

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Variabilidade genética de receptores plaquetários e componentes do inflamossoma:
contribuição para a morbidade induzida por *Plasmodium vivax***

por

Marina Lima Silva Santos

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

DISSERTAÇÃO MDIP – CPqRR

M.L.S. SANTOS

2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Variabilidade genética de receptores plaquetários e componentes do inflamossoma:
contribuição para a morbidade induzida por *Plasmodium vivax***

por

Marina Lima Silva Santos

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título
de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S237 2015	<p data-bbox="384 1070 743 1104">Santos, Marina Lima Silva.</p> <p data-bbox="384 1133 1187 1279">Variabilidade genética de receptores plaquetários e componentes do inflamossoma: contribuição para a morbidade induzida por <i>Plasmodium vivax</i> / Marina Lima Silva Santos. – Belo Horizonte, 2015.</p> <p data-bbox="427 1308 807 1341">XVI, 62 f.: il.; 210 x 297mm.</p> <p data-bbox="427 1370 727 1404">Bibliografia: f.: 69 - 78</p> <p data-bbox="384 1433 1187 1615">Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.</p> <p data-bbox="384 1644 1187 1789">1. Malária vivax/genética 2. <i>Plasmodium vivax</i> /patogenicidade 3. Morbidade I. Título. II. . Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Brito, Cristiana Ferreira Alves (Coorientação).</p> <p data-bbox="780 1883 1129 1917">CDD – 22. ed. – 616.936 2</p>
--------------	---

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Variabilidade genética de receptores plaquetários e componentes do inflamossoma:
contribuição para a morbidade induzida por *Plasmodium vivax***

por

Marina Lima Silva Santos

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Prof. Dra. Caroline Junqueira Giusta

Prof. Dra. Letusa Albrecht

Suplente: Prof. Dra. Marcilene Rezende Silva

Dissertação defendida e aprovada em: 23/02/2015

“Comovo-me em excesso, por natureza e por ofício;
acho medonho alguém viver sem paixões.”

Graciliano Ramos

Aos mestres Amado José, Félix Faustino, Maria
Pinto e Maria Torres: meus amados avós

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Luzia Carvalho, pela confiança, dedicação e por tanto contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal. Também, à Dra. Cristiana Brito, minha coorientadora, por todo apoio e carinho.

Às Dras. Taís Nóbrega e Flora Kano, pelas excelentes discussões e outras tantas colaborações intelectuais.

Aos nossos colaboradores, em especial, ao Dr. Cor Fontes, Dr. Marcus Lacerda e Dra. Alessandra Pontillo, pela enorme contribuição para este trabalho.

À Alice e ao Geraldo, por estarem sempre dispostos a ajudar.

À minha querida amiga e “parceirinha” de trabalho Ana Luiza; sou muito grata pela ajuda, dedicação e amizade diárias.

A TODOS os colegas do Laboratório de Malária, pela excelente convivência!

Às queridas Aracele, Denise e Sarah, pela amizade tão sincera, pela palavra na hora certa, pelo afeto verdadeiro; e aos amigos Ricardo, Daniela, Débora e Lara pelo carinho, conselhos e risadas intermináveis.

A todos que um dia fizeram parte do LAMAL, em especial, à Dra. Fernanda Freire, pelo carinho com que me recebeu no laboratório e por todos os seus valiosos ensinamentos.

Aos colegas do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo agradável convívio e por oferecerem a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo oferecimento do curso de mestrado com ênfase em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

À Biblioteca do CPqRR, por prover acesso gratuito, local e remoto à informação técnico-científica em saúde, custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, e, também, pela catalogação e normalização da mesma.

Aos grandes amigos que a Vida me trouxe, por tornarem minha caminhada mais feliz!

Aos meus amados pais Rita de Cássia e José Maria, queridos avós e família, pelo amor sem limites ou condições.

E, de forma especial, a Deus, pela Sua infinita misericórdia e bondade; ao Mestre Jesus, pelo Seu amor e ensinamentos; a Nossa Senhora, por me proteger e guiar, sempre.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e ao CPqRR/FIOCRUZ.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Malária humana: aspectos gerais	18
1.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. no Homem	19
1.3 Patogenia associada à malária por <i>P. vivax</i>	20
1.4 Plaquetas e malária por <i>P. vivax</i> : contribuição para a patogenia	23
1.4.1 Variabilidade genética de receptores plaquetários	24
1.5 Componentes do inflamossoma e variabilidade genética	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Áreas e indivíduos estudados	35
4.2 Diagnóstico de malária por <i>P. vivax</i>	36
4.3 Escore para avaliação de malária aguda por <i>P. vivax</i>	36
4.4 Coleta de sangue, obtenção de DNA e diagnóstico molecular de malária	37
4.5 Genotipagem dos polimorfismos em genes de glicoproteínas plaquetárias por PCR-RFLP	38
4.6 Genotipagem dos polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma utilizando o sistema <i>TaqMan</i> ®	39
4.7 Análise dos dados	39
5 RESULTADOS	41
PARTE I: Variabilidade genética de $\alpha 2\beta 1$ – receptor para colágeno – e $\alpha IIb\beta 3$ – receptor para fibrinogênio	42
5.1 Artigo publicado intitulado “Genetic variability in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density: possible contributor to <i>Plasmodium vivax</i> -induced severe thrombocytopenia”	42
PARTE II: Resultados não publicados	47

5.2 Variabilidade genética da glicoproteína GPIb α , receptor plaquetário para fator de von Willebrand (vWF)	47
5.2.1 Padronização da reação de PCR-RFLP para a genotipagem do polimorfismo na glicoproteína GPIb α (rs2243093)	47
5.2.2 Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo de GPIb α na população estudada e associação com a morbidade na malária por <i>P. vivax</i>	47
5.2.3 Haplótipos formados por polimorfismos em genes de receptores plaquetários	50
5.3 Variabilidade genética de componentes do inflamossoma	51
5.3.1 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de NLRP1 e associação com a morbidade na malária por <i>P. vivax</i>	51
5.3.2 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de NLRP3 e associação com a morbidade na malária por <i>P. vivax</i>	55
5.3.3 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de CARD8 e associação com a morbidade na malária por <i>P. vivax</i>	56
5.3.4 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de IL-1 β e MEFV e associação com a morbidade na malária por <i>P. vivax</i>	58
5.3.5 Haplótipos formados por polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

Lista de Figuras

Figura 1: Desenho esquemático ilustrando o ciclo de vida do parasito <i>Plasmodium vivax</i> nos hospedeiros vertebrado (Homem) e invertebrado (fêmeas de anofelinos)	20
Figura 2: Representação esquemática dos principais receptores de plaquetas e suas respectivas interações	26
Figura 3: Ativação de inflamossoma na presença de patógeno ou dano celular	28
Figura 4: Perfil eletroforético do polimorfismo T/C (rs2243093) de GPIb α , para amostras de 3 indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	47
Figura 5: Associação entre níveis de hemoglobina e o polimorfismo T/C de GPIb α	49
Figura 6: Associação entre hematócrito e o polimorfismo T/C de GPIb α	50
Figura 7: Associação entre níveis de plaquetas e o polimorfismo A/T de NLRP1 (rs12150220)	53
Figura 8: Efeito do polimorfismo de NLRP1 A/G sobre a ocorrência de trombocitopenia grave	54
Figura 9: Efeito do polimorfismo de NLRP3 C/G (rs10754558) sobre a ocorrência de trombocitopenia grave	56
Figura 10: Efeito dos haplótipos para o gene de NLRP1 sobre o escore clínico	60

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados demográficos, clínico-epidemiológicos e hematológicos dos 202 indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> envolvidos no estudo	36
Tabela 2: Parâmetros e sistema de pontuações utilizados para o cálculo do escore clínico	37
Tabela 3: Sequência dos iniciadores, condições de amplificação, enzimas de restrição utilizadas e genótipos associados aos diferentes perfis de fragmentos obtidos	38
Tabela 4: Sondas utilizadas para a genotipagem de polimorfismos em genes do inflamossoma	39
Tabela 5: Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo de GPIIb α estudado	48
Tabela 6: Haplótipos para os polimorfismos de GPIIb α e β 3	51
Tabela 7: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de NLRP1	52
Tabela 8: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de NLRP3	55
Tabela 9: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de CARD8	57
Tabela 10: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de IL-1 β e MEFV	58
Tabela 11: Haplótipos para os polimorfismos de NLRP1 (rs12150220, rs2670660 e rs34733791); NLRP3 (rs35829419 e rs10754558) e CARD8 (rs2043211 e rs6509365)	59

Lista de Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

ASC – *Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD*

ATP – Adenosina trifosfato

CARD8 – *Caspase recruitment domain family, member 8*

CNAs – Ácidos nucleicos circulantes

DARC – Antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* receptor para quimiocinas

DL – Desequilíbrio de ligação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético

GPIa/IIa – Glicoproteína Ia/IIa

GPIb-IX-V – Glicoproteína Ib-IX-V

GPIb α – Glicoproteína Ib α

GPIIb/IIIa – Glicoproteína IIb/IIIa

Hb – Hemoglobina

HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HTC – Hematócrito

HTLV-1 – Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1

IC – Intervalo de confiança

IFN- γ – Interferon gamma

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

IL-18 – Interleucina 18

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

MEFV – Gene da febre Mediterrânea

MPs – Micropartículas

N. – Número

NLRP1 – *Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing 1*

NLRP3 – *Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing 3*

NLRs – *NOD like receptors*
OMS – Organização Mundial da Saúde
P – Valor de p
PB – Pares de bases
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PF4 – Fator plaquetário quatro
PM – Peso molecular
PMPs – Micropartículas de plaquetas
PvDBP – *Plasmodium vivax Duffy Binding Protein*
RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*
rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal
TNF – Fator de necrose tumoral
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UV – Ultravioleta
vWF – Fator de von Willebrand
WHO – *World Health Organization*

Resumo

Plasmodium vivax tem sido reconhecido por sua capacidade de causar malária grave, o que torna prioritário os estudos acerca dos mecanismos patogênicos associados a essa espécie. Dado o caráter inflamatório exibido pela malária vivax, faz-se relevante estudar os fatores genéticos do hospedeiro vertebrado que podem influenciar o curso da doença. Nesse sentido, o presente trabalho investigou a influência da variabilidade genética de componentes plaquetários e do inflamossoma sobre a morbidade na infecção por *P. vivax*. Mais especificamente, a primeira hipótese avaliada foi a de que alterações clínicas e hematológicas na malária vivax estão envolvidas com polimorfismos em genes de receptores plaquetários, relacionados ao aumento da adesão e/ou agregação das plaquetas: integrina $\alpha 2$ (C807T), integrina $\beta 3$ (T1565C) e glicoproteína GPIb α (T-5C). A partir do estudo de aproximadamente 200 indivíduos sintomáticos infectados por *P. vivax*, foi possível confirmar que os polimorfismos do receptor para colágeno ($\alpha 2$) e do receptor para fator de von Willebrand (GPIb α) estão associados a duas das complicações mais frequentes na malária: trombocitopenia grave e anemia. A segunda hipótese investigada foi a de que polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma – plataforma molecular capaz de desencadear a produção de citocinas inflamatórias – estão associados à morbidade em pacientes infectados por *P. vivax*. Nossos achados confirmaram essa hipótese e sugeriram que polimorfismos nos genes de NLRP1, NLRP3 e CARD8 podem contribuir para as alterações clínicas e hematológicas observadas nos indivíduos estudados. Em conjunto, os dados aqui apresentados constituem a primeira demonstração de que a variabilidade genética de receptores plaquetários e componentes do inflamossoma pode influenciar na patogenia da malária causada por *P. vivax*. Estudos futuros visando esclarecer o papel da cascata de coagulação-inflamação na morbidade dessa doença fazem-se necessários.

Abstract

Plasmodium vivax is increasingly recognized as an important cause of severe malaria, making studies on the mechanisms involved on its pathogenesis of high priority. Given the marked inflammatory status of *P. vivax* infection, it seems to be relevant to investigate host genetic polymorphisms that might influence the course of disease. In this context, the present study investigated whether genetic variability in platelets and inflammasome components would contribute to vivax malaria morbidity. More specifically, the first hypothesis investigated was that susceptibility to *P. vivax* disease could be associated with polymorphisms in relevant platelet membrane glycoproteins that result in gain of function: integrin $\alpha 2$ (C807T), integrin $\beta 3$ (T1565C) and GPIb α (T-5C). By studying about 200 symptomatic patients, we confirmed that polymorphisms associated with collagen ($\alpha 2$), and von Willebrand factor (GPIb α) receptors were associated with two of the most common *P. vivax* complications: severe thrombocytopenia and anemia. The second hypothesis investigated was that polymorphisms in inflammasome genes – molecular platforms capable of promoting pro-inflammatory cytokines production – could be associated with *P. vivax* disease. Our findings confirmed this hypothesis and suggested that genetic variability in NLRP1, NLRP3 and CARD8 would partially explain the differences in hematological and clinical profiles of *P. vivax* patients. All together, this study represents the first demonstration that genetic variability in platelet receptors and inflammasome components might contribute to *P. vivax* pathogenesis, and it opens new possibilities to investigate the crosstalk between coagulation and inflammation on malaria morbidity.

1 Introdução

1.1 Malária humana: aspectos gerais

Doença parasitária típica de países tropicais e subtropicais, a malária é responsável por grandes encargos sociais, políticos e econômicos em todo o globo. Apesar do crescente investimento em políticas de controle, evidenciado pela redução da mortalidade nos últimos anos, cerca de três bilhões de pessoas em 97 países e territórios encontram-se sob risco de contrair essa doença. A África Subsaariana concentra 90% dos óbitos atribuídos à malária, representados, em sua maioria, por crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2014).

No Brasil, em 2013, 99,5% da transmissão da malária concentrou-se na Região Amazônica, considerada área endêmica no país, onde foram notificados cerca de 200 mil casos nesse mesmo ano (Pina-Costa *et al.*, 2014). O principal vetor da doença nessa região é o mosquito *Anopheles darlingi*, presente em cerca de 80% do território nacional (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Na Região Amazônica ocorre a transmissão de três espécies de parasitos causadores da malária humana: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*. Todavia, as infecções por *P. vivax* representam aproximadamente 80% dos casos registrados.

Os protozoários parasitos causadores de malária pertencem ao filo Apicomplexa, à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Quatro são as espécies do gênero *Plasmodium* que parasitam mais frequentemente os humanos, a saber: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Recentemente, a transmissão natural de *Plasmodium knowlesi*, parasito de símios, tem sido associada a um grande número de casos clínicos de malária humana no sudeste asiático. Dessa forma, considera-se *Plasmodium knowlesi* como a quinta espécie capaz de infectar humanos (Yusof *et al.*, 2014).

As infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* representam um grande desafio para a saúde pública mundial. *P. falciparum*, a espécie mais letal, tem maior prevalência no continente africano. Dentre as espécies causadoras de malária humana, *P. vivax* é a que apresenta maior distribuição geográfica, podendo se desenvolver no mosquito vetor a baixas temperaturas e altitudes mais elevadas. Em 2013, foram estimados cerca de 20 milhões de casos de infecção por *P. vivax* no mundo. Nas Américas, 62% dos casos registrados de malária foram atribuídos a essa espécie (WHO, 2014).

