14 ± 21	42 ± 81	0,31

INIB: número de genes inibidores presentes; ATIV: número de genes ativadores presentes; Razão INIB/ATIV: nº de genes inibidores / nº de genes ativadores; np= número de indivíduos positivos; \bar{x} : média; DP: desvio padrão; *: Tempo de residência em área endêmica genótipo 33 versus 42; ‡: frequência de *P. falciparum* do genótipo 33 versus 42; ♦: frequência de *P. vivax* do genótipo 33 versus 42; □: frequência de *P. vivax* versus *P. falciparum* no genótipo 42; □: níveis plasmáticos de *IFN-γ* em D0 de indivíduos com genótipo 33 versus genótipo 42.

5.2.4 Relação entre os genótipos KIR, níveis plasmáticos de IFN- γ , níveis de parasitemia e dados epidemiológicos

Ao avaliarmos a correlação entre a proporção de genes inibidores e ativadores encontrados nos indivíduos com malária (razão INIB/ATIV) e os dados parasitológicos, epidemiológicos e os níveis plasmáticos de IFN- γ desses indivíduos, não observamos nenhuma correlação entre a razão INIB/ATIV e as variáveis indicadoras de exposição/susceptibilidade/proteção à doença (idade, tempo de residência em área endêmica, número de malárias anteriores e tempo desde a última malária) ($P > 0,05$, para todos) (Tabela 5.13). Entretanto uma correlação positiva foi observada com os níveis de parasitemia (D0; $P = 0,001$; $r = 0,3262$; IC95% = 0,1252 - 0,5015) e os níveis plasmáticos de IFN- γ (D15; $P = 0,013$; $r = 0,3328$; IC95% = 0,066 - 0,555) (Figura 5.6 e 5.7).

Tabela 5.14: Níveis de parasitemia e níveis plasmáticos de *IFN-γ* em função do genótipo dos indivíduos com malária.

Parâmetros	Genótipos																	
	2	4	7	9	12	13	17	19	20	23	26	27	28	30	32	33	41	42
	(np=2)	(np=9)	(np=1)	(np=1)	(np=5)	(np=1)	(np=1)	(np=3)	(np=7)	(np=1)	(np=1)	(np=1)	(np=1)	(np=1)	(np=2)	(np=11)	(np=1)	(np=37)
INIB	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	5	5
ATIV	5	5	5	5	3	5	5	4	2	5	4	4	3	4	4	4	2	2
Razão INIB/ATIV	1,4	1,4	1,4	1,4	2,33	1,4	1,2	1,5	3	1,2	1,5	1,5	2	1,25	1,5	1,5	2,5	2,5
Parasitemia parasita/ μ L de sangue ($\bar{X} \pm DP$)	3269±4594	2127±2897	1758	3338	4316±5060	199	2120	2322±1835	4689±6384	11546	3013	736	1540	1108	8572±7171	2374 ±3238	944	3838 ± 4311
Espécie																		
<i>P. falciparum</i> (n%)		4 / 44	1 / 100	1 / 100	5 / 100	1 / 100	1 / 100	3 / 100	1 / 12	1 / 100	1 / 100	1 / 100	1 / 100	1 / 100		4 / 37	1 / 100	11 / 30
<i>P. vivax</i> (n%)	2 / 100	5/56							7 / 88						2 / 100	7 / 63		26 / 70
Idade (M± DP)	37±24	25±8	54	35	32±9	16±0	22	21±7	39±12	26	38	29	38	27	34±15	30 ± 10	16	29 ± 11
Tempo de residência em área endêmica (anos) ($\bar{X} \pm DP$)	7±9	32±14	44	22	27±12	2±0	22	21±17	25±11	16	37	29	23	23	22±1	21 ± 11	16	28 ± 9,5
Número de malárias anteriores ($\bar{X} \pm DP$)	3 / 0	5±3	5	1	1±1	0	2	3±4	7±6	10	4	4	1	120	8±3	19 ± 12	6	7 ± 8
Tempo desde a última malária (meses) ($\bar{X} \pm DP$)	10/14	6±8	7	198	19±20	0	1	3±5	47±112	1	1	60	5	18	7±6	14 ± 21	8	42 ± 81
	np=1	np=7	np=1	np=1	np=4	np=1	np=1	np=3	np=5	np=1	np=1	np=1	np=1	np=1	np=2	np=7	np=1	np=32
<i>IFN-γ</i> D0 μ g/ mL ($\bar{X} \pm DP$)	34	142±130	143	483	55±15	231,87	44,19	182±88	189±217	302,54	51	95	47,06	2	56,9± 21,8	57±22	34,38	202±160
<i>IFN-γ</i> D15 μ g/ mL ($\bar{X} \pm DP$)	85	213±180	429		84±63	52,67		286±179	572±1032			32	100,31		68,8±13,9	69±14		241±230

np: número de indivíduos positivos; INIB: número de genes inibidores presentes; ATIV: número de genes ativadores presentes; INIB/ATIV: n° de genes inibidores / n° de genes ativadores; \bar{X} : média; DP: desvio padrão

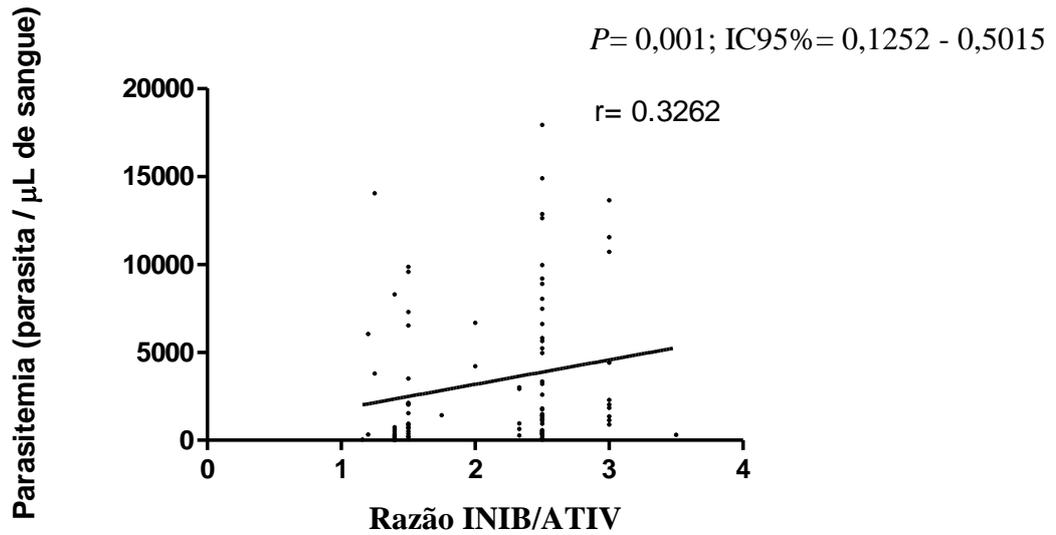


Figura 5.6: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos em relação à parasitemia.