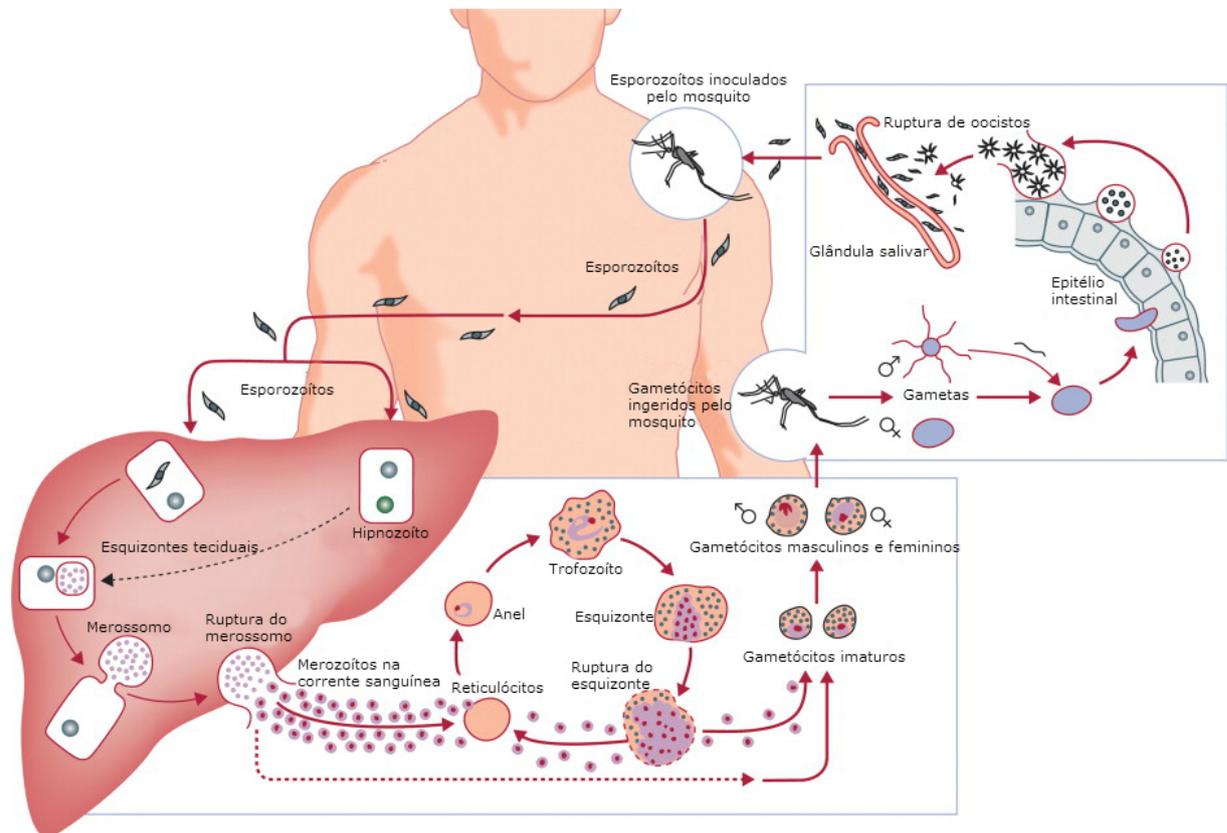
1.2 Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. no Homem

O ciclo de vida de plasmódios que infectam humanos inicia-se a partir da inoculação, por fêmeas de anofelinos, dos esporozoítos na pele. Estas formas podem deixar o local da picada via vasos linfáticos ou sanguíneos, ou permanecer na pele do hospedeiro (Ménard *et al.*, 2013). Os esporozoítos que atingem a corrente sanguínea se dirigem ao fígado, onde darão início ao ciclo pré-eritrocítico. É importante ressaltar, ainda, que antes da invasão de determinado hepatócito e formação do vacúolo parasitóforo, o esporozoíto migra por várias células do hospedeiro (Mota *et al.*, 2001). Uma vez no fígado, essas formas parasitárias podem se diferenciar em esquizontes que, ao final de inúmeras divisões mitóticas, darão origem a merozoítos. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* é possível ocorrer também o desenvolvimento de formas latentes denominadas hipnozoítos, as quais permanecem nas células do fígado por tempo variável e são responsáveis pelas recaídas da doença (Krotoski *et al.*, 1986).

Durante muito tempo, acreditou-se que a saída dos merozoítos dos hepatócitos ocorria por meio da ruptura dessas células (Frevort, 2004). No entanto, trata-se de um processo em que o parasito manipula a membrana celular do hospedeiro, de forma que centenas de merozoítos são juntamente empacotados em vesículas denominadas merossomos. Essas estruturas se destacam dos hepatócitos e atingem o lúmen dos sinusóides hepáticos, onde ocorre a liberação dos merozoítos (Sturm *et al.*, 2006). Estima-se que cada hepatócito parasitado libere até 40.000 merozoítos que, a partir da invasão de eritrócitos, darão início ao ciclo eritrocítico (Good *et al.*, 2005). Esta fase resulta no rompimento das hemácias, liberação de novos merozoítos e aparecimento dos sintomas clínicos da doença. Finalmente, alguns parasitos da fase eritrocítica se diferenciam em formas sexuadas, denominadas gametócitos, que darão continuidade ao ciclo de *Plasmodium* spp. no mosquito vetor. Os gametócitos dão origem aos gametas, que se fundem no lúmen intestinal do mosquito. O zigoto formado, denominado oocineto, atravessa o epitélio intestinal e se transforma em oocisto, no qual milhares de esporozoítos se desenvolvem. Essas formas são liberadas na cavidade corpórea do inseto e, posteriormente, atingem a glândula salivar (Smith *et al.*, 2014).

Plasmodium vivax, além de sua capacidade em produzir formas latentes no fígado (Figura 1), apresenta outras peculiaridades em seu ciclo biológico, quando comparado a *P. falciparum*. Durante a fase sanguínea, *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, células vermelhas imaturas conhecidas como reticulócitos (Sturm *et al.*, 2006). De maneira geral, seu processo de invasão requer a interação entre uma proteína apical

do parasito denominada *Duffy Binding Protein* (PvDBP) e seu receptor nos reticulócitos, o antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* receptor para quimiocinas (DARC) (Miller *et al.*, 1976). Ademais, algumas formas eritrocíticas de *P. vivax* podem se diferenciar em gametócitos antes mesmo do aparecimento dos sintomas e, por consequência, do início do tratamento; o que viabiliza a continuidade do ciclo no inseto vetor (Mueller *et al.*, 2009; White *et al.*, 2013).



Adaptado de Mueller *et al.*, 2009

Figura 1: Desenho esquemático ilustrando o ciclo de vida do parasito *Plasmodium vivax* nos hospedeiros vertebrado (Homem) e invertebrado (fêmeas de anofelinos)

1.3 Patogenia associada à malária por *P. vivax*

A infecção malárica acomete vários órgãos e sistemas, o que favorece o surgimento de complicações clínicas e o desenvolvimento da forma grave da doença. Apesar de sua notável complexidade, a patogênese da malária, particularmente a causada por *P. falciparum*, é caracterizada por uma resposta pró-inflamatória exacerbada, comprometimento do endotélio e obstrução de capilares sanguíneos, que podem culminar em desfechos fatais (Schofield & Grau, 2005; Cunnington *et al.*, 2013).

Embora *P. vivax* seja a espécie causadora de malária humana com maior distribuição global, a malária vivax foi, durante muito tempo, uma doença negligenciada. Consequentemente, grande parte dos estudos na área de patogenia se encontra direcionada para a espécie mais letal, *P. falciparum*. No entanto, a partir do emprego do diagnóstico molecular, tornou-se evidente que a monoinfecção por *P. vivax* pode ser responsável por graves complicações clínicas e hematológicas, assim como ocorre em pacientes infectados por *P. falciparum* (Price *et al.*, 2007). De fato, ao longo dos últimos anos, casos de infecções por *P. vivax* associados a internações e óbitos têm sido reportados com maior frequência, particularmente em países asiáticos (Genton *et al.*, 2008; Tjitra *et al.*, 2008) e na Região Amazônica brasileira (Lacerda *et al.*, 2012). A ocorrência de complicações tem sido atribuída a uma variedade de fatores, tais como: intensidade de transmissão, presença de comorbidades, características do hospedeiro – sexo, idade e *background* genético – além de resistência ao tratamento antimalárico (Costa *et al.*, 2012).

Mecanismos específicos que determinam a patogenia ocasionada por *P. vivax* ainda são pouco conhecidos. Por outro lado, a malária por *P. falciparum* é caracterizada pela citoadesão de hemácias parasitadas ao endotélio ativado, o que acarreta no sequestro do parasito e obstrução da microvasculatura (Turner *et al.*, 1994; Dondorp *et al.*, 2008). Como resultado desse processo, trofozoítos maduros e esquizontes são raramente vistos na circulação periférica (MacPherson *et al.*, 1985) e a carga total parasitária subestimada. Um estudo recente demonstrou, no entanto, que a carga de *P. vivax* também é subestimada pela contagem de parasitos circulantes no sangue periférico, sugerindo uma acumulação tecidual de eritrócitos parasitados (Barber *et al.*, 2015). De fato, a citoadesão de *P. vivax* a tecidos do hospedeiro foi demonstrada *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2010) e parece associada às formas parasitárias mais maduras, especialmente esquizontes (Lopes *et al.*, 2014); ademais, trabalhos anteriores descreveram a presença de eritrócitos intactos infectados por *P. vivax* na medula óssea (O'Donnell *et al.*, 1998; Ru *et al.*, 2009) e no baço (Machado-Siqueira *et al.*, 2012). De relevância, foi demonstrado que marcadores utilizados para avaliar a carga parasitária total – circulante e acumulada nos tecidos – estavam fortemente associados à gravidade da malária por *P. vivax* e à produção de citocinas inflamatórias (Barber *et al.*, 2015).

Assim como ocorre na malária por *P. falciparum*, as manifestações clínicas da infecção malárica causada por *P. vivax* parecem estar profundamente associadas a uma potente resposta pró-inflamatória e a um desequilíbrio na produção de citocinas (Andrade *et al.*, 2010). Níveis plasmáticos de TNF – citocina relacionada ao paroxismo da infecção por *P. vivax* – aumentam de acordo com a gravidade da doença. Níveis de IFN- γ também se

mostraram elevados em pacientes com manifestações graves. Em contraste, IL-10, que possui papel anti-inflamatório, apresentou níveis diminuídos nesses indivíduos (Andrade *et al.*, 2010). Um estudo recente, conduzido em Rondônia, demonstrou que pacientes sintomáticos na fase aguda da infecção por *P. vivax* apresentaram produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α , acompanhada de baixos níveis de plaquetas (Rodrigues-da-Silva *et al.*, 2014). Além desses mediadores inflamatórios, os ácidos nucleicos circulantes (CNAs) – porções de ácidos nucleicos liberadas na corrente sanguínea de forma ativa por células vivas ou por ocorrência de morte celular – estão aumentados na malária vivax e parecem associados à morbidade (Franklin *et al.*, 2011). Nesse trabalho, nosso grupo demonstrou, ainda, que baixos níveis plaquetários estavam associados a elevadas concentrações dessas moléculas.

A malária afeta quase todos os componentes do sangue e por isso pode ser considerada uma doença infecciosa hematológica (Lacerda *et al.*, 2011). A anemia e a trombocitopenia são as complicações hematológicas mais observadas nos pacientes (Wickramasinghe & Abdalla, 2000). Na infecção por *P. vivax*, cerca de 30 eritrócitos não parasitados são eliminados para cada célula infectada (Collins *et al.*, 2003); mas, apesar de se tratar de um importante componente associado à anemia, os mecanismos por trás da remoção de eritrócitos não parasitados necessitam de maiores investigações (Douglas *et al.*, 2012). A formação das chamadas “rosetas” – fenômeno de adesão entre um eritrócito infectado e células vermelhas não infectadas – que há décadas tem sido associada à patogenia da malária por *P. falciparum*, parece ser frequente em infecções por *P. vivax* (Lee *et al.*, 2014). De relevância, as rosetas parecem contribuir para o desenvolvimento da anemia nesses pacientes (Marín-Menéndez *et al.*, 2013).

Apesar de não se tratar de um critério para malária grave, a trombocitopenia tem se mostrado um importante marcador clínico para o diagnóstico de malária em indivíduos febris que retornaram de áreas tropicais (D’Acromont *et al.*, 2002). Em uma revisão sistemática da literatura, níveis de plaquetas inferiores a 150.000/mm³ variaram de 24 a 94% em pacientes com malária aguda, sendo esta frequência similar para as duas principais espécies que afetam humanos (Lacerda *et al.*, 2011). Em contrapartida, dados provenientes da Índia mostraram que a trombocitopenia apresentou-se mais frequente e com maior gravidade em pacientes infectados por *P. vivax* (Kochar *et al.*, 2010). Em um grupo de 17 pacientes de Manaus infectados apenas por *P. vivax*, com pelo menos um dos critérios de gravidade estabelecidos pela OMS, 14 apresentaram trombocitopenia (Alexandre *et al.*, 2010). Esta complicação hematológica apresenta-se logo no início da infecção, sendo que os níveis plaquetários

tendem a retornar à normalidade após tratamento eficaz com antimaláricos. Os mecanismos determinantes da trombocitopenia associada à malária vivax ainda não são claros; no entanto, podem estar relacionados a distúrbios de coagulação, sequestro de plaquetas no baço, alterações na medula óssea, destruição de plaquetas mediada por anticorpos, agregação plaquetária e estresse oxidativo (Lacerda *et al.*, 2011). Achados recentes demonstraram que a fagocitose de plaquetas também pode estar associada ao desenvolvimento da trombocitopenia na infecção por *P. vivax* (Coelho *et al.*, 2013).

1.4 Plaquetas e malária por *P. vivax*: contribuição para a patogenicidade

Além do seu papel central na hemostasia, as plaquetas desempenham funções relacionadas à modulação da resposta imune e à inflamação (Morrel *et al.*, 2014). Um extenso número de trabalhos tem demonstrado que esses fragmentos celulares influenciam o curso de processos inflamatórios, e assim contribuem para a proteção ou desenvolvimento de diversas patologias (Srivastava *et al.*, 2008; Smyth *et al.*, 2009; Clemetson, 2011). Na malária murina, as plaquetas são ativadas precocemente durante o estágio eritrocítico do parasito e dão início à resposta de fase aguda do hospedeiro (Aggrey *et al.*, 2013).

Quando ativadas, as plaquetas liberam componentes que auxiliam na adesão, secretam mediadores inflamatórios e expressam diversas moléculas de superfície, responsáveis por recrutar e ativar células do sistema imune. Portanto, esses pequenos fragmentos de megacariócitos são capazes de interagir com outros diferentes tipos celulares de forma direta – por mecanismos dependentes de contato – e indiretamente, por meio da secreção de mediadores imunes (Morrel *et al.*, 2014).

As plaquetas são uma fonte abundante de micropartículas (MPs) (Boilard *et al.*, 2010). Essas estruturas são vesículas de membrana liberadas por células ativadas em resposta a diversos estímulos, tais como, citocinas inflamatórias, indutores de estresse e apoptose. As MPs podem armazenar um grande número de moléculas bioativas, as quais podem ser disseminadas e transferidas entre as células. Estas microvesículas são consideradas potenciais biomarcadores de inflamação, sendo detectadas em níveis elevados no plasma de pacientes com doenças inflamatórias distintas (Doeuvre *et al.*, 2009). Em 2010, Campos e colaboradores mostraram pela primeira vez que MPs de leucócitos, eritrócitos e plaquetas se encontravam em número elevado no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*. Esta foi a primeira evidência de que os níveis de micropartículas derivadas de plaquetas (PMPs) estavam associados a manifestações clínicas da doença (Campos *et al.*, 2010). Na malária causada por *P. falciparum*, as PMPs facilitam a adesão de eritrócitos infectados ao endotélio

cerebral (Faille *et al.*, 2009). Dessa forma, especula-se que essas vesículas possam estar envolvidas com a citoadesão ao endotélio pulmonar na malária por *P. vivax*, sugerida por Anstey e colaboradores (2007).

As várias funções desempenhadas pelas plaquetas também incluem seu papel protetor em infecções por diferentes patógenos (Morrel *et al.*, 2014). No que diz respeito à malária, verificou-se que as plaquetas estão associadas à morte das formas intraeritrocíticas, sendo este fenômeno, a princípio, espécie independente (McMorran *et al.*, 2009). Foi demonstrado, posteriormente, que a morte de *P. falciparum* mediada por plaquetas requeria contato entre as mesmas e os eritrócitos infectados, liberação do fator plaquetário quatro (PF4) – quimiocina liberada por plaquetas ativadas – e ligação desse fator ao receptor DARC dos eritrócitos (McMorran *et al.*, 2012). Além de seu papel clássico como quimiocina, PF4 também apresenta atividade antimicrobiana e pode desencadear diretamente a morte de bactérias patogênicas e fungos (Tang *et al.*, 2002; Yeaman *et al.*, 2007). Esses achados endossam a hipótese de que o próprio fator plaquetário seja a molécula efetora responsável pela morte mediada por plaquetas, principalmente das formas intraeritrocíticas mais maduras. Estudos sugerem, ainda, que PF4 leva à morte do parasito nos eritrócitos, por meio da lise de seu vacúolo digestivo (Love *et al.*, 2012). Compreender os diversos componentes e funções das plaquetas, portanto, demonstra ser de grande importância para o entendimento da proteção e susceptibilidade na malária por *P. vivax*.

1.4.1 Variabilidade genética de receptores plaquetários

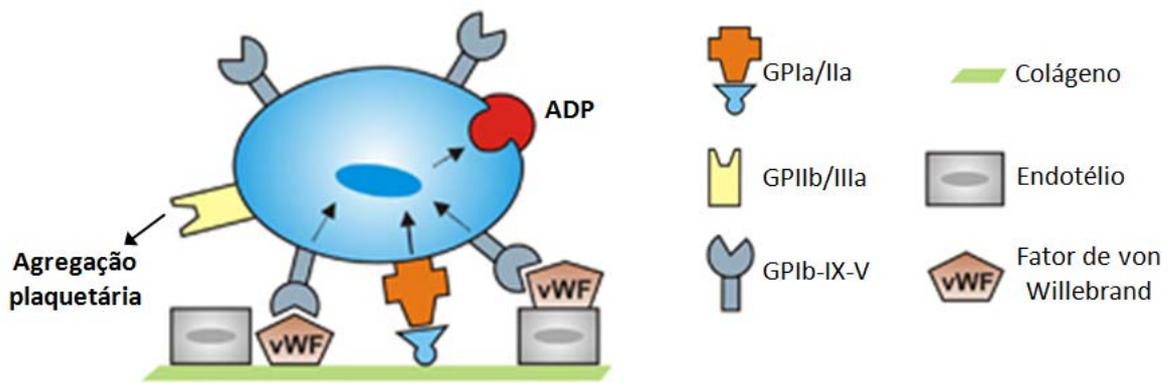
As plaquetas possuem glicoproteínas de membrana, há muito estudadas, as quais consistem em receptores de superfície responsáveis por importantes funções, tais como adesão, ativação e agregação plaquetárias. Grande parte dos estudos acerca dessas glicoproteínas está restrita a doenças cardiovasculares. Entretanto, sabe-se que a variabilidade genética do hospedeiro pode afetar os receptores de superfície das plaquetas, de forma a modificar o desempenho das mesmas, bem como sua contribuição em diversas patologias (Jiménez *et al.*, 2008).