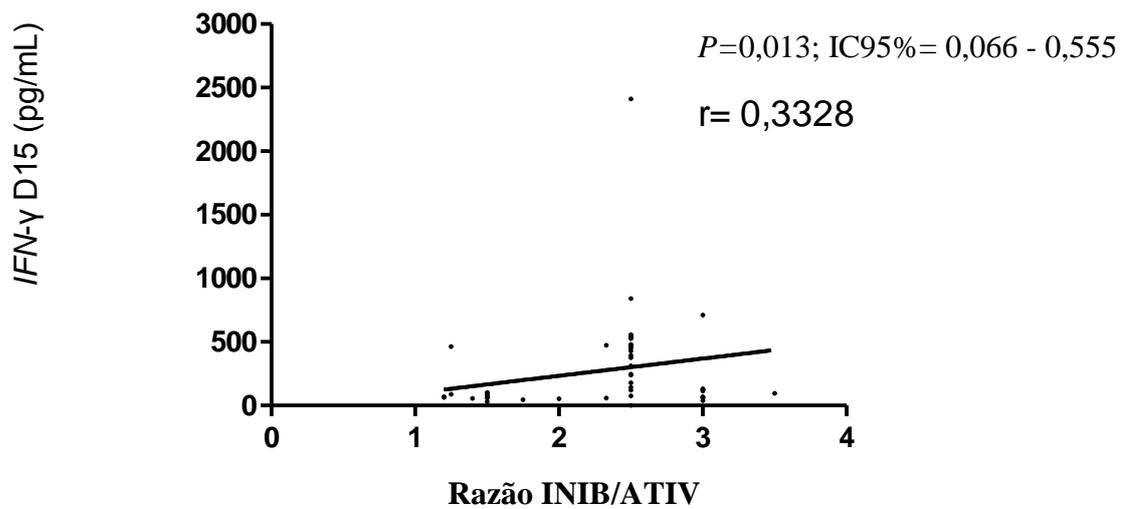


Figura 5.7: Correlação entre a razão INIB/ATIV dos genótipos em relação aos níveis plasmáticos de *IFN- γ* D15.

Ao avaliarmos os níveis plasmáticos de *IFN- γ* , níveis de parasitemia e os dados epidemiológicos em função da razão INIB/ATIV dos indivíduos do grupo com malária, observamos que as parasitemias dos indivíduos que apresentavam a razão INIB/ATIV acima da mediana ($\geq 2,5$ - valor que corresponde ao percentil 75 da razão INIB/ATIV) eram maiores quando comparadas com as dos indivíduos que tinham razão INIB/ATIV abaixo deste valor ($P=0,009$). O mesmo foi observado com *IFN- γ* em D15 e com o número de malárias anteriores, onde os indivíduos com a razão INIB/ATIV acima da mediana apresentavam maiores níveis de *IFN- γ* e um maior número de malárias anteriores, quando comparadas com os dos indivíduos que tinham razão INIB/ATIV abaixo desse valor ($P=0,003$ e $P=0,021$, respectivamente) (Tabela 5.14). Estes dados sugerem que quanto mais genes inibidores presentes no genótipo menor o controle no desenvolvimento da doença, e maior a susceptibilidade a infecção malárica.

Tabela 5.15: Parasitemia, níveis plasmáticos de *IFN-γ* e dados epidemiológicos em função da razão INIB/ATIV dos genótipos dos indivíduos com malária.

	Razão INIB/ATIV		Valores de <i>P</i>
	≥ 2,5 ^f (N=47)	< 2,5 ^f (N=45)	
Espécie			
<i>P. falciparum</i> (n/%)	14 / 30	14 / 31	0,8831
<i>P. vivax</i> (n/%)	33 / 70	31 / 69	0,8903
Idade (\bar{x} DP)	31±12	29±11	0,3834
Tempo de residência em área endêmica (anos) (\pm DP) \bar{x}	26±11	26±13	0,5655
Número de malárias anteriores (\pm DP) \bar{x}	7±7	4±5	0,0213
Tempo desde a última malária (meses) (\pm DP) \bar{x}	39±82	19±37	0,0085*
<i>IFN-γ</i> D0 pg/ mL (\pm DP)	211 ± 183	104 ± 131	0,0511
<i>IFN-γ</i> D15 pg/ mL (\pm DP)	460 ± 206	228 ± 377	0,0031 ^e
Parasitemia parasita/ μL de sangue (\pm DP) \bar{x}	4271 ± 4736	2327 ± 3279	0,0094 ^β

N: número de indivíduos estudados; \bar{x} : média; DP: desvio padrão; ^f: 2,5 - valor corresponde ao percentil 75 da razão INIB/ATIV; *:tempo desde a última malária $\geq 2,5$ versus tempo desde a última malária (< 2,5), $P < 0,05$; ^e: *IFN-γ* D15 ($\geq 2,5$) versus *IFN-γ* D15 (< 2,5), $P < 0,005$ e ^β: parasitemia ($\geq 2,5$) versus parasitemia (< 2,5).

5.2.5 Perfil epidemiológico, níveis plasmáticos de *IFN-γ* e parasitemia dos indivíduos de acordo com a espécie plasmodial infectante

Ao avaliarmos os indivíduos por espécie plasmodial infectante (Tabela 5.15), observa-se que dos 93 indivíduos com malária, 64 (69%) estavam infectados com *P. vivax*, 28 (30%) com *P. falciparum* e 1 (1%) com ambas as espécies. Não observamos diferenças estatisticamente significantes em relação às variáveis indicadoras de exposição/susceptibilidade/proteção (idade, tempo de residência em área endêmica, número de malárias anteriores e tempo desde a última malária), os níveis plasmáticos de *IFN-γ* e parasitemia ($P > 0,05$, para todos).

Tabela 5.16: Perfil epidemiológico dos indivíduos de acordo com a espécie plasmodial infectante.