Entre os principais receptores de plaquetas estão incluídas as glicoproteínas GPIa/IIa, GPIIb/IIIa e GPIb α (Figura 2). A GPIa/IIa, também conhecida como integrina $\alpha 2\beta 1$, é o principal receptor plaquetário para colágeno, responsável pela ativação e adesão das plaquetas à parede vascular danificada. O polimorfismo C807T (rs1126643) do gene que codifica a subunidade $\alpha 2$ está relacionado à densidade de $\alpha 2\beta 1$ e ao ganho de função na adesão

plaquetária, sendo que indivíduos carreadores do alelo T possuem maiores níveis desse receptor e elevado risco trombótico (Kunicki *et al.*, 1997; Moshfegh *et al.*, 1999).

De grande importância para a formação do trombo e controle de hemorragias, GPIIb/IIIa – ou α Ib β 3 – é capaz de se ligar ao fibrinogênio, que atua como substrato no recrutamento de novas plaquetas para o local da lesão. Um polimorfismo no gene que codifica a subunidade β 3 (rs5918), localizado na posição 1565, parece estar relacionado a uma maior agregação plaquetária (Feng *et al.*, 1999). Presente em cerca de 10% da população, o alelo mutado tem sido associado a doenças cardiovasculares prematuras e trombose (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1999; Walter *et al.*, 1997). No entanto, para muitos autores, essa associação não está totalmente esclarecida (Floyd *et al.*, 2014).

A interação inicial entre plaquetas e a parede vascular lesionada é mediada pelo complexo GPIb-IX-V, sendo a glicoproteína GPIba o maior polipeptídeo dentre os que compõem esse complexo (Huizinga *et al.*, 2002). GPIba apresenta uma região capaz de se ligar a uma proteína encontrada no plasma e na matriz subendotelial, denominada fator de von Willebrand (vWF), sendo essa associação de extrema importância para a ativação plaquetária (López, 1994). Níveis elevados de vWF foram observados durante a infecção por *P. vivax* e associados a baixas contagens de plaquetas (Mast *et al.*, 2009). Com relação aos níveis do receptor para vWF, foi proposto que o polimorfismo T-5C (rs2243093) de GPIba determina a expressão dessa glicoproteína na superfície das plaquetas. Assim, portadores do alelo C – menos frequente nas populações – apresentam maiores níveis de GPIba e maior risco no desenvolvimento de doenças coronarianas (Afshar-Kharghan *et al.*, 1999). Todavia, o estudo de receptores plaquetários é pouco explorado na malária e, então, não se conhece a contribuição desse polimorfismo para a morbidade da doença.



Adaptado de Kraft *et al.*, 2012

Figura 2: Representação esquemática dos principais receptores de plaquetas e suas respectivas interações. A adesão plaquetária ao endotélio, mediada por GPIa/IIa e GPIb-IX-V, leva à ativação plaquetária e secreção de adenosina difosfato (ADP). A glicoproteína GPIIb/IIIa promove a agregação das plaquetas, por meio da ligação ao fibrinogênio

1.5 Componentes do inflamossoma e variabilidade genética

Achados recentes demonstraram que as plaquetas são capazes de processar e secretar IL-1 β em sua forma ativa (Hottz *et al.*, 2013). De grande importância para a resposta imune inata, essa citocina é produzida em decorrência da formação de complexos moleculares denominados inflamossomas (Figura 3). Estes complexos consistem em plataformas moleculares que se tornam ativadas em resposta a uma variedade de estímulos provenientes de infecções, dano tecidual ou desequilíbrios metabólicos (Latz *et al.*, 2013).

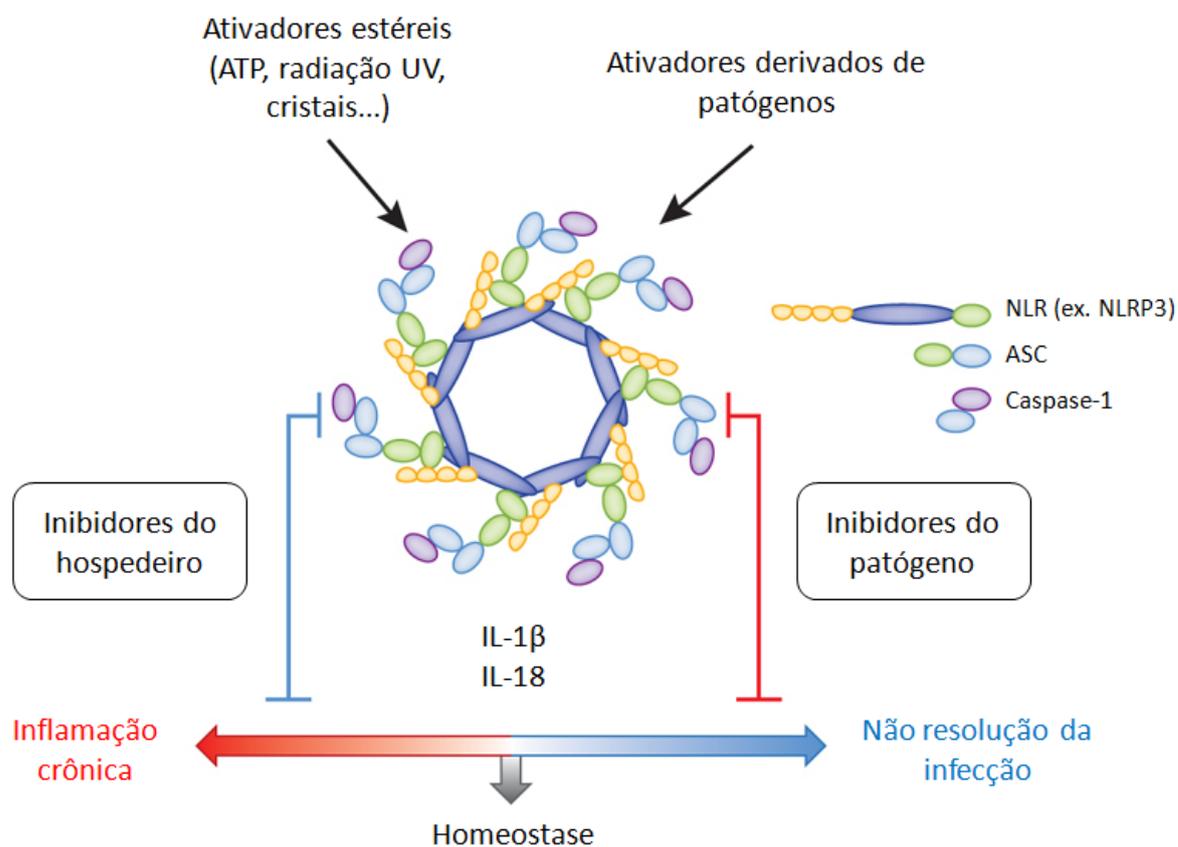
Inicialmente, a produção de IL-1 β via inflamossoma requer a ativação de receptores intracelulares do tipo NOD (NLRs). O inflamossoma mais bem caracterizado apresenta NLRP3 como sensor de patógeno ou dano e, uma vez sensibilizado, promove a ativação indireta da caspase-1, a fim de produzir IL-1 β e IL-18 (Schroder & Tschopp, 2010). Ao contrário, o inflamossoma contendo NLRP1 é capaz de ativar caspase-1 diretamente (Faustin *et al.*, 2007).

A inibição do processo inflamatório pelo próprio hospedeiro ou patógeno é uma estratégia utilizada para limitar o dano ou facilitar o progresso da infecção, respectivamente. Com relação aos mecanismos do hospedeiro, a autoinibição do inflamossoma é um elemento essencial para impedir que a resposta inflamatória se torne exacerbada (Davis *et al.*, 2011).

Em um estudo pioneiro, foi mostrado que uma proteína contendo um domínio de recrutamento de caspase, denominada CARD8, interage por contato com a caspase-1 e regula negativamente sua ativação (Razmara *et al.*, 2002). Por outro lado, Ito e colaboradores sugeriram que CARD8 interage diretamente com NLRP3, promovendo a diminuição de IL-1 β (Ito *et al.*, 2014). Outra molécula que parece estar associada ao controle da produção de IL-1 β é a pirina, proteína codificada pelo gene da febre Mediterrânea (MEFV) (Hesker *et al.*, 2012).

Polimorfismos em genes codificadores de componentes dos inflamossomas, bem como de suas moléculas reguladoras, parecem determinar a susceptibilidade ou proteção a diversas infecções, como pelo HIV-1 (Pontillo *et al.*, 2012b). Um polimorfismo localizado no gene de NLRP1 (rs2670660), especialmente quando combinado a outro polimorfismo no mesmo gene (rs12150220), parece conferir um risco mais elevado ao desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (Pontillo *et al.*, 2012a). Em um estudo prospectivo de pacientes com meningite pneumocócica, foi mostrado que um polimorfismo no gene de CARD8 (rs2043211) estava associado a um mau prognóstico da doença (Geldhoff *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao papel dos inflamossomas na malária, foi demonstrado que heme extracelular – indicador de hemólise e dano celular – promove a ativação de NLRP3 e posterior produção de IL-1 β (Dutra *et al.*, 2014). Estudos em modelos murinos reportaram que os cristais de hemozoína produzidos durante a infecção ativam NLRP3 e agravam os sintomas da malária cerebral (Dostert *et al.*, 2009). Além disso, a hemozoína sintética foi capaz de ativar o inflamossoma *in vivo*, mesmo na ausência de infecção por *Plasmodium* sp. (Griffith *et al.*, 2009). Não existem, todavia, trabalhos associando a variabilidade genética dos inflamossomas às manifestações clínicas observadas na malária, ou mesmo à inflamação característica dessa doença.



Adaptado de Henao-Mejia *et al.*, 2012

Figura 3: Ativação de inflamossoma na presença de patógeno ou dano celular. Este evento inicial leva à ativação de caspase-1 – com ou sem a participação de moléculas adaptadoras (ASC) – e liberação de IL-1 β e IL-18. Em condições normais, a ativação dos inflamossomas culmina na resolução da infecção ou inflamação. Em contrapartida, a perpetuação da ativação pode levar a um quadro de inflamação crônica e agravamento da doença. Inibidores derivados de patógenos bloqueiam a ação do inflamossoma e assim a resolução da infecção, ao passo que inibidores próprios do hospedeiro previnem a exacerbação do processo inflamatório

2 Justificativa

Em tempos que se vislumbra a eliminação da malária em algumas regiões do globo, faz-se necessário conhecer os mecanismos patogênicos da doença, bem como seus determinantes genéticos. Nas últimas décadas, o foco dos estudos esteve voltado para a espécie associada a uma maior letalidade, *P. falciparum*. Em contraste, a malária causada por *P. vivax* foi considerada “benigna” e, historicamente, recebeu menor importância por parte das pesquisas e políticas de controle (Price *et al.*, 2007). É importante ressaltar, porém, que a malária vivax é uma ameaça para cerca de 3 bilhões de pessoas em todo o mundo (Guerra *et al.*, 2010), além de ser responsável por internações e óbitos na Ásia e América latina (White *et al.*, 2013; Lacerda *et al.*, 2012). Portanto, trata-se de um grande desafio para o controle da malária como um todo.

A infecção por *P. vivax* parece induzir uma resposta inflamatória mais intensa, se comparada à resposta frente à infecção por *P. falciparum* (Yeo *et al.*, 2010). De fato, estudos de pesquisadores brasileiros demonstraram que a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias está relacionada à gravidade da malária vivax (Andrade *et al.*, 2010). Esse trabalho demonstrou, ainda, que, tanto os níveis de citocinas inflamatórias quanto os parâmetros laboratoriais de disfunção sistêmica apresentaram redução durante o tratamento com antimaláricos. Por outro lado, os mecanismos envolvidos com a malária vivax sintomática parecem ser bem mais complexos, envolvendo uma rede de interações moleculares (Mendonça *et al.*, 2013).

Em um estudo recente que incluiu apenas indivíduos adultos infectados por *P. vivax*, foram observados sintomas de gravidade, tais como dificuldade respiratória, malária cerebral e insuficiência renal (Muley *et al.*, 2014). Essas complicações foram significativamente mais comuns entre os pacientes com baixos níveis de plaquetas. Apesar da trombocitopenia não estar associada à mortalidade por si só, essa manifestação clínica demonstrou ser um bom marcador para o aumento da gravidade e alerta para a necessidade de manejo especial dos pacientes (Muley *et al.*, 2014). De interesse, um dos mecanismos que podem explicar a trombocitopenia nos pacientes infectados por *P. vivax* é a adesão de plaquetas em órgãos como o baço (Leal-Santos *et al.*, 2013).

De grande importância para a manutenção da hemostasia, as plaquetas também desempenham funções relacionadas à modulação da resposta imune e à inflamação (Morrel *et al.*, 2014). Achados recentes sugerem que esses fragmentos de megacariócitos são essenciais para o início da resposta de fase aguda em modelos murinos de malária cerebral. Entretanto, a ativação contínua das plaquetas no decorrer da infecção parece contribuir para a inflamação

associada a esse quadro da doença (Aggrey *et al.*, 2013). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que microvesículas liberadas em resposta à ativação plaquetária se encontram em número elevado no plasma de pacientes infectados por *P. vivax* (Campos *et al.*, 2010). De fato, as micropartículas derivadas de plaquetas (PMPs) foram associadas a manifestações clínicas da malária vivax, e têm sido bastante estudadas em modelos de malária cerebral (El-Assaad *et al.*, 2014).

Os inflamossomas – plataformas moleculares que são ativadas em resposta a infecções, dano tecidual ou desequilíbrios metabólicos – promovem a liberação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-18 (Latz *et al.*, 2013). Apesar de poucos trabalhos explorarem o papel dessas plataformas na patogênese da malária, sabe-se que o heme extracelular e a hemozoína são capazes de ativar o inflamossoma *in vivo* (Dutra *et al.*, 2014; Dostert *et al.*, 2009), o que contribui para o processo inflamatório característico da malária.

Tendo em vista a importância da inflamação para a patogenia da malária causada por *P. vivax* e o envolvimento das plaquetas e do inflamossoma com a infecção malárica (Ataide *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2014), acredita-se que a variabilidade genética em componentes plaquetários e do inflamossoma possa exercer influência sobre as manifestações clínicas observadas na doença. Para o presente trabalho, foram escolhidos polimorfismos nos genes de $\alpha 2\beta 1$, que é o principal receptor para colágeno em plaquetas; $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, que promove a agregação plaquetária; e GPIb α , receptor para o fator de von Willebrand (vWF). Além disso, polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma foram selecionados para estudo, tais como NLRP1, NLRP3, CARD8, IL-1 β e MEFV.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar polimorfismos em genes do hospedeiro vertebrado, particularmente os relacionados à função plaquetária e ao inflamossoma, e verificar a associação dos mesmos com a morbidade causada por *P. vivax*.

3.2 Objetivos específicos

(i) Padronizar as reações de PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) para o estudo de polimorfismos de receptores plaquetários, tais como integrina $\alpha 2\beta 1$, integrina $\alpha IIb\beta 3$ e glicoproteína GPIb α ;

(ii) Genotipar os polimorfismos de receptores plaquetários selecionados e verificar associação entre esses polimorfismos e a presença de alterações clínicas e hematológicas em pacientes infectados por *P. vivax*;

(iii) Genotipar polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma, tais como NLRP1, NLRP3, CARD8, IL-1 β e MEFV, e verificar a associação dos mesmos com a presença de alterações clínicas e hematológicas em pacientes infectados por *P. vivax*.

4 Metodologia

4.1 Áreas e indivíduos estudados

Este estudo foi conduzido utilizando amostras previamente congeladas de pacientes infectados por *P. vivax* provenientes dos estados do Mato Grosso (MT), Amazonas (AM) e Rondônia (RO). Nessas regiões, a malária é considerada de transmissão instável e a infecção aguda atinge tanto crianças como adultos que, em geral, apresentam a sintomatologia clínica de intensidade variada.

As amostras foram obtidas entre os anos de 2010 e 2014, totalizando 202 voluntários. Os critérios de inclusão no estudo foram: (i) indivíduos de ambos os sexos com idade igual ou superior a 2 anos; (ii) em caso de sexo feminino, indicativo de ausência de gravidez; (iii) diagnóstico comprovado para *P. vivax* (gota espessa positiva) em Cuiabá (Hospital Julio Muller), Manaus (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado) ou Porto Velho (Centro de Medicina Tropical de Porto Velho); (iv) ausência de infecção por outra espécie de plasmódio confirmada por PCR espécie-específica (item 4.4). Os dados demográficos e clínicos foram obtidos utilizando-se protocolos já padronizados pelo grupo de pesquisa (Ceravolo *et al.*, 2008; Kano *et al.*, 2012) e o perfil hematológico avaliado por meio de hemograma completo automatizado, realizado nos laboratórios de referência sob a supervisão do Dr. Cor Fontes (MT e RO) ou do Dr. Marcus Lacerda (AM). Todos os voluntários selecionados assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, de acordo com as diretrizes para pesquisa em seres humanos especificadas pelo Conselho Nacional de Saúde. Em adição ao termo de consentimento, termos de assentimento foram obtidos dos menores envolvidos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Parecer n. 03/2008 e 29/2010).

A tabela 1 resume os dados demográficos, clínico-epidemiológicos e hematológicos dos indivíduos infectados por *P. vivax* envolvidos no estudo. A idade dos indivíduos variou entre 2 e 80 anos, sendo 78% do sexo masculino. Tendo em vista que grande parte dos voluntários era emigrante de áreas livres de transmissão, a idade não refletiu o tempo de exposição à malária. Dessa forma, a exposição cumulativa à malária foi avaliada como o número de episódios da doença informado pelo paciente (Tabela 1). Indivíduos que apresentaram contagem de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$ foram categorizados como trombocitopênicos. Ademais, níveis de plaquetas inferiores a $50.000/\text{mm}^3$ configuraram trombocitopenia grave (Lacerda *et al.*, 2011).

Tabela 1: Dados demográficos, clínico-epidemiológicos e hematológicos dos 202 indivíduos infectados por *P. vivax* envolvidos no estudo

Parâmetros	Valores
Sexo masculino:feminino	3,5:1
Idade	36 (2-80) ¹
Episódios de malária	2 (0-60) ¹
Parasitas/ μ L	2.792,5 (25-30.000) ¹
Hematócrito, %	39 (15-68) ¹
Hemoglobina, g/dL	13 (5-21) ¹
Leucócitos/ mm^3 ($\times 10^3$)	5,2 (1,8-14,6) ¹
Plaquetas/ mm^3 ($\times 10^3$)	88 (13-260) ¹
Trombocitopenia, n. (%) [□]	168 (84)
Trombocitopenia grave, n. (%) [¥]	34 (17)
Dias com sintomas	5 (1-50) ¹
Febre, n. (%)	156 (88)
Calafrio, n. (%)	160 (90)
Cefaleia, n. (%)	156 (88)
Mialgia, n. (%)	148 (86)

¹ Mediana (variação)

[□] Contagem de plaquetas $\leq 150.000/\text{mm}^3$

[¥] Contagem de plaquetas $\leq 50.000/\text{mm}^3$

4.2 Diagnóstico de malária por *P. vivax*

O diagnóstico da infecção por *P. vivax* foi realizado por técnicos treinados das unidades de saúde locais, a partir do exame microscópico de gota espessa corada por Giemsa. A infecção exclusiva por *P. vivax* foi posteriormente confirmada por PCR (item 4.4). A condução clínica e o tratamento antimalárico foram realizados sob a supervisão do Dr. Cor Fontes ou do Dr. Marcus Lacerda, seguindo as recomendações preconizadas do Programa Nacional de Controle da Malária (SVS, 2010).

4.3 Escore para avaliação de malária aguda por *P. vivax*

Diante da inexistência de critérios que definem a gravidade da malária causada por *P. vivax*, utilizou-se a classificação feita pela OMS para malária grave por *P. falciparum* (WHO, 2009). Dessa forma, apenas um indivíduo infectado por *P. vivax*, proveniente do estado do Amazonas, demonstrou sinais clínicos de malária grave. Esse paciente apresentou

hiperbilirrubinemia (bilirrubina total = 4,3 mg/dL) e insuficiência renal aguda (creatinina = 2,3 mg/dL); outras doenças infecciosas comuns foram descartadas durante a sua hospitalização. Conseqüentemente, visando categorizar os indivíduos estudados para fins de análise estatística, optou-se por construir um escore clínico que pudesse definir “diferentes graus de morbidade” para os demais indivíduos sintomáticos. Neste contexto, foram adaptados os critérios utilizados por Franklin *et al.*, 2011. Resumidamente, o escore clínico levou em conta a ocorrência ou não de febre, além de parâmetros hematológicos – hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas (Tabela 2). Pontuações de “zero” ou “um” foram atribuídas aos parâmetros quando estes se mostravam ausentes – ou dentro dos valores de referência – ou presentes – fora da faixa de referência, respectivamente. No caso das plaquetas, porém, indivíduos com níveis acima de 150.000/mm³ receberam pontuação igual a “zero”; aqueles com níveis entre 150.000 e 100.000/mm³, pontuação igual a “um”; níveis entre 100.000 e 50.000/mm³, pontuação igual a “dois”; e aqueles que apresentaram trombocitopenia grave – contagem de plaquetas menor que 50.000/mm³ – receberam pontuação igual a “três”. Ao final, a soma dos pontos para todos os parâmetros analisados consistiu no escore total, que variou de zero a sete.

Tabela 2: Parâmetros e sistema de pontuações utilizados para o cálculo do escore clínico

Parâmetros	Pontuação Atribuída			
Febre	0 se ausente	1 se presente		
Hemoglobina	0 se ≥ 12 (mulher)	1 se < 12 (mulher)		
	0 se ≥ 13 (homem)	1 se < 13 (homem)		
Hematócrito	0 se ≥ 37	1 se < 37		
Leucócitos	0 se ≥ 4.000	1 se < 4.000		
Plaquetas	0 se ≥ 150.000	1 se < 150.000	2 se < 100.000	3 se < 50.000

4.4 Coleta de sangue, obtenção de DNA e diagnóstico molecular de malária

De cada indivíduo foram coletados cerca de 5 mL de sangue por punção venosa na presença de EDTA, com a utilização do sistema Vacuette® (Greiner Bio-One International GmbH, Austria). O DNA foi obtido utilizando-se kit de extração de DNA genômico (Gentra systems, USA), conforme as recomendações do fabricante, e armazenado a -20°C até o momento do uso. O diagnóstico molecular de malária foi baseado na sequência do gene 18S rRNA, utilizando-se um protocolo de nested-PCR já padronizado no laboratório (Costa *et al.*, 2014).

4.5 Genotipagem dos polimorfismos em genes de glicoproteínas plaquetárias por PCR-RFLP

A técnica de PCR foi utilizada para a amplificação de regiões de interesse dos genes estudados, a partir de molde de DNA fita dupla. As reações foram realizadas em volumes finais de 20 μ L, contendo 100 a 200 ng da amostra de DNA, 0,5 μ M de cada iniciador e 10 μ L de PCR Master Mix (*Promega, USA*), que contém a enzima *Taq* DNA polimerase, dNTPs, $MgCl_2$ e tampões em concentrações pré-estabelecidas. As amplificações foram conduzidas nos termocicladores automáticos *Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)* e *Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, USA)*. Na tabela 3 estão listadas as sequências dos iniciadores e as condições de reação para cada região de interesse. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL).

Os fragmentos de DNA amplificados foram, em seguida, digeridos com enzimas de restrição específicas (Tabela 3). A digestão para o polimorfismo de $\alpha 2\beta 1$ ocorreu à temperatura de 65°C por 2 horas; para $\alpha IIb\beta 3$ foi feita a 37°C por 16 horas; e finalmente para o polimorfismo de $GPIb\alpha$, a digestão foi realizada a 37°C por 3 horas. Os produtos gerados durante a digestão foram visualizados em gel de poliacrilamida corado com prata, a fim de melhor distinguir os genótipos. Para os polimorfismos de $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha IIb\beta 3$, foi feito gel de poliacrilamida a 15%, ao passo que para o polimorfismo de $GPIb\alpha$ foi feito gel de poliacrilamida a 8%.

Tabela 3: Sequência dos iniciadores, condições de amplificação, enzimas de restrição utilizadas e genótipos associados aos diferentes perfis de fragmentos obtidos

Sequência do iniciador 5'-3'	Protocolo da PCR (n. de ciclos; temperatura de anelamento dos primers)	Enzima de restrição	Alelo (tamanho em pb)
$\alpha 2\beta 1$ (rs1126643) Jiménez <i>et al.</i> , 2008 F: GTGTTTAACTTGAAGACATAT R: ACCTGCATATTGAATTGCTT	40 ciclos; 50°C por 45 s	<i>Taq</i> I	C: 23, 92 T: 115
$\alpha IIb\beta 3$ (rs5918) Jiménez <i>et al.</i> , 2008 F: TTCTGATTGCTGGACTTCTCTT R: TCTCTCCCCATGGCAAAGAGT	40 ciclos; 53°C por 60 s	<i>Msp</i> I	C: 45, 50, 177 T: 45, 221
$GPIb\alpha$ (rs2243093) Ishida <i>et al.</i> , 2000 F: AGAAGAGAGAAGGACGGAGTCGAG R: AGGATGGTTGTGTCTTTTCGGC	40 ciclos; 58°C por 60 s	<i>Ava</i> II	C: 131, 336 T: 131, 161, 175

4.6 Genotipagem dos polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma utilizando o sistema *TaqMan*®

As genotipagens dos polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma foram realizadas por meio do Sistema *TaqMan*® (*Applied Biosystems, Life Technologies, USA*). *TaqMan*® é uma sonda que possui um componente fluorescente capaz de detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados durante a PCR. Neste estudo, especificamente, foram utilizados os compostos fluorescentes VIC e FAM. As reações utilizando esse sistema foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante e as amostras lidas através do equipamento de PCR em tempo real ABI 7300 (*Applied Biosystems, USA*). A discriminação alélica também foi realizada conforme orientações do fabricante e analisada utilizando-se o software SDS (v. 2.3) (*Applied Biosystems, USA*).

Esta parte do estudo foi feita em colaboração com a Dra. Alessandra Pontillo (Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo), especialista em estudos de associação entre polimorfismos genéticos em componentes do inflamossoma e doenças infecciosas. As sondas utilizadas para cada polimorfismo se encontram descritas na tabela 4.

Tabela 4: Sondas utilizadas para a genotipagem de polimorfismos em genes do inflamossoma

Gene - polimorfismo	Sequência da Sonda [VIC/FAM]
NLRP1	rs12150220 GGAGCTTGGAAGAGCTTGGTAGAGG[A/T]GTGAGGCAGAGATTCTGGGGGGAA
	rs2670660 ACAAGTGATCTACCAGTCTTTAAA[A/G]TTCTATTATTAACCCAAACATGC
	rs34733791 CATCTCTCCCGTATCCAGGCCCTCA[A/G]TAGGGGTCATCACACTTGGTTTCCT
NLRP3	rs35829419 GGAAGGCCGACACCTTGATATGGTG[A/C]AGTGTGTCTCCCAAGCTCCTCTCA
	rs10754558 GACAATGACAGCATCGGGTGTGTT[C/G]TCATCACAGCGCCTCAGTTAGAGGA
CARD8	rs2043211 AGTTGACACTCAGGAACAGCACGGA[A/T]CAATAATGGCTCTGCCTCTGTCTCA
	rs6509365 TTCATTTTCTACAAATGAGACATAA[A/G]CCTGGTGCTGATGAGGAGCCACTGA
IL-1β	rs1143634 CATAAGCCTCGTTATCCCATGTGTC[G/A]AAGAAGATAGGTTCTGAAATGTGGA
MEFV	rs224204 GGAGTCTGGAATCACAGACCCCGGG[A/G]TTGGGAACATCTCCCTCCCAGGTCC

4.7 Análise dos dados

Neste estudo, verificou-se o efeito dos diferentes alelos, genótipos e haplótipos sobre parâmetros clínicos e hematológicos dos pacientes, tais como níveis de hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, ocorrência de trombocitopenia grave e valores de escore clínico. A princípio, foram feitas análises univariadas para comparação de medianas,

utilizando-se os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, uma vez que os grupos não apresentaram distribuição normal. A fim de comparar proporções, realizou-se o teste Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher.

Posteriormente, para verificar a influência dos polimorfismos sobre os parâmetros clínicos e hematológicos estudados – controlando pelos possíveis fatores de confusão, como sexo, idade e exposição prévia à malária – foram feitas análises de regressão. O método *Stepwise* foi utilizado para selecionar as variáveis a serem analisadas, sendo que para o método *Forward* – critério de entrada das variáveis no modelo de regressão – foram utilizadas as análises univariadas, adotando um nível de significância de 25%. As variáveis selecionadas entraram na regressão múltipla, tendo sido aplicado a partir dessa etapa o método *Backward*. Este procedimento consiste em retirar, por vez, a variável de maior valor-p, até que restem no modelo somente variáveis significativas. Para o método *Backward* foi adotado um nível de 5% de significância. Denominamos a regressão final, após os procedimentos *Backward* e *Forward*, como regressão *Stepwise*.

Com exceção do critério de entrada das variáveis na análise de regressão, todos os outros testes consideraram nível de significância de 5%. Os *softwares* utilizados nas análises estatísticas foram o *R* (3.0.3), *GraphPad* (*InStat* 4.0; *Prism* 6) e *Minitab*® 17. A inferência dos haplótipos formados por polimorfismos nos genes de α IIb β 3 e GPIIb α ; NLRP1; NLRP3; CARD8, bem como as análises de desequilíbrio de ligação, foram realizadas no programa *Arlequin* (3.1).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do consultor estatístico André Gabriel da Costa e da Dra. Taís Nóbrega de Sousa (CPqRR/FIOCRUZ-MG).

5 Resultados

Os resultados serão apresentados em duas partes, sendo a primeira relacionada ao artigo publicado e a segunda referente aos dados ainda não publicados.

PARTE I: Variabilidade genética de $\alpha 2\beta 1$ – receptor para colágeno – e $\alpha IIb\beta 3$ – receptor para fibrinogênio

5.1 Artigo publicado intitulado “Genetic variability in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density: possible contributor to *Plasmodium vivax*-induced severe thrombocytopenia”

Fernanda M. F. Campos⁺, Marina L. S. Santos⁺, Flora S. Kano, Cor J. F. Fontes, Marcus V. G. Lacerda, Cristiana F. A. Brito e Luzia H. Carvalho

⁺Essas autoras contribuíram igualmente para o artigo

Resumo. O entendimento da patogênese associada à malária por *Plasmodium vivax* tem sido um desafio nos últimos anos. Neste trabalho, procurou-se investigar se a susceptibilidade à trombocitopenia induzida por *P. vivax* poderia estar associada a polimorfismos de integrinas de membrana plaquetária: integrina $\alpha 2$ (C807T) e integrina $\beta 3$ (T1565C). Apesar de não ter sido observada associação entre o polimorfismo de $\beta 3$ e complicações na malária vivax, carreadores de $\alpha 2$ 807T, os quais possuem maiores níveis da integrina $\alpha 2\beta 1$, apresentaram uma maior chance de desenvolver trombocitopenia grave quando comparados aos indivíduos não mutados. Essa primeira evidência da associação entre o polimorfismo de $\alpha 2$ e a morbidade ocasionada por *P. vivax* foi posteriormente demonstrada por meio de uma correlação significativa entre a doença clínica e níveis da integrina $\alpha 2\beta 1$.

Short Report: Genetic Variability in Platelet Integrin $\alpha 2\beta 1$ Density: Possible Contributor to *Plasmodium vivax*-induced Severe Thrombocytopenia

Fernanda M. F. Campos,[†] Marina L. S. Santos,[†] Flora S. Kano, Cor J. F. Fontes, Marcus V. G. Lacerda, Cristiana F. A. Brito, and Luzia H. Carvalho*

Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil; Fundação de Medicina Tropical
Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil

Abstract. Understanding the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria is challenging. We hypothesized that susceptibility to *P. vivax*-induced thrombocytopenia could be associated with polymorphisms on relevant platelet membrane integrins: integrin $\alpha 2$ (C807T), and integrin $\beta 3$ (T1565C). Although $\beta 3$ polymorphism was not related with *P. vivax* malaria, $\alpha 2$ 807T carriers, which show high levels of integrin $\alpha 2\beta 1$, had a higher probability for severe thrombocytopenia than wild-type carriers. This evidence of the association of integrin polymorphism and *P. vivax* morbidity was further demonstrated by a moderate but significant correlation between clinical disease and surface levels of the integrin $\alpha 2\beta 1$.

Plasmodium vivax infection is no longer considered a benign disease because it might cause severe or fatal episodes.^{1,2} Although the mechanisms underlying *P. vivax*-induced pathogenesis remain poorly studied, thrombocytopenia is frequently observed in *P. vivax* infection.³ Recent studies suggest an association between deep thrombocytopenia and severity of the illness.⁴ However, the mechanisms leading to thrombocytopenia, as well as its contribution to malaria pathogenesis, are not well understood.

Besides their central role in homeostasis, platelets contain a wide range of inflammatory, immune-modulating, and angiogenic factors. Consequently, it is not surprising that the role of platelets in the development of an array of disorders continues to emerge.⁵ Although *P. vivax*-induced thrombocytopenia has not been investigated in detail,³ several lines of evidence suggest that platelets participate actively in the pathogenesis of malaria.⁶ In *P. vivax* malaria, platelets release microparticles into the circulation, and these platelet-derived microparticles seem to be associated with acute inflammatory symptoms of disease.⁷ In addition, we have shown that levels of plasma cell-free circulating nucleic acids were closely correlated with platelet counts, increasing in a linear fashion with the spectrum of *P. vivax* malaria.⁸ On the basis of these observations, we hypothesized that platelet receptor polymorphisms that result in a gain of function in platelet adhesion and/or aggregation *in vivo* might place carriers at increased risk for *P. vivax*-induced thrombocytopenia.