	Grupos		Valores de <i>P</i>
	<i>Pv</i> (N=64)	<i>Pf</i> (N=28)	
<i>IFN-γ</i> pg/mL			
D0	128±152	174±173	0,3747
D15	242±403	321±208	0,277
Parasitemia (parasitas/μL de sangue)	1174,57	1017,11	0,6723
Média geométrica (IC 95%)	(1041-2381)	(916-2611)	
Tempo de Residência em área endêmica (anos) ($\bar{x} \pm DP$)	25 ± 11,6	27 ± 12,5	0,7372
Idade ($\bar{x} \pm DP$)	26,6 ± 11,4	30,2 ± 11,7	0,7309
Número de infecções maláricas anteriores ($\bar{x} \pm DP$)	6,23 ± 6,85	4,86 ± 4,20	0,6591
Tempo desde a última malária (meses) ($\bar{x} \pm DP$)	19,67± 48,1	53 ± 92	0,0698

IC95%: Intervalo de confiança; *Pv*: indivíduos infectados com *P. vivax*; *Pf*: indivíduos infectados com *P. falciparum*; \bar{x} : média; DP: desvio padrão

5.2.5.1 Correlação entre razão INIB/ATIV dos genótipos dos indivíduos dos grupos Pv e Pf com os dados epidemiológicos, níveis plasmáticos de IFN- γ e parasitemia

Ao avaliarmos a relação entre a proporção de genes inibidores e ativadores (razão INIB/ATIV) encontrados nos indivíduos dos grupos *Pv* e *Pf* e os dados parasitológicos, epidemiológicos e os níveis plasmáticos de *IFN- γ* , nenhuma correlação foi observada ($P > 0,05$, para todos).

5.2.7 Distribuição das frequências dos genes KIR em função dos seus ligantes nos indivíduos com malária

Ao avaliarmos a associação entre a presença dos pares *KIR-HLA* (-A;-B e -C) e os níveis plasmáticos de *IFN- γ* e parasitemia, nenhuma associação foi encontrada entre a presença desses pares e os níveis plasmáticos de *IFN- γ* ($P > 0,05$). Em relação à parasitemia, observamos que ela apresentava-se aumentada apenas nos indivíduos portadores dos genes *KIR2DS2* e *HLA-C1* (*KIR2DS2 _C1*) (3954 ± 4620) quando comparados com os indivíduos portadores do gene *KIR2DS2*, porém sem seu ligante (*HLA-C1*) (3334 ± 4336) ($P = 0,01$; IC95%: 0,08161-0,8712) (Tabela 5.17).

Tabela 5.17: Níveis plasmáticos de *IFN-γ* e parasitemia em função da presença dos pares *KIR-HLA* e/ou *HLA-C1*.

<i>KIR</i>	<i>HLA</i>	<i>HLA-Ligante</i>					
		Parasitemia		<i>IFN-γ</i> D0		<i>IFN-γ</i> D15	
		parasitas/ μ L ($\bar{x} \pm DP$)		pg/mL ($\bar{x} \pm DP$)		pg/mL ($\bar{x} \pm DP$)	
		Presente (np)	Ausente (np)	Presente (np)	Ausente (np)	Presente (np)	Ausente (np)
<i>KIR2DL2/3</i>	C1	3622 \pm 4345 (96)	3543 \pm 4435 (59)	158,6 \pm 171,2 (56)	108,5 \pm 99,91 (11)	288,5 \pm 383 (47)	193,7 \pm 158 (36)
<i>KIR2DS2</i>	C1	3954 \pm 4620* (61)	3334 \pm 4336 (41)	144,3 \pm 738,7 (21)	142,5 \pm 146,0 (8)	325,5 \pm 564,8 (17)	103,1 \pm 113,1 (13)
<i>KIR2DL1</i>	Bw4	3102 \pm 4031 (56)	3560 \pm 4249 (35)	83,49 \pm 89,3 (38)	95,45 \pm 106 (23)	114,8 \pm 138,2 (29)	182,8 \pm 157,7 (20)
<i>KIR3DL1</i>	A3A11	3248 \pm 4200 (44)	3157 \pm 4859 (58)	128 \pm 147,7 (34)	224,4 \pm 193,6 (31)	175,1 \pm 178,6 (44)	261,1 \pm 357,7 (24)
<i>KIR2DL2</i>	C2	3445 \pm 4730 (25)	3243 \pm 3876 (19)	161,13 \pm 146 (25)	186,4 \pm 176,6 (20)	101,6 \pm 91,2 (17)	249 \pm 417 (15)
<i>KIR2DS1</i>	C2	2273 \pm 2772 (24)	3061 \pm 3523 (17)	135,9 \pm 140,8 (24)	46,35 \pm 6,9 (16)	141,9 \pm 176 (20)	97,99 \pm 32,1 (16)
<i>KIR3DS1</i>	Bw4	1835 \pm 2280 (26)	346 \pm 4761 (19)	109,06 \pm 130,3 (23)	103,1 \pm 113 (15)	83,77 \pm 29 (19)	142,5 \pm 146 (9)
<i>KIR2DS4</i>	Cw4	2082 \pm 2627 (27)	2739 \pm 4532 (55)	213,7 \pm 187,6 (17)	83,61 \pm 80,9 (35)	335,7 \pm 487,6 (19)	133,7 \pm 167,1 (26)

\bar{x} : média; DP: desvio padrão; np:número de indivíduos positivos; *: *KIR2DS2_C1 versus KIR2DS2* ($P < 0,01$ IC95%: 0,08161-0,8712).

No presente estudo nós procuramos caracterizar o perfil das frequências gênicas dos receptores *KIR* e seus ligantes presentes em uma população naturalmente exposta à malária e identificar uma possível associação entre esses genes e a ocorrência e a evolução da infecção malárica.

Na análise do perfil das frequências gênicas dos receptores *KIR* e de seus ligantes na nossa população de estudo observamos, em relação às frequências dos genes *KIR*, que os genes *KIR2DL1*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4*, *KIR2DL3* foram os mais prevalentes (acima de 89%). Essas altas frequências são similares às encontradas em outras regiões brasileiras (Mato Grosso, Pará, Paraná, Belo Horizonte e Rio de Janeiro) (104, 105, 106, 107). Quanto às frequências dos genes HLA-I, ligantes do *KIR*, observamos uma alta prevalência dos genes *HLA-C1*, *HLA-Bw4* e *HLA-C2* (acima de 65%). Essas frequências também foram similares às encontradas em estudos realizados em diferentes regiões brasileiras (Bahia e Porto Alegre) (106 108). Em relação à distribuição das frequências dos pares *KIR-HLA*, os pares *KIR2DL2_3/C1* (80%), *KIR3DL1/Bw4* (66%) e *KIR2DL1/C2* (64%) foram os mais prevalentes. Em um único trabalho sobre prevalência de pares *KIR-HLA*, que foi realizado na população do Paraná (106), a alta frequência do par *KIR2DL2_3/C1* também foi relatada. Entretanto, contrariamente ao observado na nossa população de estudo, as frequências dos pares de *KIR3DL1/Bw4* (2,4%) e *KIR2DL1/C2* (27%) na população do Paraná eram baixas.

As altas frequências dos pares *KIR2DL2_3/C1*, *KIR3DL1/Bw4* e *KIR2DL1/C2* na nossa população de estudo pode ser justificada pela elevada ocorrência dos respectivos genes (receptores e ligantes) isoladamente (104, 106, 107). Esses dados corroboram a idéia da coevolução entre os genes *KIR* e *HLA* sustentadas por diversos trabalhos (109 110). Em resumo, nossos dados sugerem que a distribuição das frequências dos genes *KIR* e *HLA* (-A, -B e -C) da população de Porto Velho não difere da observada em outras regiões brasileiras.

Diversos estudos relatam a relação de receptores de células *NK*, particularmente os receptores *KIR* e seus ligantes, com a susceptibilidade e o curso clínico de diversas patologias (87-91 96). Entretanto, em nosso estudo ao avaliarmos as frequências dos genes *KIR*, *HLA* (-A, -B e -C) e dos pares *KIR-HLA* (-A, -B e -C) entre os grupos de indivíduos com e sem malária nenhuma associação foi observada. Esses resultados são divergentes daqueles

publicado por *Taniguchi e col.*(96), no qual uma maior frequência dos genes *KIR3DL1/S1* e *KIR2DS4* foi associada à infecção por *P. falciparum* (Ilhas Salomão). Sugerindo, portanto, que esses genes possam ser marcadores de susceptibilidade à malária nessa população.

Inúmeros trabalhos demonstram que as frequências genótípicas podem variar enormemente entre as populações, como resultados de diferentes pressões seletivas, além da deriva genética, do fluxo gênico e do efeito fundador (104, 105, 111, 112, 113). Em nosso estudo foram caracterizados 48 genótipos *KIR*, dentre os mais de 300 genótipos já descritos na literatura (83). Dentre os genótipos caracterizados, observamos uma maior frequência dos genótipos 42/*BAF-1* (30,8%) e 33/*BAF-2* (15,2%) (Tabela 5.5). Todos os genótipos por nós encontrados apresentam distribuição cosmopolita, porém com frequências que variam inter e intrapopulações (104, 106). Essas variações podem estar associadas à ação de fatores evolutivos e/ou efeitos demográficos.

Visto que nossa área de estudo é caracterizada por intensas migrações internas, intra e inter-regionais (99), comparamos a distribuição das frequências genótípicas dos receptores *KIR* dos indivíduos oriundos de área não endêmica (grupo dos migrantes) com a dos indivíduos nativos de área endêmica (grupo dos nativos) que apresentam uma forte descendência ameríndia. Foi interessante observar que o grupo dos nativos apresentava uma maior variabilidade de genótipos (43/48) e que um grande número desses genótipos (27/43) só ocorriam neste grupo, os quais denominamos genótipos exclusivos do grupo dos nativos. No grupo dos migrantes, além da menor variabilidade genotípica (21/48), apenas 5 genótipos foram característicos desse grupo (exclusivos do grupo dos migrantes) (Figura 5. 1). Uma das explicações para essa diferença pode envolver mecanismos evolutivos dentre eles a deriva gênica que, ao contrário do que poderia ocorrer na população de migrantes, desempenharia um importante papel na determinação da diversidade genética da população nativa (114). Cabe ressaltar que os genótipos exclusivos do grupo dos nativos são frequentes nas populações da Ásia, das Américas do Norte, Central e do Sul. Além disso, dentre os genótipos comuns aos dois grupos, o 33/*BAF-2* é mais prevalente no grupo dos nativos e apesar de ser cosmopolita, como citado anteriormente, está fortemente associado a populações ameríndias da Ásia e Américas Central e Sul. Esse fato corrobora a idéia da origem da população das Américas estarem intrinsecamente relacionadas à migração de asiáticos para o continente americano há 11-12 mil anos atrás (115).

Vários trabalhos descrevem a relação entre determinados genótipos e a incidência e a evolução clínica de diversas patologias (89-91). Para avaliarmos se os genótipos encontrados em nossa população estavam associados a uma maior susceptibilidade ou proteção à malária

utilizamos os seguintes parâmetros: infecção atual, relatos do número de malárias anteriores, do tempo desde a última infecção e das espécies plasmodiais contraídas em episódios prévios. Observamos uma maior prevalência do genótipo 42 (*BAF-1*) no grupo dos indivíduos com malária e do genótipo 33 (*BAF-2*) no grupo dos indivíduos não infectados (Tabela 5.12). Esses dados sugerem que genótipo 42 possa ser considerado marcador de uma maior susceptibilidade à malária enquanto o 33 de uma maior proteção, em nossa população de estudo. Em estudo semelhante, realizado nas Ilhas Salomão, o genótipo 42 também foi associado à susceptibilidade à malária (96). Um fato curioso em relação às espécies plasmodiais infectantes, é que apesar de não observarmos diferença na distribuição das frequências genótípicas em função das espécies plasmodiais contraídas em episódios anteriores, determinados genótipos só ocorreram em grupos que relataram malárias unicamente por *P. falciparum* (genótipos 7, 9, 38, n=4/32) ou por *P. vivax* (genótipos 22, 25, 48, n=6/83). Entretanto, o tamanho amostral é muito pequeno para inferir hipóteses a partir desses dados. Também observamos, no grupo dos nativos, que os indivíduos portadores dos genótipos exclusivos relataram um menor número de infecções maláricas (4 *versus* 13) e um maior período de tempo em relação à última infecção (59 *versus* 26, meses) quando comparados aos indivíduos do mesmo grupo, porém não portadores desses genótipos ($P=0.0001$ e $P=0.01$, respectivamente). Esses dados sugerem que os genótipos exclusivos, herdados pela população nativa de Porto Velho, possam ter representado um importante papel na sobrevivência e manutenção das populações ameríndias, estando sob ação de diferentes fatores evolutivos, dentre eles a seleção positiva associada à malária.