We studied the association between *P. vivax* and polymorphisms of platelet integrins (cell-surface heterodimeric proteins that mediate cell-matrix and cell-cell interactions⁹). The focus of this study was two gain-of-function platelet receptor single-nucleotide polymorphisms: the C807T polymorphism of integrin $\alpha 2$ (also known as platelet glycoprotein Ia, GPIa) and the T1565C of integrin $\beta 3$ (platelet glycoprotein IIIa, GPIIIa). Both polymorphisms have been implicated in different clinical events, including those related to the coronary syndromes, probable because of their gain-of-function mechanisms.^{10,11} Integrin $\alpha 2$, a platelet receptor for collagen, forms

a functional receptor with the integrin $\beta 1$ subunit, which is essential for platelet function.⁹ The C807T single nucleotide polymorphism (single-nucleotide polymorphism no. rs1126643; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) is considered a genetic marker of the integrin $\alpha 2\beta 1$ density.^{12,13} Integrin $\beta 3$, a common β subunit for $\beta 3$ -integrins, such as $\alpha IIb\beta 3$, has a key role in platelet function by binding fibrinogen and von Willebrand factor (vWF),¹⁴ and the T1565C polymorphism (rs5918) seems to increase platelet aggregation.¹⁵ To the best of our knowledge, there has been no study that assessed the association between integrin polymorphisms and *P. vivax* malaria.

A total of 150 *P. vivax* patients 2–78 years of age were enrolled in the study after written informed consent, as specified by the Brazilian National Council of Health (Protocol CEPSh/CPqRR/03/2008). Antimalarial and supportive therapies were given according to standard protocols. The study included patients with symptomatic but uncomplicated *P. vivax* malaria, and all volunteers were negative for *P. falciparum* and/or *P. malariae* by microscopy and polymerase chain reaction. Demographic, clinico-epidemiologic, and hematologic data of *P. vivax*-infected volunteers are shown in Table 1.

Because there are no clear criteria to define *P. vivax*-induced morbidity, we used a previously validated semi-quantitative clinical assessment to enable numerical comparisons.⁸ In brief, scores of 0 or 1 were assigned to clinical and hematologic parameters reported as absent (or within reference ranges) or present (or outside reference ranges), respectively; the sum of scores provides the patient's final clinical score (scores range from 0 to 5). Determination of $\alpha 2$ C807T and $\beta 3$ T1565C integrin genotypes was performed by using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assays with restriction enzymes *TaqI* (integrin $\alpha 2$) and *MspI* (integrin $\beta 3$), as described.¹⁶

The prevalence of integrin $\alpha 2$ C807T genotypes in *P. vivax* patients were 35% CC, 55% CT and 10% TT, and overall allele frequencies were C = 63% and T = 37%. The frequency of *P. vivax* patients who showed the highest receptor density (807T allele) was similar to that reported for healthy persons in a meta-analysis of seven independent studies (approximately 1,000 healthy persons); 37% were 807T allele carriers.¹⁷

To determine the impact of $\alpha 2$ C807T polymorphic variation on susceptibility to morbidity, we stratified patients according

*Address correspondence to Luzia H. Carvalho, Malaria Laboratory, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30190-00. E-mail: lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br

[†]These authors contributed equally to this article.

TABLE 1

Characteristics of 150 *Plasmodium vivax* patients enrolled in the study

Characteristic	Value
Sex, M:F	3:1
Age, median (range)	36 (2–78)
Malaria episodes, median (range)*	2 (0–60)
Parasites/ μ L, median (range)	1,219 (25–8,238)
Hematocrit %, median (range)	39 (14–51)
Hemoglobin, g/dL, median (range)	13 (5–17)
Leukocyte count/ mm^3 ($\times 10^3$), median (range)	5.5 (2.0–14.6)
Platelet count/ mm^3 ($\times 10^3$), median (range)	98 (13–260)
Thrombocytopenia, no. (%) [†]	124 (83)
Severe thrombocytopenia, no. (%) [‡]	25 (17)
Length of symptoms, days, median (range)	4 (1–50)
Fever at the time of blood sampling, no. (%)	113 (77)

*Self-reported number of lifetime malaria episodes.

[†]Platelet count $\leq 150,000/\text{mm}^3$.

[‡]Platelet count $\leq 50,000/\text{mm}^3$; this criterion has been used in several malaria studies, including those carried-out in the Amazon area.³

to clinical and hematologic data. Results showed that median platelet counts for *P. vivax* patients carrying the 807T allele ($90,500/\text{mm}^3$, interquartile range = $53,000$ – $128,500/\text{mm}^3$) was significantly lower than for patients carrying the wild-type allele ($101,000/\text{mm}^3$, interquartile range = $70,000$ – $139,250/\text{mm}^3$) ($P = 0.0228$, by non-parametric Wilcoxon Mann-Whitney test). There was a weak trend toward decreased platelet counts according to the number of mutated alleles (median platelet count = $85,000/\text{mm}^3$ for two mutated alleles and $91,500$ for one mutated allele). The general trend of low platelet counts among patients carrying one or two mutated alleles (χ^2 for trend = 5.18 , $P = 0.022$) is shown in Figure 1A. The 807T allele was predominantly associated with severe thrombocytopenia (platelet counts $< 50,000/\text{mm}^3$) but not with moderate thrombocytopenia (platelet counts = $50,000$ – $100,000/\text{mm}^3$).

Using the wild-type genotype CC as a reference, we found that the TT genotype was associated with an increased probability for severe thrombocytopenia (adjusted odds ratio [OR] = 10.31 , 95% confidence interval [CI] = 2.13 – 49.79 , $P = 0.004$) (Figure 2). Also, *P. vivax* patients with the variant genotypes (CT and TT) had a significantly higher risk for severe thrombocytopenia than patients with the CC genotype (adjusted OR = 4.44 , 95% CI = 1.23 – 15.99 , $P = 0.023$).

To make numerical comparisons between integrin $\alpha 2\beta 1$ levels and clinical spectrum of *P. vivax* malaria, we scored persons according to integrin $\alpha 2\beta 1$ levels as follows: score = 2 (homozygous for the 807T allele), score = 1 (heterozygous for the 807T allele), and score = 0 (no 807T allele). This criterion was used because 807 C/T dimorphism is a genetic marker of integrin $\alpha 2\beta 1$ levels, and platelets carrying the TT genotype express the highest levels, TC platelets express intermediate levels, and CC platelets express the lowest levels.^{13,18}

Using this semi-quantitative assessment, we demonstrated a moderate but significant correlation between intensity of clinical malaria and surface levels of the integrin $\alpha 2\beta 1$ (Spearman $r = 0.2$, $P = 0.011$). Nevertheless, the present study precludes any definite conclusion about clinical disease and integrin $\alpha 2\beta 1$ because it deals only with uncomplicated *P. vivax* malaria. To properly address this question, a follow-up study would be desirable, which included patients with different degrees of malaria.

The $\beta 3$ integrin genotype distribution among *P. vivax* patients showed that the frequencies of the heterozygous (TC) and homozygous (CC) mutations of T1565C were 18.7% and 0.8%,

respectively, with a predominance of the TT genotype ($n = 99$, 80.5%). The allele frequencies (90% T and 10% C) we report confirm those of previous studies, which showed that usually more than 80% of the human population harbors the T1565 allele.¹⁹ In *P. vivax* patients stratified according to platelet counts, we did not find evidence supporting an association between *P. vivax* thrombocytopenia and the T1565C polymorphism of integrin $\beta 3$ (Figure 1B); the T versus C allele comparison showed an adjusted OR of 1.55 (95% CI = 0.44 – 5.47 , $P = 0.419$). No evidence of any gene-disease association was obtained comparing the T1565C polymorphism of the integrin $\beta 3$ among *P. vivax* patients. However, because of the low frequency of CC homozygotes in our sample and the high frequency of polymorphisms in integrin $\beta 3$,²⁰ it is not appropriate to exclude a role for $\beta 3$ integrin in *P. vivax*-induced thrombocytopenia. In this context, it would be of interest to investigate polymorphisms in the major vWF receptor, glycoprotein-1b (GP1b), because studies have implicated endothelial cell activation with release of active vWF as one pathogenic mechanism contributing to malaria-induced thrombocytopenia.²¹

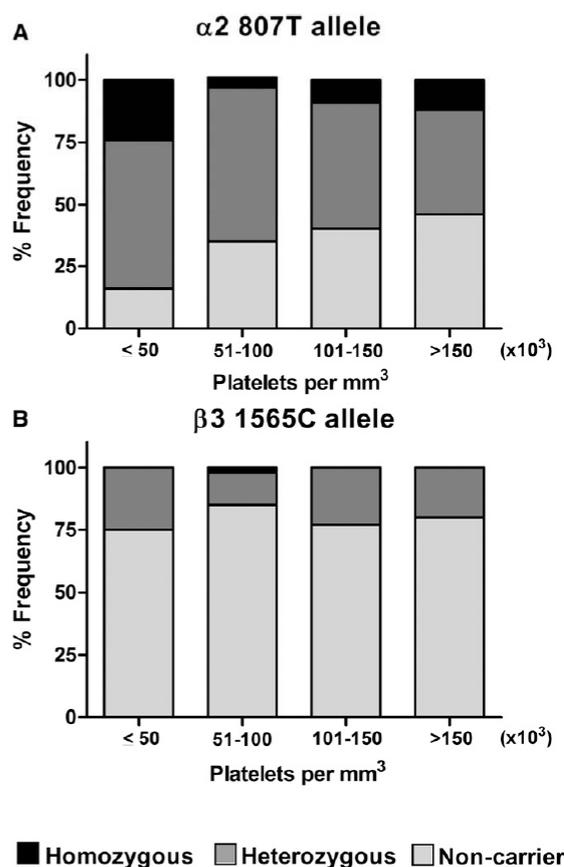


FIGURE 1. Influence of integrin $\alpha 2$ C807T polymorphism, but not integrin $\beta 3$ T1565C polymorphism, on *Plasmodium vivax*-induced thrombocytopenia. Genotype distributions of A, integrin $\alpha 2$ C807T and B, integrin $\beta 3$ T1565C according to platelet levels among 150 *P. vivax* malaria patients. Results are frequency of persons carrying two (homozygous), one (heterozygous), or no mutated allele.

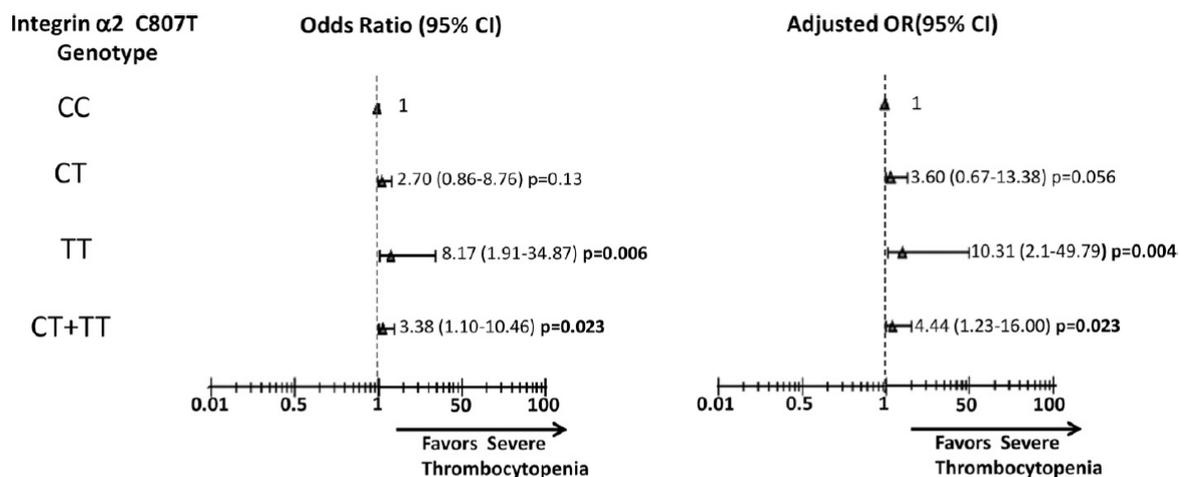


FIGURE 2. Odds ratio (ORs) analysis for the association of integrin $\alpha 2$ C807T polymorphism among *P. vivax* malaria patients with severe thrombocytopenia (platelet counts $\leq 50,000/\text{mm}^3$). Crude OR was obtained by using 2×2 contingency tables with a 95% confidence interval (CI), and the adjusted OR was calculated by using the unconditional logistic regression method with adjustment for age, sex, and previous malaria. $P < 0.05$ was considered significant (**bold**).

The pathogenic mechanism involved in the association between hereditary variation in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density and *P. vivax*-induced thrombocytopenia is unknown. Nevertheless, our evidence showed that the integrin $\alpha 2$ C807T polymorphism is associated with an increased risk for *P. vivax*-induced severe thrombocytopenia according to the fact that the coagulation-inflammation cycle acts as a cofactor for malaria morbidity.²² In this context, if one considers recent findings that suggest that *P. vivax* malaria is associated with excessive endothelial activation and inflammation,^{23,24} one could speculate that perturbed endothelia induced by malaria infection would potentiate an exacerbate platelet-collagen interaction in $\alpha 2$ 807T carriers, whose propensity for collagen-induced platelet aggregation/activation is increased.

Previous findings suggest that thrombocytopenia in persons with malaria might be related to endothelial damage.²⁵ Furthermore, because platelet activation by agonists such as collagen or thrombin also leads to vesiculation of the platelet membrane and formation of microparticles, this mechanism might amplify *P. vivax*-induced inflammation and contribute to reduced platelet lifespan in malaria patients. We have demonstrated that platelet-derived microparticles might play a role in acute inflammatory symptoms of *P. vivax* malaria.⁷ However, a relationship between $\alpha 2$ polymorphism and *P. vivax* thrombocytopenia remains unclear because the contribution of endothelial activation in the pathophysiology of *P. vivax* malaria, as well as mechanisms involved in thrombocytopenia, are unknown.³ Thus, a useful field of investigation would be the role of platelets and surface integrin receptors in *P. vivax* cytoadhesion, which is a not well-defined phenomenon traditionally associated with *P. falciparum* infection.²⁶

Because ancestry might play a role in the prevalence of integrin genotypes,²⁷ it is important to explore whether regional differences in the hematologic status of *P. vivax* malaria²⁸ are linked to differences in ancestral origins of the study population. Unfortunately, there is little information on integrin polymorphisms in malaria-endemic areas. Consequently, a more com-

prehensive search for polymorphisms/haplotypes of different integrins may provide additional insight into the role of integrin genetics in malaria.

In conclusion, the present study provides evidence that an integrin $\alpha 2$ C807T polymorphism is associated with an increased risk of *P. vivax*-induced severe thrombocytopenia. It remains to be clarified whether this polymorphism is linked to other relevant mutations. Because the number of cases was relatively small and hematologic variables were obtained at the time of diagnosis, our findings should be interpreted with caution before being confirmed in larger studies. This preliminary study provides a valuable guidance for the future studies in this area.

Received May 11, 2012. Accepted for publication November 1, 2012.

Published online December 18, 2012.

Acknowledgments: We thank the volunteers for participating in the study and malaria control teams in Manaus and Cuiabá for logistic support during fieldwork.

Financial support: This study was supported by the Research Foundation of Minas Gerais State, the Brazilian National Research Council, the Oswaldo Cruz Foundation, and Pronex Malaria. Marina L. S. Santos was supported by a scholarship from the Research Foundation of Minas Gerais State; and Cor J. F. Fontes, Marcus V. G. Lacerda, Cristiana F. A. Brito, and Luzia H. Carvalho were supported by scholarships from the Brazilian National Research Council.

Authors' addresses: Fernanda M. F. Campos, Marina L. S. Santos, Flora S. Kano, Cristiana F. A. Brito, and Luzia H. Carvalho, Malaria Laboratory, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil 30190-002, E-mails: fernanda@cpqrr.fiocruz.br, marinalima@cpqrr.fiocruz.br, florakano@cpqrr.fiocruz.br, cristiana@cpqrr.fiocruz.br, and lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br. Cor J. F. Fontes, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Mato Grosso, Rua Luiz Phellipe Pereira Leite S/N, Alvorada, Cuiabá, Mato Grosso 78048-902, Brazil, E-mail: corfontes@gmail.com. Marcus V. G. Lacerda, Gerência de Malária, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Av. Pedro Teixeira, 25, Manaus, Amazonas 69040-000, Brazil, E-mail: ymarcuslacerda.br@gmail.com.