Sabe-se que os genes *KIR* são expressos de modo aleatório, cada célula *NK* de um indivíduo possui seu repertório *KIR*, o qual é altamente variável em termos de número e combinação de receptores. Uma célula *NK* pode então expressar em sua superfície de um a todos os genes *KIR* presentes em seu genótipo. Contudo, o repertório *KIR* de um indivíduo depende diretamente dos genes *KIR* herdados. A variação do conteúdo gênico e a diversidade alélica dos genes *KIR* podem afetar a função e o nível de especificidade e sensibilidade das células *NK* (106, 116). Dentro desse contexto, avaliamos se a variação da proporção entre genes *KIR* inibidores e ativadores, presentes nos genótipos de nossa população, poderiam ser indicadores de maior susceptibilidade ou proteção à infecção malárica. Para tal, calculamos a razão entre o número de genes inibidores e o número de genes ativadores de cada genótipo, a qual denominamos de razão INIB/ATIV e correlacionamos com os indicadores de susceptibilidade/proteção (número de malárias anteriores e tempo decorrido desde a última infecção). Cabe ressaltar que todo genótipo tem

mais genes inibidores que ativadores, visto que os receptores inibidores são fundamentais para o controle da atividade das células *NK* e para manutenção da tolerância periférica (117). Nenhuma associação foi observada entre a razão INIB/ATIV dos genótipos *KIR*, de toda a população do estudo, e os indicadores de susceptibilidade/proteção à infecção malárica. Curiosamente, um maior gradiente de genes *KIR* ativadores, nos genótipos exclusivos do grupo dos nativos, parece influenciar na proteção, visto que uma correlação negativa foi verificada entre a razão INIB/ATIV e os indicadores de proteção. Nos indivíduos com malária, uma correlação positiva foi observada entre a razão INIB/ATIV e a parasitemia, sugerindo que um maior gradiente de genes inibidores interfira no controle/eliminação dos parasitas. Entretanto, também observamos que um maior gradiente de genes inibidores estava associado a níveis mais elevados de *IFN-γ*. Associação semelhante foi relatada por Artavanis e col. (118). Esses autores, em experimentos *in vitro* observaram que células *NK* de indivíduos que continham mais genes inibidores (*KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* e *KIR3DL2*) em seus genótipos produziam níveis mais elevados de *IFN-γ*. Várias hipóteses podem ser evocadas para explicar esse fenômeno, dentre elas: a) a presença dos genes não implica na sua expressão, b) a variabilidade alélica dos genes poderia interferir na ligação entre os receptores inibidores e seus ligantes acarretando na ativação das células *NK* (96) e, c) a presença de outros receptores de ativação na superfície das células *NK* (*NKp46*, *CD94/NKG2A*, dentre outros) (66-68).

Vários trabalhos mostram que o *IFN-γ* é o indutor chave dos mecanismos imunes efetores essenciais para o controle inicial da infecção tanto das formas pré-eritrocíticas quanto eritrocíticas (119), mas há evidências de que níveis altos de *IFN-γ* podem contribuir para o desenvolvimento da patologia (120). Em nosso trabalho, os níveis elevados de *IFN-γ* sugerem um papel protetor dessa citocina visto que nenhum indivíduo apresentou malária grave. (82,83).

Vários trabalhos vem demonstrando a importância da presença dos pares *KIR-HLA*(-A, -B, -C) na susceptibilidade ou proteção a diversas doenças (87-89,91) devido ao papel desses pares na modulação das respostas imunes. Em nosso estudo verificamos o gene ativador *KIR2DS2* estava associado a níveis parasitemia mais elevados nos indivíduos que apresentavam seu par *HLA-C1*. Em várias doenças a presença desse par *KIR2DS2_C1* está associada à maior susceptibilidade, recorrência e gravidade (121-123). Estudos que avaliem o repertório de receptores *KIR* expressos nos indivíduos portadores do *KIR2DS2_C1* são necessários para esclarecer o papel desses nas diferentes patologias.

Acreditamos que os dados obtidos sobre a distribuição das frequências gênicas dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA-I*, em populações de área endêmica de malária, possam contribuir para futuros estudos sobre o impacto funcional desses genes, o seu papel na regulação da resposta imune, na relação com a incidência e na evolução clínica não só da malária como de outras doenças infecciosas.

7. Conclusões

- 1) A distribuição das frequências dos genes *KIR* e *HLA* (-A, -B e -C) na população de Porto Velho não difere das observadas em outras regiões brasileiras.
- 2) O perfil da distribuição gênica dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA* (-A, -B e -C) não apresentou influência sobre a susceptibilidade à malária na população de Porto velho.
- 3) Foram caracterizados 48 genótipos *KIR* na população de Porto Velho, todos com distribuição cosmopolita. Sendo o 42/*BAF*-1 e o 33/*BAF*-2 os mais frequentes.
- 4) Os indivíduos nativos de área endêmica apresentavam: uma maior variabilidade genotípica; uma maior frequência do genótipo 33/*BAF*-2; um grande número de genótipos exclusivos.
- 5) Os genótipos exclusivos do grupo dos nativos estão associados aos genótipos das populações ameríndias da Ásia e Américas do Norte e Central. Esses genótipos apresentam um maior gradiente de genes ativadores.
- 6) Os indivíduos nativos portadores de genótipos exclusivos relataram um menor número de infecções maláricas e um maior período de tempo desde a última infecção, sugerindo que esses genótipos confirmam uma maior proteção.
- 7) Os indivíduos com malária portadores de genótipos com maior gradiente de genes inibidores apresentam maior parasitemia, sugerindo que a presença desses genótipos esteja associada a um menor controle/eliminação dos parasitas.
- 8) Os indivíduos com malária portadores de genótipos com maior gradiente de genes inibidores apresentavam níveis plasmáticos de *IFN-γ* elevados, sugerindo que a presença desses genótipos esteja associada à produção de *IFN-γ*.
- 9) Nos indivíduos com malária, a presença do gene ativador *KIR2DS2* e seu ligante *HLA-C1* está associada a níveis de parasitemia mais elevados, indicando que a presença do par *KIR2DS2_C1* esteja associado a um menor controle/eliminação dos parasitas.

Sendo este trabalho o primeiro a caracterizar os 16 genes *KIR* e seus ligantes presentes em indivíduos de área endêmica brasileira de malária, faz-se necessário um maior aprofundamento do conhecimento da presença desses genes em nossa população naturalmente exposta à malária, e sua interação com a infecção malárica. Portanto, nossas perspectivas para a continuidade desse estudo são:

- Avaliar a frequência da combinação dos pares *KIR-HLA* (-A, -B e -C) dos indivíduos com malária e sua possível influência no desenvolvimento da infecção;
- Correlacionar as frequências alélicas e haplotípicas dos genes *KIR* e seus ligantes presentes na população com o padrão de resposta das células *NK*, os dados clínicos, epidemiológicos e parasitológicos destes indivíduos, visando elucidar as influências desses genes no curso da infecção e desenvolvimento de imunidade;
- Verificar a expressão dos genes *KIR* nas células *NK*, assim como a sua ativação na população naturalmente exposta à malária;

1. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46(2):172-3.
2. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. Am J Med Sci. 2010 Dec;340(6):492-8. Review.
3. Rey, L. Parasitologia. 4^a ed, 930 pp. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008.
4. Barros FS, Honório NA, Arruda ME. Mosquito anthropophily: implications on malaria transmission in the Northern Brazilian Amazon. Neotrop Entomol. 2010 Nov-Dec;39(6):1039-43.
5. WHO/OMS. World Malaria Report 2009. [citado em 2011] Disponível em: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html
6. SIVEP-Malária. [citado em 2011] Disponível em: http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_e?Ano_e=2010&UF_e=RO
7. Ministério da Saúde. [citado em 2011] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526
8. SISMAL/SIVEP/SVS/MS – atualizado em 28.12.2009 [citado em 2011] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf
9. Camargo EP. Malaria, maleita, paludismo. Ci Cult. 2003;55:26-32
10. Available from: <http://www.cives.ufrj.br> (UFRJ) [cited 2011].
11. Soper Elwes. *Anopheles gambiae* in Brazil, 1930-1940. Nova Iorque: Rockefeller Foundation; 1943.
12. Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1988 Mar;38(2):223-30.
13. Loiola CC, da Silva CJ, Tauil PL. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. Rev Panam Salud Publica. 2002 Apr;11(4):235-44.
14. Ministério da Saúde S. [2010]; Available from: <http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sausedw>.

15. Ministério da Saúde S. Situação Epidemiológica Da Malária No Brasil, Ano De 2005. Ministério da Saúde; 2006 [cited 2011]; Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/folder_malaria_2006_web.pdf.
16. Saúde Md. Situação Epidemiológica da Malária do Brasil. 2008
17. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010 Apr 30;9:115.
18. Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, et al. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1705-12.
19. Ejigiri I, Sinnis P. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Aug;12(4):401-7.
20. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18640-5. Epub 2010 Oct 4.
21. Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):93-129. Review.
22. Iyer J, Grüner AC, Rénia L, Snounou G, Preiser PR. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Mol Microbiol*. 2007 Jul;65(2):231-49. Review.
23. Brown A, Higgins MK. Carbohydrate binding molecules in malaria pathology. *Curr Opin Struct Biol*. 2010 Oct;20(5):560-6. Epub 2010 Jul 23. Review.
24. Cortés A. Switching *Plasmodium falciparum* genes on and off for erythrocyte invasion. *Trends Parasitol*. 2008 Nov;24(11):517-24. Epub 2008 Sep 19. Review.
25. Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol*. 2005 Nov;7(11):1539-45. Review.
26. Jones MK, Good MF. Malaria parasites up close. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):170-1.
27. Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2007 Nov;23(11):533-9.
28. Urban BC, Ing R, Stevenson MM. Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;297:25-70.
29. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.

30. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005 Sep;5(9):722-35.
31. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):725-32.
32. Sehgal VM, Siddiqui WA, Alpers MP. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83 Suppl:105-6.
33. Chizzolini C, Trottein F, Bernard FX, Kaufmann MH. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Jul;45(1):57-64.
34. McGregor IA. The Passive Transfer of Human Malarial Immunity. *Am J Trop Med Hyg.* 1964 Jan;13:SUPPL 237-9.
35. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep;45(3):297-308.
36. Hviid L. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Trop.* 2005 Sep;95(3):270-5.
37. Garraud O, Perraut R, Blanchard D, Chouteau P, Bourreau E, Le Scanf C, et al. Squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) B lymphocytes: secretion of IgG directed to *Plasmodium falciparum* antigens, by primed blood B lymphocytes restimulated in vitro with parasitized red blood cells. *Res Immunol.* 1993 Jul-Sep;144(6-7):407-18.
38. Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infect Immun.* 1987 Apr;55(4):888-91.
39. Lunel F, Druilhe P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun.* 1989 Jul;57(7):2043-9.
40. Druilhe P, Perignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunol Lett.* 1994 Jul;41(2-3):115-20.
41. Bouharoun-Tayoun H AP, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 1990;172(6):1633-41.

42. Bouharoun-Tayoun H OC, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995;182(2):409-18.
43. Soe S, Singh S, Camus D, Horii T, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* serine repeat protein, a new target of monocyte-dependent antibody-mediated parasite killing. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):7182-4.
44. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):247-52.
45. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, Anderson K, Mahakunkijcharoen Y, Martin LB, Wilson D, Elliott S, Elliott S, Eisen DP, Weinberg JB, Saul A, Good MF. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*. 2002 Aug 24;360(9333):610-7.
46. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep;5(9):722-35.
47. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. 2008 Jul;9(7):725-32.
48. McCall MB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, Dolo A, Doumbo OK, Luty A, van der Ven AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW. Memory-like IFN- γ response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *Eur J Immunol*. 2010 Dec;40(12):3472-7.
49. Wang QH, Liu YJ, Liu J, Chen G, Zheng W, Wang JC, Cao YM. *Plasmodium yoelii*: assessment of production and role of nitric oxide during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol*. 2009 Mar;121(3):268-73.
50. Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MB, Teelen K, Makamdop KN, Wiersma J, Arens T, Beckers P, van Gemert G, van de Vegte-Bolmer M, van der Ven AJ, Luty AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet*. 2011 May 21;377(9779):1770-6. Epub 2011 Apr 22.

- 51.** McCall MB, Sauerwein RW. Interferon- γ central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol.* 2010 Dec;88(6):1131-43. Epub 2010 Jul 7. Review.
- 52.** Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):441-50.
- 53.** Kumaratilake LM, Ferrante A. Opsonization and phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites measured by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 Jan;7(1):9-13.
- 54.** Leoratti, FMS, Durlacher, RR, Lacerda, MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez, MCA, Moraes, SL. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malaria Journal*, v. 7, p. 186, 2008.
- 55.** Jennings VM, Actor JK, Lal AA, Hunter RL. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun.* 1997 Nov;65(11):4883-7.
- 56.** Reyes-Sandoval A, Berthoud T, Alder N, Siani L, Gilbert SC, Nicosia A, Colloca S, Cortese R, Hill AV. Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses. *Infect Immun.* 2010 Jan;78(1):145-53.
- 57.** Awandare GA, Goka B, Boeuf P, Tetteh JK, Kurtzhals JA, Behr C, Akanmori BD. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria with respiratory distress. *J Infect Dis.* 2006 Nov 15;194(10):1438-46. Epub 2006 Oct 10.
- 58.** Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002 Aug;2(8):472-8. Review.
- 59.** Wensch C, Parschalk B, Narzt E, Looareesuwan S, Graninger W. Elevated serum levels of IL-10 and IFN-gamma in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Jan;74(1):115-7. PubMed PMID: 7994921.
- 60.** Ansong D, Asante KP, Vekemans J, Owusu SK, Owusu R, Brobby NA, Dosoo D, Osei-Akoto A, Osei-Kwakye K, Asafo-Adjei E, Boahen KO, Sylverken J, Adjei G, Sambian D, Apanga S, Kayan K, Janssens MH, Lievens MJ, Olivier AC, Jongert E, Dubois P, Savarese BM, Cohen J, Antwi S, Greenwood BM, Evans JA, Agbenyega T, Moris PJ, Owusu-Agyei S. T cell responses to the RTS,S/AS01(E) and RTS,S/AS02(D)