REFERENCES

- Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Müller I, 2008. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 5: 881–889.
- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN, 2008. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 5: 890–899.
- Lacerda MV, Mourao MP, Coelho HC, Santos JB, 2011. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 (Suppl 1): 52–63.
- Tanwar GS, Khatri PC, Chahar CK, Sengar GS, Kochar A, Tanwar G, Chahar S, Khatri N, Middha S, Acharya J, Kochar SK, Pakalapati D, Garg S, Das A, Kochar DK, 2012. Thrombocytopenia in childhood malaria with special reference to *P. vivax* monoinfection: a study from Bikaner (northwestern India). *Platelets* 23: 211–216.
- Clemetson KJ, 2011. The role of platelets in defence against pathogens. *Hamostaseologie* 31: 264–268.
- Grau GE, Craig AG, 2012. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol* 7: 291–302.
- Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, Brito CF, Carvalho LH, 2010. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J* 9: 327.
- Franklin BS, Vitorino BL, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos ML, Campos FM, Brito CF, Fontes CJ, Lacerda MV, Carvalho LH, 2011. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS ONE* 6: e19842.
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D, 2010. Integrins. *Cell Tissue Res* 339: 269–280.
- Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ, 1996. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334: 1090–1094.
- Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lämmle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ, 1999. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 353: 351–354.
- Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, 1998. Nucleotide polymorphisms in the alpha2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet alpha2 beta1 density. *Blood* 92: 2382–2388.
- Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ, 1997. Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood* 89: 1939–1943.
- Bennett JS, 2005. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest* 115: 3363–3369.
- Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH, 1999. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa P1A2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1142–1147.
- Jimenez S, Tássies D, Espinosa G, García-Criado A, Plaza J, Monteagudo J, Cervera R, Reverter JC, 2008. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 67: 835–840.
- Nikolopoulos GK, Tsantes AE, Bagos PG, Travloui A, Vaiopoulos G, 2007. Integrin, alpha 2 gene C807T polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Thromb Res* 119: 501–510.
- Liu CZ, Wang YC, Wang JH, Shaw CK, Lin GL, 2006. Differential expression of platelet glycoprotein Ia/IIa in Taiwan Chinese corresponds to glycoprotein Ia gene polymorphisms. *J Pharmacol Sci* 101: 103–106.
- Newman PJ, Derbes RS, Aster RH, 1989. The human platelet alloantigens, P1A1 and P1A2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 83: 1778–1781.
- Landau M, Rosenberg N, 2011. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion* 51: 558–569.
- de Mast Q, Groot E, Asih PB, Syafruddin D, Oosting M, Sebastian S, Ferwerda B, Netea MG, de Groot PG, van der Ven AJ, Fijnheer R, 2009. ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 80: 492–498.
- Francischetti IM, Tássies D, Espinosa G, García-Criado A, Plaza J, Monteagudo J, Cervera R, Reverter JC, 2012. Defibrotide interferes with several steps of the coagulation-inflammation cycle and exhibits therapeutic potential to treat severe malaria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 786–798.
- Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, Pira K, Gitawati R, Kenangalem E, Price RN, Anstey NM, 2010. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis* 202: 109–112.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M, 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9: 13.
- Horstmann RD, Dietrich M, 1985. Haemostatic alterations in malaria correlate to parasitaemia. *Blut* 51: 329–335.
- Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, del Portillo HA, Araújo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Rénia L, Costa FT, 2010. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 202: 638–647.
- Di Paola J, Jugessur A, Goldman T, Reiland J, Tallman D, Sayago C, Murray JC, 2005. Platelet glycoprotein I(b)alpha and integrin alpha2 beta1 polymorphisms: gene frequencies and linkage disequilibrium in a population diversity panel. *J Thromb Haemost* 3: 1511–1521.
- Caicedo O, Ramirez O, Mourão MP, Ziade J, Perez P, Santos JB, Quiñones F, Alecrim MG, Arévalo-Herrera M, Lacerda MV, Herrera S, 2009. Comparative hematologic analysis of uncomplicated malaria in uniquely different regions of unstable transmission in Brazil and Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 80: 146–151.

PARTE II: Resultados não publicados

5.2 Variabilidade genética da glicoproteína GPIb α , receptor plaquetário para fator de von Willebrand (vWF)

5.2.1 Padronização da reação de PCR-RFLP para a genotipagem do polimorfismo na glicoproteína GPIb α (rs2243093)

A reação de PCR-RFLP foi padronizada com sucesso de acordo com o protocolo descrito por Ishida *et al.*, 2000, apresentando pequenas modificações, conforme especificado na Metodologia. A figura 4 ilustra o perfil eletroforético do polimorfismo T/C de GPIb α para amostras de 3 pacientes.

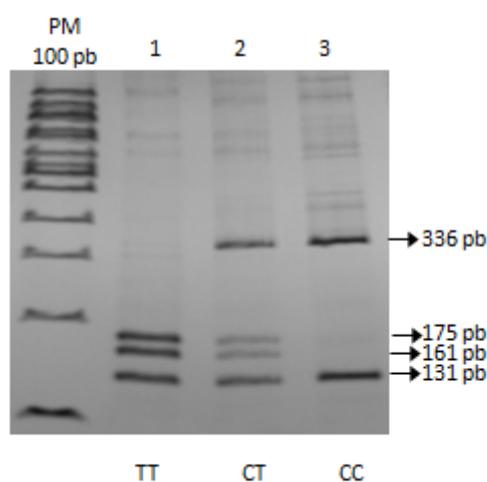


Figura 4: Perfil eletroforético do polimorfismo T/C (rs2243093) de GPIb α , para amostras de 3 indivíduos infectados por *P. vivax*. O indivíduo 1 possui genótipo TT; indivíduo 2, genótipo CT e o indivíduo 3 apresenta o genótipo mutado CC. Gel de poliacrilamida 8% corado com prata. PM= padrão de peso molecular

5.2.2 Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo de GPIb α na população estudada e associação com a morbidade na malária por *P. vivax*

Ao todo, 182 indivíduos foram genotipados para o polimorfismo de GPIb α . A tabela 5 exhibe as frequências alélicas e genotípicas encontradas na população de estudo. O alelo selvagem T foi o mais frequente (85%), bem como o genótipo selvagem TT, presente em 73% dos indivíduos. O alelo C mutado apresentou frequência relativa igual a 15% e os genótipos CT e CC tiveram frequências iguais a 25% e 2%, respectivamente.

Tabela 5: Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo de GPIb α estudado

Gene	Polimorfismo	Alelo	Frequência, n. (%)
GPIb α	rs2243093	T	310 (85)
		C	54 (15)
		Genótipo	
		TT	132 (73)
		CT	46 (25)
		CC	4 (2)

A fim de verificar uma associação entre o polimorfismo de GPIb α e a morbidade ocasionada por *P. vivax*, analisou-se o efeito dos alelos e genótipos sobre os níveis de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, ocorrência de trombocitopenia grave e escore clínico.

A partir da análise univariada, verificou-se uma associação entre níveis de hemoglobina (Hb) e os alelos de GPIb α (Figura 5a). Portadores do alelo T selvagem apresentaram mediana de Hb igual a 13,2 g/dL, enquanto a mediana para portadores do alelo mutado C foi de 12,3 g/dL, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Teste de Mann-Whitney; $p=0,0016$). Na análise de regressão, quando foram controladas as possíveis variáveis de confusão, tais como sexo, idade e exposição prévia à malária, observou-se que, em portadores do alelo C, o valor médio de Hb foi 0,81 g/dL menor que em portadores do alelo T (IC 95%: 0,232 – 1,38; $p=0,006$).

De forma semelhante, verificou-se uma associação entre níveis de Hb e os genótipos de GPIb α (Figura 5b). Portadores do genótipo TT apresentaram o maior valor mediano (13,2 g/dL), ao passo que portadores do genótipo CC apresentaram a menor mediana (10,05 g/dL), sendo essa diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis; $p=0,004$). Considerando as variáveis de confusão, o valor médio de Hb na presença do genótipo CC foi 3,071 g/dL menor que em portadores do genótipo TT (IC 95%: 0,52 – 5,62; $p=0,019$). No entanto, não houve diferença significativa entre TT e CT ($p=0,191$).

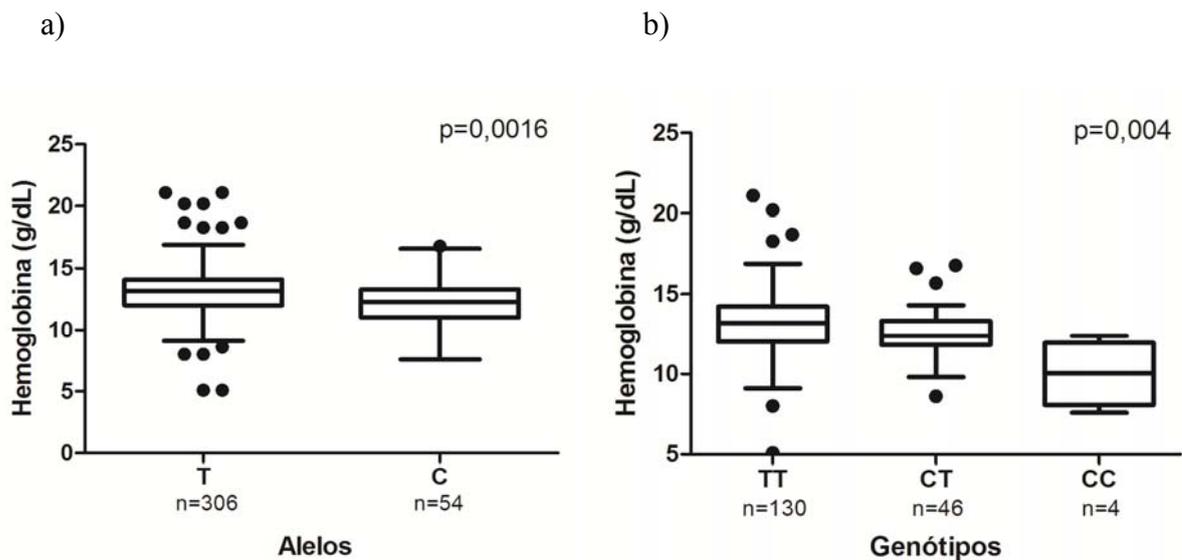


Figura 5: Associação entre níveis de hemoglobina e o polimorfismo T/C de GPIIb/IIIa. a) Efeito dos alelos de GPIIb/IIIa sobre níveis de hemoglobina, sendo T o alelo selvagem e C o alelo mutado. b) Efeito dos genótipos de GPIIb/IIIa sobre níveis de hemoglobina, sendo TT o genótipo homocigoto selvagem, CT o heterocigoto e CC o genótipo homocigoto mutado

O polimorfismo do gene de GPIIb/IIIa também influenciou as taxas de hematócrito (HTC) dos pacientes (Figura 6). Portadores do alelo T apresentaram mediana de HTC igual a 39,4%, enquanto a mediana para portadores do alelo C foi de 37,5%, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Teste de Mann-Whitney; $p=0,0068$). Os resultados da análise de regressão confirmaram a associação entre HTC e os alelos de GPIIb/IIIa. Em portadores do alelo C, a taxa média de HTC foi 2,79% menor que em portadores do alelo T (IC 95%: 0,92 – 4,67; $p=0,004$).

Além da associação entre os alelos e valores de HTC, observou-se que portadores do genótipo TT apresentaram o maior valor mediano (39,6%) de HTC, ao passo que portadores do genótipo CC apresentaram a menor mediana (31,4%), sendo essa diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis; $p=0,01$). Considerando as variáveis de confusão, a taxa média de HTC em portadores do genótipo CC foi 8,86% menor que em portadores de TT (IC 95%: 1,85 – 15,87; $p=0,015$). Todavia, não houve diferença significativa entre TT e CT ($p=0,514$).

Em resumo, os resultados sugerem uma forte associação entre o polimorfismo T/C no gene de GPIb α e alterações nos níveis de Hb e HTC. Logo, pacientes carreadores do alelo C podem apresentar uma predisposição ao desenvolvimento de anemia na malária por *P. vivax*. No entanto, não foi observada influência do polimorfismo nos níveis plaquetários, ocorrência de trombocitopenia grave, ou valores do escore clínico (dados não mostrados).

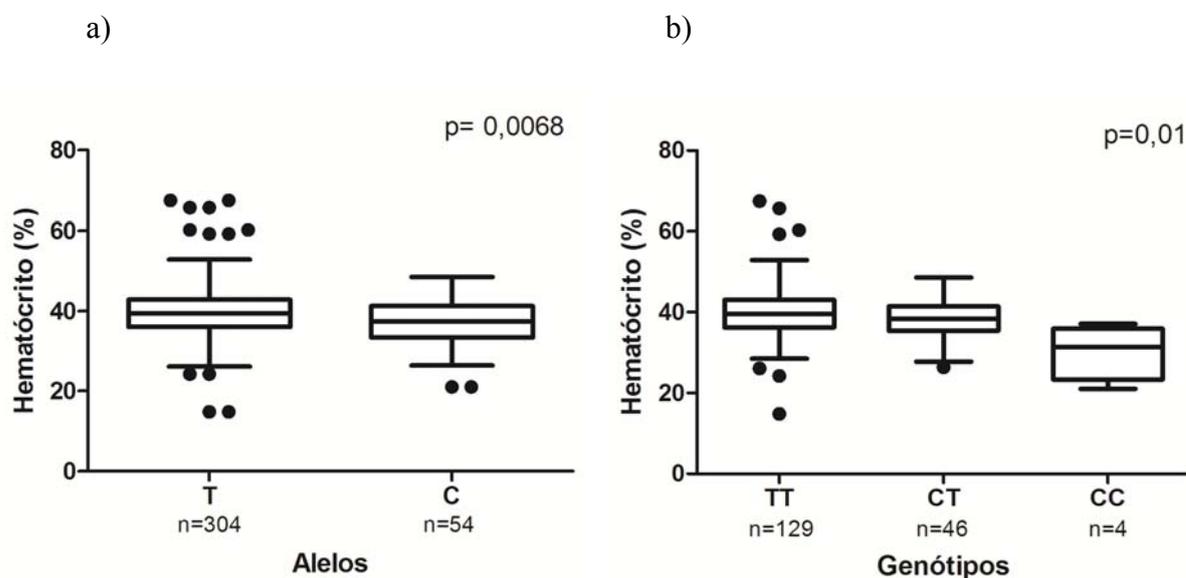


Figura 6: Associação entre hematócrito e o polimorfismo T/C de GPIb α . a) Efeito dos alelos de GPIb α sobre as taxas de hematócrito, sendo T o alelo selvagem e C o alelo mutado. b) Efeito dos genótipos de GPIb α sobre as taxas de hematócrito, sendo TT o genótipo homocigoto selvagem, CT o heterocigoto e CC o genótipo homocigoto mutado

5.2.3 Haplótipos formados por polimorfismos em genes de receptores plaquetários

Os genes que codificam GPIb α e a subunidade β 3 da integrina α IIb β 3 (Parte I dos Resultados) estão ambos localizados no cromossomo 17, com os polimorfismos estudados nesses genes, rs2243093 e rs5918, em desequilíbrio de ligação (DL) ($p= 0,00149$). Sendo assim, a partir da inferência dos haplótipos formados pelos polimorfismos nesses dois genes, foi possível analisar a influência dos mesmos na morbidade causada por *P. vivax*. O haplótipo T,T – que corresponde à combinação das variantes selvagens T em GPIb α e β 3 – foi o mais frequente entre os demais (79%). Em contrapartida, o haplótipo C,C foi o de menor frequência (2%). A tabela 6 mostra os possíveis haplótipos e suas respectivas frequências na população estudada.

A partir das análises estatísticas realizadas, porém, não foi verificada associação significativa entre os haplótipos formados por polimorfismos em genes de receptores plaquetários e os parâmetros clínicos ou hematológicos avaliados (dados não mostrados).

Tabela 6: Haplótipos para os polimorfismos de GPIb α e β 3

Genes	Polimorfismos	Haplótipos	Frequência, n. (%)
		T,T	207 (79)
GPIb α ,	rs2243093,	C,T	32 (12)
β 3	rs5918	T,C	19 (7)
		C,C	6 (2)

5.3 Variabilidade genética de componentes do inflamossoma

As genotipagens de 9 polimorfismos em 5 genes de componentes do inflamossoma (NLRP1, NLRP3, CARD8, IL-1 β e MEFV) foram feitas utilizando-se o Sistema TaqMan®, em colaboração com a Dra. Alessandra Pontillo (ICB-USP) – conforme especificado na Metodologia.

A fim de verificar uma associação entre os polimorfismos de componentes do inflamossoma e a morbidade ocasionada por *P. vivax*, analisou-se o efeito dos alelos, genótipos e haplótipos sobre os níveis de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, ocorrência de trombocitopenia grave e escore clínico.

5.3.1 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de NLRP1 e associação com a morbidade na malária por *P. vivax*

Ao todo, foram genotipadas aproximadamente 154 amostras para os polimorfismos de NLRP1 (rs12150220, rs2670660, rs34733791). A tabela 7 apresenta as frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos estudados no gene de NLRP1.

Tabela 7: Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos de NLRP1

Gene	Polimorfismo	Alelo	Frequência, n. (%)	
NLRP1	rs12150220	A	183 (59)	
		T	125 (41)	
		Genótipo		
		AA	58 (38)	
		AT	67 (43)	
		TT	29 (19)	
	rs2670660	Alelo		
		A	164 (54)	
		G	140 (46)	
		Genótipo		
		AA	43 (28)	
		AG	78 (51)	
		GG	31 (21)	
		rs34733791	Alelo	
			G	288 (94)
A	20 (6)			
Genótipo				
GG	134 (87)			
AG	20 (13)			
AA	0			

Com relação ao polimorfismo de NLRP1 A/T (rs12150220), o alelo A e o genótipo AT foram os mais frequentes (59% e 43%, respectivamente). Quando avaliado o efeito desse polimorfismo sobre os níveis de plaquetas, verificou-se que carreadores do alelo A apresentaram mediana equivalente a 98.000 plaquetas/mm³, ao passo que portadores do alelo T apresentaram mediana igual a 90.000/mm³ (Figura 7a). Essa diferença entre os alelos foi estatisticamente significativa (Teste de Mann-Whitney; p= 0,045). Observou-se, também, que portadores do genótipo AA apresentaram o maior valor mediano de plaquetas (106.000/mm³), enquanto carreadores do genótipo AT apresentaram a menor mediana (81.000/mm³), sendo essa diferença significativa (Teste de Kruskal-Wallis; p= 0,024) (Figura 7b). A análise de regressão confirmou a associação entre o polimorfismo A/T e menores níveis de plaquetas. Verificou-se, então, que o valor médio das plaquetas na presença do genótipo AT foi 22,7% menor que na presença de AA (IC 95%: 8 – 35; p= 0,005). No entanto, não houve diferença significativa entre AA e TT (p= 0,075).