malaria candidate vaccines administered according to different schedules to Ghanaian children. PLoS One. 2011 Apr 27;6(4):e18891.

61. D'Ombrain MC, Robinson LJ, Stanistic DI, Taraika J, Bernard N, Michon P, Mueller I, Schofield L. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. Clin Infect Dis. 2008 Dec 1;47(11):1380-7.

62. Cabantous S, Poudiougou B, Traore A, Keita M, Cisse MB, Doumbo O, Dessein AJ, Marquet S. Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. J Infect Dis. 2005 Sep 1;192(5):854-60. Epub 2005 Jul 22.

63. Wroczyńska A, Nahorski W, Bakowska A, Pietkiewicz H. Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. Int Marit Health. 2005;56(1-4):103-14.

64. Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM. Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J Immunol. 2005 Dec 1;175(11):7466-73.

65. Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, van Deuren M, van der Meer JW, van Mierlo GJ, Eling WM, Hack CE, Sauerwein RW. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. Clin Exp Immunol. 2003 Jun;132(3):467-72.

66. Roetyncck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cells and malaria. Immunol Rev. 2006 Dec;214:251-63.

67. Ribeiro-Dias F, Tosta CE. Dynamics and kinetics of natural killer cell cytotoxicity in human malaria as evaluated by a novel stepwise cytotoxicity assay. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Jul-Aug;39(4):357-64.

68. Stewart CA, Vivier E, Colonna M. Strategies of natural killer cell recognition and signaling. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;298:1-21. Review.

69. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>. Acesso em: janeiro 2011.

70. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. Semin Immunol. 2008 Dec;20(6):343-52. Epub 2008 Jul 16. Review.

71. De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, Toffoli G. Kir Molecules: Recent Patents of Interest for the Diagnosis and Treatment of Several Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and b-Cell Malignancies. Recent Pat DNA Gene Seq. 2011 Jun 13.

72. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell

transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol.* 2009 Sep;157(3):325-31.

73. Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song YJ, French AR, Vlahiotis A, Piccirillo JF, Cella M, Colonna M, Mohanakumar T, Hsu KC, Dupont B, Yokoyama WM. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):3053-8. Epub 2008 Feb 19.

74. Trompeter HI, Gómez-Lozano N, Santourlidis S, Eisermann B, Wernet P, Vilches C, Uhrberg M. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol.* 2005 Apr 1;174(7):4135-43.

75. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, Uhrberg M. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4253-61.

76. Hansen DS, D'Ombra MC, Schofield L. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol.* 2007 Aug;19(4):416-23.

77. Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H, Piatak M, Vernikos GS, Coggill P, Lifson JD, Carrington M, Beck S. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC Genomics.* 2006 Aug 15;7:209.

78. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* 2011 Mar;132(3):315-25.

79. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* 2008 Dec;20(6):343-52. Epub 2008 Jul 16. Review.

80. Abeyweera TP, Merino E, Huse M. Inhibitory signaling blocks activating receptor clustering and induces cytoskeletal retraction in natural killer cells. *J Cell Biol.* 2011 Feb 21;192(4):675-90.

81. Mason LH, Willette-Brown J, Mason AT, McVicar D, Ortaldo JR. Interaction of Ly-49D+ NK cells with H-2Dd target cells leads to Dap-12 phosphorylation and IFN-gamma secretion. *J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):603-11.

82. Carrington, M., Norman, P. The KIR gene cluster. National Library of Medicine, United States of America, NCBI, 2003. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003.TOC&depth=2>. Acesso em 07 jun 2011.

- 83.** Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Graef T, Moesta AK, Layrisse Z, Parham P. Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18692-7.
- 84.** Vilches C, Sepúlveda S, Balas A, Solís R, Avilés MJ, Estefanía E, Gómez-Lozano N, Vicario JL, dePablo R. Complete coding sequences and haplotypic associations of HLA-B*0707, -B*1524, -B*4405, -B*4802, -DRB1*0409, -DRB1*0411, -DRB1*1115, -DRB1*1305, and the novel allele -DRB1*0709. Group-specific amplification of cDNA from DRB1 alleles associated to DRB3 and DRB4. *Tissue Antigens*. 2005 Jun;65(6):529-38.
- 85.** Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, Moesta AK, Norman PJ, Older Aguilar AM, Guethlein LA. Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol*. 2010 Aug;39(4):194-212.
- 86.** Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song Y-J, French AR, Vlahiotis A, Piccirillo JF, Cella M, Colonna M, Mohanakumar T, Hsu KC, Dupont B, Yokoyama WM. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb;105(8):3053–3058.
- 87.** Vidal-Castiñeira JR, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Alonso-Arias R, Martínez-Borra J, Pérez R, Fernández-Suárez J, Melón S, Prieto J, Rodrigo L, López-Larrea C. Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2010 Jan;84(1):475-81.
- 88.** Vejbaesya S, Nonnoi Y, Tanwandee T, Srinak D. Killer cell immunoglobulin-like receptors and response to antiviral treatment in Thai patients with chronic hepatitis C virus genotype 3a. *J Med Virol*. 2011 Jul 13.
- 89.** Xuejun Gao^a, Yulian Jiao^a, Laicheng Wang^a, Xiaowen Liu^a, Wenping Sun^a, Bin Cui^a, Zijiang Chen^b and Yueran Zhao^a. Inhibitory KIR and specific HLA-C gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B . *Clinical Immunology* Volume 137, Issue 1, October 2010, Pages 139-146
- 90.** Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, Barbour JD. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2008 May;82(10):4785-92.