Ainda para o polimorfismo NLRP1 A/T, foi observada também uma influência sobre os valores do escore clínico. Controlando pelas variáveis de confusão, portadores do alelo T tiveram aumento de 16% no escore clínico (IC 95%: 3,3 – 28,8; $p= 0,014$). Além disso, a presença dos genótipos AT e TT aumenta o valor médio dessa variável em, respectivamente, 21,9% (IC 95%: 1 – 46; $p= 0,036$) e 37,6% (IC 95% 9 – 73; $p= 0,007$), quando comparados ao genótipo AA. Em conjunto, os resultados demonstraram que o polimorfismo em questão está associado à baixa de plaquetas e a um aumento da morbidade, representado pelo aumento do escore clínico. Contudo, esse polimorfismo não apresentou influência significativa sobre os níveis de Hb, HTC ou sobre a ocorrência de trombocitopenia grave (dados não mostrados).

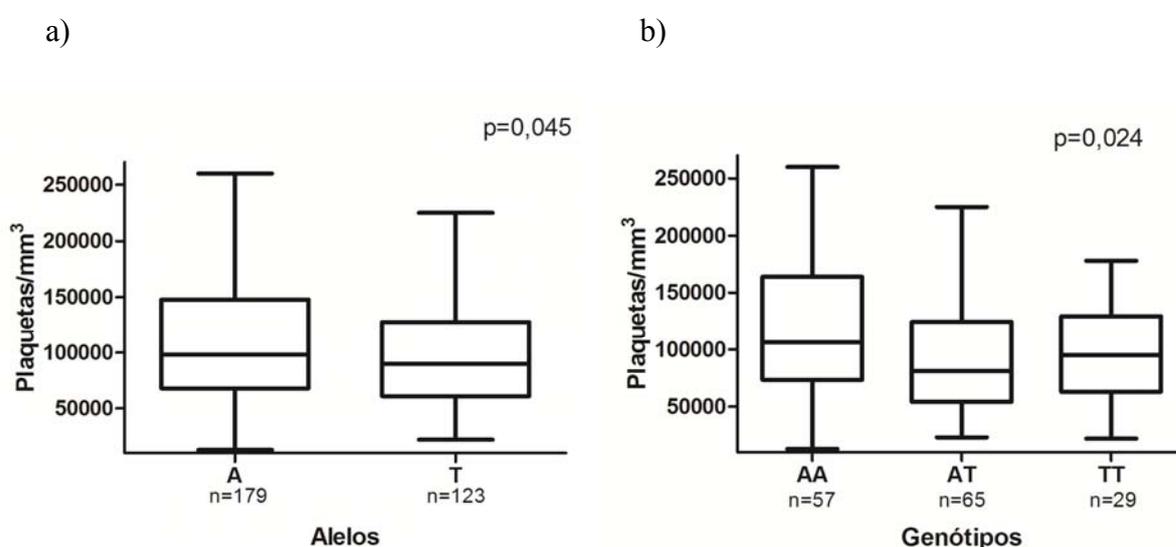


Figura 7: Associação entre níveis de plaquetas e o polimorfismo A/T de NLRP1 (rs12150220). a) Efeito dos alelos sobre níveis plaquetários, sendo T o alelo associado a menores níveis. b) Efeito dos genótipos sobre níveis de plaquetas, sendo AT o genótipo associado a menores níveis

Com relação ao segundo polimorfismo estudado de NLRP1 (rs2670660), o alelo A e o genótipo AG foram os mais frequentes na população (54% e 51%, respectivamente) (Tabela 7). Entre os parâmetros clínicos e hematológicos avaliados, observou-se que esse polimorfismo exerce influência sobre os níveis de Hb, sendo que em portadores do alelo G o valor médio foi 0,5 g/dL menor que em portadores do alelo A (IC 95%: 0,06 – 0,86; $p= 0,026$).

O polimorfismo de NLRP1 A/G (rs2670660) também apresentou associação com a trombocitopenia grave, sendo o genótipo AG um fator de risco para a ocorrência dessa manifestação (Figura 8). Controlando pelas variáveis de confusão, a chance de ocorrer trombocitopenia grave em carreadores do genótipo AG foi 6 vezes maior que em portadores do genótipo AA (IC 95%: 1,27 – 28,44; $p= 0,024$). Entretanto, não foi verificada diferença entre os genótipos AA e GG ($p= 0,448$). Em resumo, o polimorfismo de NLRP1 A/G demonstra estar associado a menores níveis de Hb e à ocorrência de trombocitopenia grave nos pacientes incluídos nesse estudo. Todavia, não foi observada influência desse polimorfismo sobre a taxa de HTC, níveis quantitativos de plaquetas e valores de escore clínico (dados não mostrados).

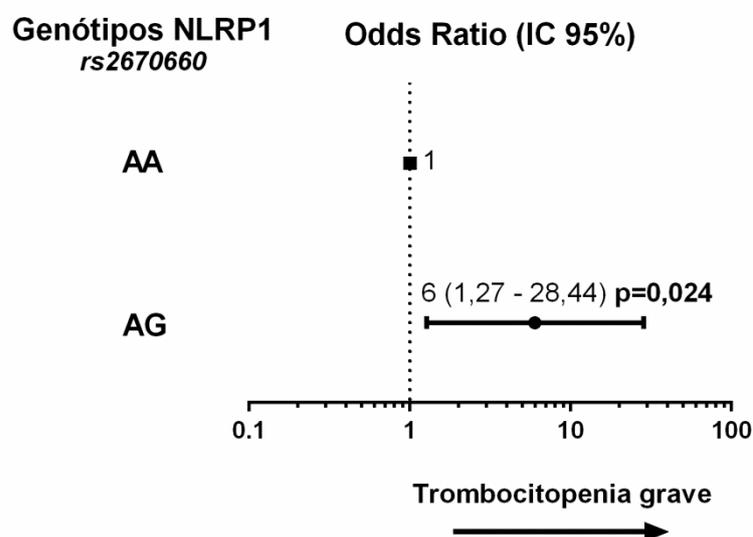


Figura 8: Efeito do polimorfismo de NLRP1 A/G sobre a ocorrência de trombocitopenia grave. O genótipo AG demonstra ser um fator de risco para a ocorrência de plaquetas menores ou iguais a $50.000/\text{mm}^3$ (trombocitopenia grave)

No que diz respeito ao terceiro polimorfismo de NLRP1 estudado (G/A, rs34733791), o alelo G e o genótipo GG foram os mais frequentes na população (94% e 87%, respectivamente) (Tabela 7). No entanto, não foi verificada associação entre esse polimorfismo e os parâmetros clínicos ou hematológicos analisados; a baixa frequência do alelo A na população estudada (6%) pode ter contribuído para esses achados.

5.3.2 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de NLRP3 e associação com a morbidade na malária por *P. vivax*

Ao todo, foram genotipadas aproximadamente 154 amostras para os polimorfismos de NLRP3 (rs10754558 e rs35829419). A tabela 8 apresenta as frequências alélicas e genóticas obtidas para os polimorfismos estudados no gene de NLRP3.

Tabela 8: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de NLRP3

Gene	Polimorfismo	Alelo	Frequência, n. (%)	
NLRP3	rs10754558	C	187 (62)	
		G	115 (38)	
		Genótipo		
		CC	59 (39)	
		CG	69 (46)	
		GG	23 (15)	
	rs35829419	Alelo		
		C	299 (98)	
		A	5 (2)	
		Genótipo		
CC		147 (97)		
	AC	5 (3)		
	AA	0		

No que diz respeito ao polimorfismo de NLRP3 C/G (rs10754558), o alelo C e o genótipo CG foram os mais frequentes na população estudada (62% e 46%, respectivamente). Quando analisados os níveis de Hb, HTC, plaquetas e escore clínico em função desse polimorfismo, não foram vistos resultados significativos (dados não mostrados). Entretanto, o efeito dos alelos sobre a ocorrência de trombocitopenia grave, apesar de não ter sido estatisticamente significativo na análise univariada ($p=0,2422$ – dados não mostrados), pôde ser observado na análise de regressão (Figura 9). Portanto, a chance de ocorrer trombocitopenia grave em carreadores do alelo G – alelo menos frequente – foi cerca de 2 vezes menor que em carreadores do alelo C ($p=0,032$). Esses achados sugerem, portanto, que o alelo G está relacionado à proteção no desenvolvimento de trombocitopenia grave associada à malária vivax.

Em se tratando do outro polimorfismo de NLRP3 estudado (rs35829419), o alelo C e o genótipo CC apresentaram as maiores frequências (98% e 97%, respectivamente) (Tabela 8). Devido à baixa frequência observada para o alelo A nessa população, não foi possível

verificar associação entre o polimorfismo C/A de NLRP3 e os parâmetros clínicos ou hematológicos analisados.

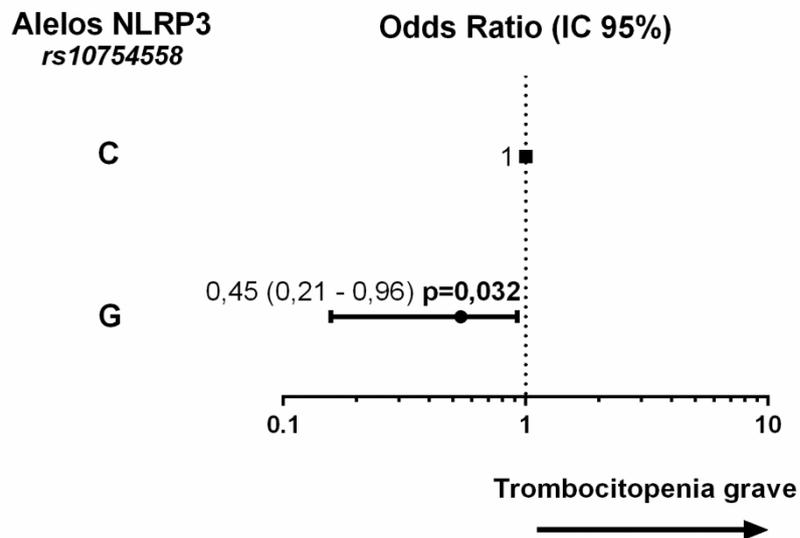


Figura 9: Efeito do polimorfismo de NLRP3 C/G (rs10754558) sobre a ocorrência de trombocitopenia grave. O alelo G demonstra ter papel protetor sobre a ocorrência de plaquetas menores ou iguais a $50.000/\text{mm}^3$ (trombocitopenia grave)

5.3.3 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de CARD8 e associação com a morbidade na malária por *P. vivax*

Ao todo, foram genotipadas aproximadamente 154 amostras para os polimorfismos de CARD8 (rs2043211 e rs6509365). A tabela 9 apresenta as frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos estudados no gene de CARD8.

Tabela 9: Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos de CARD8

Gene	Polimorfismo	Alelo	Frequência, n. (%)
CARD8	rs2043211	A	180 (69)
		T	82 (31)
		Genótipo	
		AA	64 (49)
		AT	52 (40)
	TT	15 (11)	
	rs6509365	Alelo	
		A	194 (63)
		G	114 (37)
		Genótipo	
AA		58 (38)	
AG	78 (51)		
GG	18 (11)		

Com relação ao polimorfismo A/T de CARD8 (rs2043211), o alelo A e o genótipo AA apresentaram as maiores frequências na população de estudo (69% e 49%, respectivamente). Quando foi analisada a influência desse polimorfismo sobre as variáveis hemoglobina (Hb), plaquetas, ocorrência de trombocitopenia grave e escore clínico, não foi observada associação significativa (dados não mostrados). No entanto, o efeito dos alelos sobre o hematócrito (HTC), apesar de não ter sido estatisticamente significativo na análise univariada ($p=0,1952$ – dados não mostrados), pôde ser observado na análise de regressão. Verificou-se então que, em portadores do alelo T, a taxa média de HTC foi cerca de 2% menor que em portadores do alelo A (IC 95%: 0,44 – 3,26; $p=0,01$), demonstrando uma associação entre o alelo menos frequente (T) e baixo valor de HTC. Além disso, quando analisado o efeito dos genótipos sobre HTC, controlando pelas variáveis de confusão, observou-se que a taxa média desse parâmetro para carreadores do genótipo AT foi 2,15% menor que para portadores de AA (IC 95%: 0,4 – 3,92; $p=0,018$). Entretanto, não houve diferença significativa entre TT e AA ($p=0,343$).

No que diz respeito ao segundo polimorfismo de CARD8 estudado (A/G, rs6509365), o alelo mais frequente na população foi o A (63%), assim como o genótipo AG, cuja frequência foi igual a 51%. Todavia, não foi observada associação entre esse polimorfismo e os parâmetros avaliados.

Com base nos dados apresentados, apenas o polimorfismo A/T de CARD8 (rs2043211) parece estar associado a menores taxas de HTC na malária por *P. vivax*.

5.3.4 Distribuição dos alelos e genótipos para os polimorfismos de IL-1 β e MEFV e associação com a morbidade na malária por *P. vivax*

Ao todo, foram genotipadas 123 amostras para o polimorfismo de IL-1 β (rs1143634) e 129 para o polimorfismo de MEFV (rs224204). A tabela 10 apresenta as frequências alélicas e genotípicas obtidas para esses polimorfismos.

Tabela 10: Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de IL-1 β e MEFV

Gene	Polimorfismo	Alelo	Frequência, n. (%)
IL-1 β	rs1143634	G	208 (85)
		A	38 (15)
		Genótipo	
		GG	88 (72)
		AG	32 (26)
		AA	3 (2)
MEFV	rs224204	Alelo	
		G	229 (89)
		A	29 (11)
		Genótipo	
		GG	100 (78)
		AG	29 (22)
		AA	0

Com relação ao polimorfismo G/A de IL-1 β (rs1143634), o alelo G foi o de maior frequência (85%), assim como o genótipo GG, que esteve presente em 72% dos indivíduos estudados. Quanto ao polimorfismo G/A de MEFV (rs224204), o alelo G foi o mais frequente (89%) e o genótipo GG esteve presente em cerca de 80% da população de estudo.

Assim como para todos os outros polimorfismos estudados, foi verificado o efeito dos alelos e genótipos sobre os níveis de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, ocorrência de trombocitopenia grave e escore clínico. Entretanto, não foi observada associação entre os polimorfismos de IL-1 β ou MEFV e os parâmetros considerados nesse estudo.

5.3.5 Haplótipos formados por polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma

Também para os polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma foi possível inferir os haplótipos e determinar suas frequências na população estudada. Foram definidos haplótipos para os genes de NLRP1, NLRP3 e CARD8. Com relação a NLRP1, os *loci* rs12150220 e rs2670660 estão em desequilíbrio de ligação (DL) ($p= 0,000$). No que diz respeito a CARD8, ambos os *loci* (rs2043211 e rs6509365) estão em DL ($p= 0,000$). Entretanto, não foi observado DL para os *loci* de NLRP3 estudados ($p= 0,675$). A tabela 11 mostra os principais haplótipos para componentes do inflamossoma e suas respectivas frequências.

Tabela 11: Haplótipos para os polimorfismos de NLRP1 (rs12150220, rs2670660 e rs34733791); NLRP3 (rs35829419 e rs10754558) e CARD8 (rs2043211 e rs6509365)

Gene	Polimorfismos	Principais haplótipos	Frequência, n. (%)
NLRP1	rs12150220, rs2670660, rs34733791	A,A,G	123 (41)
		T,G,G	98 (33)
		A,G,G	38 (13)
		T,A,G	22 (7)
		A,A,A	16 (5)
		T,G,A	3 (1)
NLRP3	rs35829419, rs10754558	C,C	178 (60)
		C,G	113 (38)
		A,C	5 (2)
CARD8	rs2043211, rs6509365	A,A	151 (59)
		T,G	79 (30)
		A,G	25 (10)
		T,A	3 (1)

Os haplótipo de NLRP1 mais frequente foi A,A,G (41%), seguido por T,G,G (33%). O haplótipo C,C de NLRP3 apresentou maior frequência (60%), assim como o haplótipo A,A de CARD8 (59%).

Quando se avaliou o efeito dos haplótipos de NLRP1 sobre níveis de plaquetas, pela análise univariada, foi observada uma possível associação entre essas duas variáveis ($p= 0,05$ – dados não mostrados). Com a análise de regressão realizada em seguida, verificou-se que o valor médio das plaquetas na presença do haplótipo A,A,G foi cerca de 20% maior do que na

presença do haplótipo T,G,G (IC 95%: 4 – 38; $p= 0,012$). O mesmo percentual foi observado quando comparados os demais haplótipos à variante T,G,G (IC 95%: 2 – 39; $p= 0,031$), sugerindo uma associação entre o haplótipo T,G,G e menores níveis plaquetários.