- 91.** Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy JP, Tsoukas CM, Bernard NF. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS*. 2008 Mar 12;22(5):595-9.
- 92.** Gaudieri S, DeSantis D, McKinnon E, Moore C, Nolan D, Witt CS, Mallal SA, Christiansen FT. Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *Genes Immun*. 2005 Dec;6(8):683-90.
- 93.** Roetync S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cells and malaria. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:251-63.
- 94.** Roetync S, Baratin M, Vivier E, Ugolini S. NK cells and innate immunity to malaria. *Med Sci (Paris)*. 2006 Aug-Sep;22(8-9):739-44.
- 95.** Baratin M, Roetync S, Lépolard C, Falk C, Sawadogo S, Uematsu S, Akira S, Ryffel B, Tiraby JG, Alexopoulou L, Kirschning CJ, Gysin J, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14747-52.
- 96.** Taniguchi M, Kawabata M. KIR3DL1/S1 genotypes and KIR2DS4 allelic variants in the AB KIR genotypes are associated with Plasmodium-positive individuals in malaria infection. *Immunogenetics*. 2009 Dec;61(11-12):717-30.
- 97.** McCall MB, Sauerwein RW. Interferon- γ --central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol*. 2010 Dec;88(6):1131-43. Epub 2010 Jul 7. Review.
- 98.** McCall MB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, Dolo A, Doumbo OK, Luty A, van der Ven AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW. Memory-like IFN- γ response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *Eur J Immunol*. 2010 Dec;40(12):3472-7.
- 99.** **IBGE.** [citado em 2011] Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>
- 100.** Katsuragawa TH, Tada MS, da Silva LHP. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. *Estudos Avançados* 2008;22(64):111-41.
- 101.** [citado em 2011] Disponível em <<http://www.brasilrepublica.com/rondonia.htm>
- 102.** Tonyhiroshi Katsuragawa LSG, Mauro Shugiro Tada; Luiz Hildebrando Pereira da Silva. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. *Estudos Avançados* 2008;22(64):111-41.

- 103.** Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D and Jones AR *Nucleic Acid Research* 2011, 39, D913-D919.
- 104.** Ewerton PD, Leite Mde M, Magalhães M, Sena L, Melo dos Santos EJ. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics*. 2007 Aug;59(8):625-30.
- 105.** Rajalingam R, Du Z, Meenagh A, Luo L, Kavitha VJ, Pavithra-Arulvani R, Vidhyalakshmi A, Sharma SK, Balazs I, Reed EF, Pitchappan RM, Middleton D. Distinct diversity of KIR genes in three southern Indian populations: comparison with world populations revealed a link between KIR gene content and pre-historic human migrations. *Immunogenetics*. 2008 May;60(5):207-17.
- 106.** Rudnick CC, Franceschi DS, Marangon AV, Guelsin GA, Sell AM, Visentainer JE. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol*. 2008 Dec;69(12):872-6. Epub 2008 Oct 9.
- 107.** Jobim M, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Fraportti J, Baronio D, Gil B, Penna LS, Roesler R, Jobim LF, Schwartzmann G. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil. *Int J Immunogenet*. 2010 Apr;37(2):83-9.
- 108.** Carneiro VL, Lemaire DC, Bendicho MT, Souza SL, Cavalcante LN, Angelo AL, Freire SM, Mendes CM, Santana N, Lyra LG, Lyra AC. Natural killer cell receptor and HLA-C gene polymorphisms among patients with hepatitis C: a comparison between sustained virological responders and non-responders. *Liver Int*. 2010 Apr;30(4):567-73.
- 109.** Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1114-9.
- 110.** Guinan KJ, Cunningham RT, Meenagh A, Gonzalez A, Dring MM, McGuinness BW, Middleton D, Gardiner CM. Signatures of natural selection and coevolution between killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA class I genes. *Genes Immun*. 2010 Sep;11(6):467-78.
- 111.** Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol*. 2008 Dec;20(6):343-52.
- 112.** Hollenbach JA, Meenagh A, Sleator C, Alaez C, Bengoche M, Canossi A, Contreras G, Creary L, Evseeva I, Gorodezky C, Hardie RA, Karlsen TH, Lie B, Luo M,

Martinetti M, Navarette C, de Oliveira DC, Ozzella G, Pasi A, Pavlova E, Pinto S, Porto LC, Santos P, Slavcev A, Srinak D, Tavoularis S, Tonks S, Trachtenberg E, Vejbaesya S, Middleton D. Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. *Tissue Antigens*. 2010 Jul;76(1):9-17.

113. Shi L, Shi L, Tao Y, Lin K, Liu S, Yu L, Yang Z, Yi W, Huang X, Sun H, Chu J, Yao Y. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and combinations with HLA-C ligands in an isolated Han population in southwest China. *Tissue Antigens*. 2011 Jul;78(1):60-4. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01683.x.

114. Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Layrisse Z, Parham P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. *Immunogenetics*. 2006 Jun;58(5-6):474-80.

115. Arnaiz-Villena A, Parga-Lozano C, Moreno E, Areces C, Rey D, Gomez-Prieto P. The Origin of Amerindians and the Peopling of the Americas According to HLA Genes: Admixture with Asian and Pacific People. *Curr Genomics*. 2010 Apr;11(2):103-14.

116. Rempel JD, Hawkins K, Lande E, Nickerson P. The potential influence of KIR cluster profiles on disease patterns of Canadian Aboriginals and other indigenous peoples of the Americas. Eur J Hum Genet. 2011 Jul 6. doi: 10.1038/ejhg.2011.114.

117. Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, SHIV. Cellular and molecular immunology, 6TH Edition, 2008.

118. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, Riley EM. Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):5396-405.

119. D'Ombra MC RL, Stanicic DI, Taraika J, Bernard N, Michon P, Mueller I, Schofield L. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;47(11):1380-7.

120. Ong'echa JM LA, Terlouw DJ, Ter Kuile FO, Kariuki SK, Udhayakumar V, Orago AS, Hightower AW, Nahlen BL, Shi YP. Association of interferon-gamma responses to pre-erythrocytic stage vaccine candidate antigens of Plasmodium falciparum in young

Kenyan children with improved hemoglobin levels: XV. Asembo Bay Cohort Project. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;68(5):590-7.

121. Estefanía E, Gómez-Lozano N, Portero F, de Pablo R, Solís R, Sepúlveda S, Vaquero M, González MA, Suárez E, Roustán G, Vilches C. Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens*. 2007 Jul;70(1):34-41.

122. Pellett F, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, Gladman DD. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens*. 2007 Apr;69 Suppl 1:106-8.

123. Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ Diabetes. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. 2003 Oct;52(10):2639-42.