Além desse achado, os haplótipos para o gene de NLRP1 apresentaram um efeito significativo sobre o escore clínico, sendo que o maior valor da mediana foi observado para o haplótipo T,G,G (Teste de Kruskal-Wallis; $p= 0,017$), conforme ilustrado na figura 10. Controlando pelas variáveis de confusão, a presença do haplótipo A,A,G e dos demais diminui o valor médio do escore em, respectivamente 20,4% (IC 95%: 9 – 30; $p= 0,001$) e 18% (IC 95%: 5 – 29; $p= 0,007$), quando comparados ao haplótipo T,G,G.

Com base nos resultados expostos, o haplótipo T,G,G de NLRP1 parece estar relacionado a menores níveis plaquetários e a um aumento da morbidade na malária por *P. vivax*, representado pelo aumento do escore clínico. Todavia, não foi verificada associação entre os haplótipos de NLRP3, haplótipos de CARD8 e os parâmetros clínicos ou hematológicos avaliados (dados não mostrados).

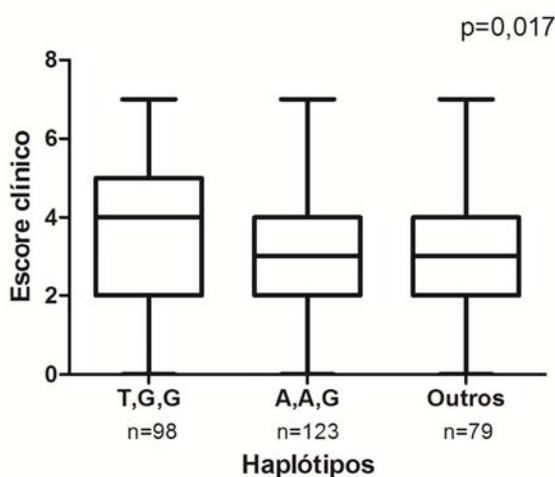


Figura 10: Efeito dos haplótipos para o gene de NLRP1 sobre o escore clínico

6 Discussão

Casos de malária grave por *P. vivax* em várias regiões do globo (Genton *et al.*, 2008; Tjitra *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2012) têm chamado a atenção da comunidade científica para os mecanismos patogênicos dessa doença, até o momento pouco conhecidos. Assim como as particularidades apresentadas pelo parasito, fatores próprios do hospedeiro podem influenciar o curso da infecção malárica e, portanto, as manifestações clínicas decorrentes da mesma (Andrade & Barral-Netto, 2011; De Mendonça *et al.*, 2012). Neste contexto, o presente trabalho investigou a associação entre a variabilidade genética do hospedeiro vertebrado e a morbidade na malária por *P. vivax*; com ênfase nos polimorfismos em genes de receptores de plaquetas e de componentes do inflamossoma, visto que a cascata de coagulação-inflamação parece contribuir para a patogenia da malária (Francischetti *et al.*, 2012).

A primeira hipótese avaliada foi a de que polimorfismos em genes de receptores plaquetários – que resultam em um ganho de função na adesão e/ou agregação das plaquetas – estão envolvidos com as alterações clínicas e hematológicas na malária por *P. vivax*, como a trombocitopenia. Dessa forma, o receptor plaquetário para colágeno – integrina $\alpha 2\beta 1$ – foi o primeiro a ser investigado, estando o polimorfismo C807T da subunidade $\alpha 2$ relacionado ao aumento da densidade da integrina na superfície das plaquetas. De fato, esse polimorfismo mostrou-se fortemente associado a baixos níveis plaquetários, visto que carreadores do genótipo TT apresentaram dez vezes mais chance de desenvolverem trombocitopenia grave (níveis de plaquetas iguais ou inferiores a $50.000/\text{mm}^3$). Apesar de não se conhecer o mecanismo que explique essa associação, diferentes achados sugerem que a malária vivax leva à intensa ativação do endotélio e inflamação (Yeo *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2010). Sendo assim, especula-se que o endotélio vascular lesionado, característico da infecção, potencializa as interações entre plaquetas e colágeno, principalmente em carreadores do alelo 807T, que apresentam maiores níveis do receptor $\alpha 2\beta 1$ na superfície de suas plaquetas. Consequentemente, é possível que nesses indivíduos ocorra uma ativação plaquetária mais intensa, induzida pela interação com o colágeno, que pode contribuir para o processo inflamatório nesses pacientes e o aparecimento de alterações clínicas.

Achados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que micropartículas derivadas de plaquetas (PMPs) estão correlacionadas a manifestações clínicas em pacientes infectados por *P. vivax* (Campos *et al.*, 2010). Tendo em vista que a ativação plaquetária leva à liberação de micropartículas no sangue e que essas microvesículas são mediadores inflamatórios em várias doenças (Boilard *et al.*, 2010; Balvers *et al.*, 2015), componentes relacionados a essa ativação, como a integrina de membrana $\alpha 2\beta 1$, também poderiam modular indiretamente os níveis de plaquetas e micropartículas. Entretanto, os mecanismos envolvidos

com a trombocitopenia na malária por *P. vivax* são pouco conhecidos e, dessa forma, nossos resultados iniciais sugerem que o estudo de receptores plaquetários pode auxiliar a esclarecer aspectos importantes dessa complicação clínica. Outro aspecto a ser investigado é o possível envolvimento dos receptores plaquetários na citoadesão de *P. vivax*, fenômeno recém-descrito e ainda pouco estudado (revisto por Costa *et al.*, 2011). De grande importância, trabalhos recentes sugerem que o acúmulo de *P. vivax* nos tecidos é um fenômeno mais expressivo em casos de malária vivax grave e está relacionado à inflamação sistêmica (Barber *et al.*, 2015).

Em paralelo ao estudo do polimorfismo na integrina $\alpha 2$, realizou-se a genotipagem do polimorfismo T1565C na integrina $\beta 3$ que, quando complexada à subunidade αIIb , é capaz de se ligar ao fibrinogênio e promover a agregação plaquetária (Bennett *et al.*, 2005). Todavia, não foi observada associação entre a variabilidade genética de $\beta 3$ e os parâmetros clínicos ou hematológicos avaliados. A ausência de associação, porém, não exclui um possível papel dessa integrina na patogenia da malária vivax, visto que outros polimorfismos no gene de $\beta 3$ podem estar relacionados às complicações da doença. Nesse sentido, seria interessante investigar outros polimorfismos relevantes para as funções da integrina $\beta 3$, em um grupo maior de pacientes.

A terceira glicoproteína incluída no estudo é denominada GPIb α , sendo sua ligação ao fator de von Willebrand (vWF) essencial para a adesão e ativação das plaquetas (López, 1994). O polimorfismo na sequência de Kozak do gene de GPIb α (T-5C) está relacionado à expressão desse receptor na membrana plaquetária e, conseqüentemente, a um ganho de função no fenômeno adesivo. Assim, tem sido sugerido que portadores do alelo C apresentam maiores níveis de GPIb α e são mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Afshar-Kharghan *et al.*, 1999). No presente trabalho, verificou-se que o polimorfismo em questão está associado a baixos níveis de hemoglobina (Hb) e hematócrito (HTC) em pacientes infectados por *P. vivax*. De grande relevância, nosso estudo é o primeiro a sugerir associação entre a variabilidade de um receptor plaquetário e a anemia na malária vivax.

Neste momento, pode-se apenas especular os mecanismos pelos quais a maior expressão de GPIb α poderia influenciar na anemia causada por *P. vivax*. Trabalhos investigando mecanismos moleculares envolvidos na patogenia dessa doença demonstraram que os níveis de vWF em sua forma ativa (ligado a GPIb α) estão elevados em pacientes com malária vivax (Mast *et al.*, 2009). Visto que níveis de vWF são conhecidos marcadores de perturbação endotelial, esses achados sugeriram mais uma vez que a perturbação do endotélio

não é um fenômeno restrito a *P. falciparum* (Mast *et al.*, 2009). De interesse, formas ultra-longadas de vWF são altamente reativas com as plaquetas e, portanto, promovem intensa ativação e adesão plaquetária, principalmente em regiões de dano tecidual (Dong *et al.*, 2003). Por outro lado, apesar dos mecanismos relacionados à anemia na malária vivax apresentarem questões em aberto, um trabalho recente em malária por *P. falciparum* demonstrou que a ativação do complemento está associada à hemofagocitose, podendo levar à anemia nos pacientes infectados (Dasari *et al.*, 2014). Portanto, nossa hipótese é a de que a maior atividade de vWF nos portadores do alelo C para o polimorfismo de GPIIb α (T-5C) poderia levar à anemia, em um mecanismo dependente do complemento. Isto porque achados recentes demonstraram que vWF é capaz de modular a ativação/desativação da cascata do complemento (Feng *et al.*, 2015). No entanto, estudos futuros, inclusive com pacientes apresentando malária grave, são necessários para testar essa hipótese.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a variabilidade genética de receptores plaquetários está envolvida com as complicações clínicas mais frequentes em pacientes infectados por *P. vivax*, particularmente trombocitopenia grave e anemia. Devido à importância desses achados, são necessários estudos prospectivos incluindo um maior número de amostras.

Tendo em vista o caráter inflamatório da infecção malárica, a segunda hipótese investigada foi a de que polimorfismos em genes de componentes do inflamossoma, tais como NLRP1, NLRP3, CARD8, IL-1 β e MEFV, estão associados à morbidade em pacientes infectados por *P. vivax*. Em resumo, os sensores moleculares que compõem os inflamossomas são capazes de detectar uma série de padrões relacionados a patógenos e dano tecidual. Esses sensores são reconhecidos pela capacidade de promover uma resposta inflamatória robusta, por meio da ativação de caspase (Latz *et al.*, 2013).

No presente trabalho, verificou-se uma associação entre o polimorfismo de NLRP1 (A/T, rs12150220) e os níveis plaquetários dos pacientes estudados, estando o alelo T relacionado a menores níveis de plaquetas e também ao aumento do escore clínico, indicador de morbidade. De fato, o alelo T foi recentemente associado ao desenvolvimento da pré-eclampsia – doença multifatorial caracterizada, entre outros fatores, pela inflamação sistêmica – em gestantes (Pontillo *et al.*, 2014). A partir de nossas análises, foi verificado, portanto, que o valor médio das plaquetas em portadores do genótipo AT é significativamente menor que em portadores do genótipo AA. Todavia, não houve diferença significativa entre AA e TT. Como as análises estatísticas iniciais seguiram o modelo de herança codominante, se forem

combinados os genótipos AT e TT e comparados a AA, é possível que se observe diferença nos níveis plaquetários dos grupos. Tendo em vista que o polimorfismo A/T de NLRP1 está relacionado a um aumento na secreção de IL-1 β (Levandowski *et al.*, 2013), é possível especular que essa variação esteja de fato associada à função alterada de NLRP1, predispondo os carreadores do alelo T a um processo inflamatório mais intenso e à baixa de plaquetas.

No que diz respeito ao segundo polimorfismo estudado de NLRP1 (A/G, rs2670660), o mesmo mostrou-se associado a menores níveis de Hb e à ocorrência de trombocitopenia grave, confirmando a importância da variabilidade genética de NLRP1 nas manifestações clínicas de pacientes com malária vivax. De forma semelhante, um estudo acerca de doenças autoimunes da tireoide verificou que portadores do alelo G apresentam susceptibilidade ao desenvolvimento dessas patologias (Alkhateeb *et al.*, 2013). O terceiro polimorfismo analisado para NLRP1 (G/A, rs34733791) não foi associado aos parâmetros clínicos e hematológicos avaliados. No entanto, quando analisados os haplótipos para os três polimorfismos de NLRP1, observou-se que o haplótipo T,G,G está relacionado a uma significativa redução do número de plaquetas e a um aumento do escore clínico. Esse achado não necessariamente inclui uma associação entre o polimorfismo rs34733791 e esses parâmetros, mas ressalta o efeito dos polimorfismos A/T e A/G sobre as manifestações clínicas decorrentes da infecção por *P. vivax* nos indivíduos estudados.

Com relação ao gene de NLRP3, verificou-se que a chance de ocorrer trombocitopenia grave em carreadores do alelo G para o polimorfismo C/G (rs10754558) foi cerca de duas vezes menor que em portadores do alelo C. De fato, um estudo bastante recente acerca da infecção por HTLV-1 mostrou que o genótipo GG para esse polimorfismo de NLRP3 estava associado a um perfil protetor (Kamada *et al.*, 2014). Curiosamente, na infecção pelo vírus da dengue, foi observada a ativação de NLRP3 em plaquetas e posterior liberação de IL-1 β por meio das micropartículas (Hottz *et al.*, 2013). Tendo em vista a estreita relação entre plaquetas, micropartículas e a infecção por *P. vivax*, esses achados abrem novos caminhos para a investigação do papel do inflamossoma NLRP3 na morbidade associada à malária vivax (trabalho em andamento).

A proteína CARD8, que contém um domínio de recrutamento de caspase, apresenta uma função regulatória na liberação de IL-1 β (Ito *et al.*, 2014). Consequentemente, o polimorfismo A/T (rs2043211) no gene dessa proteína tem sido associado ao aumento do risco e da gravidade de inflamações crônicas (Kastbom *et al.*, 2008). Nossos dados sugeriram uma relação entre esse polimorfismo e menores taxas de HTC em pacientes infectados por *P.*

vivax. De relevância, o polimorfismo A/T resulta em uma proteína truncada e, por conseguinte, na perda da inibição de caspase-1 mediada por CARD8 (Asfaw-Idosa *et al.*, 2014). O prejuízo na inibição, por sua vez, pode acarretar em maiores níveis de IL-1 β e exacerbação do processo inflamatório, possibilitando o surgimento de alterações clínicas e hematológicas, como a baixa de HTC.

Finalmente, nas nossas condições, os polimorfismos estudados de IL-1 β e MEFV não tiveram efeito significativo sobre os parâmetros avaliados. A baixa frequência de indivíduos homocigotos mutados na população de estudo pode ter contribuído para esses achados, o que não exclui a possibilidade de outros polimorfismos em ambos os genes estarem envolvidos com a susceptibilidade às manifestações clínicas da malária *vivax*.

Os resultados a respeito da variabilidade genética em componentes do inflamossoma aqui apresentados, apesar de iniciais, são bastante promissores e, dessa forma, seria interessante realizar um estudo mais aprofundado incluindo um maior número de amostras. Todavia, nossos achados sugerem a importância do estudo dessas plataformas moleculares na malária *vivax*, a fim de melhor compreender os mecanismos inflamatórios e patogênicos associados a essa doença.

7 Conclusões

Os resultados obtidos ao final deste trabalho permitiram concluir que:

1. Indivíduos carreadores do genótipo TT para o polimorfismo C807T da integrina $\alpha 2$ apresentam maior susceptibilidade à trombocitopenia grave induzida por *P. vivax*;
2. O polimorfismo da glicoproteína GPIb α (T-5C) mostrou-se fortemente associado a alterações nos níveis de hemoglobina e hematócrito. Logo, pacientes carreadores do alelo C podem apresentar uma predisposição ao desenvolvimento de anemia na malária por *P. vivax*;
3. Os polimorfismos A/T (rs12150220) e A/G (rs2670660) de NLRP1 estão relacionados a alterações clínicas e hematológicas observadas em pacientes com malária vivax, especialmente a baixos níveis de plaquetas e hemoglobina;
4. O haplótipo T,G,G de NLRP1 está relacionado a menores níveis plaquetários e a um aumento da morbidade na malária por *P. vivax* (representado pelo aumento do escore clínico), sugerindo a importância de NLRP1 para as complicações decorrentes dessa doença;
5. Indivíduos carreadores do alelo G para o polimorfismo C/G (rs10754558) de NLRP3 são menos susceptíveis ao desenvolvimento de trombocitopenia grave associada à malária vivax;
6. O polimorfismo A/T (rs2043211) de CARD8 está associado a menores taxas de hematócrito em pacientes com malária vivax, sendo a presença do alelo T um fator de risco para a ocorrência dessa alteração hematológica.

8 Referências Bibliográficas

- Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, López JA. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Iba α gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood*. 1999;94(1):186–91.
- Aggrey A, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2013;190(9):4685–91.
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Mourao MP, Lacerda M V, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1611–4.
- Alkhateeb A, Jarun Y, Tashtoush R. Polymorphisms in NLRP1 gene and susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*. 2013;46:215–21.
- Andrade B, Barral-Netto M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:70–8.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM a, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010;9:13.
- Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis*. 2007;195:589–96.
- Asfaw-Idosa B, Sahdo B, Balcha E, Kelly A, Söderquist B, Särndahl E. C10X polymorphism in the CARD8 gene is associated with bacteraemia. *Immunity, Inflamm Dis*. 2014;2(1):13–20.
- Ataide MA, Andrade WA, Zamboni DS, Wang D, Souza MDC, Franklin BS, et al. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog*. 2014;10(1):e1003885.
- Balvers K, Curry N, Kleinveld DJ, Böing AN, Nieuwland R, Goslings JC JN. Endogenous Microparticles Drive the Pro-Inflammatory Host Immune Response in Severely Injured Trauma Patients. *Shock*. 2015.
- Barber BE, William T, Grigg MJ, Parameswaran U, Piera K a, Price RN, et al. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog*. 2015;11(1):e1004558.
- Bennett JS. Review series Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3363–9.
- Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010;327:580–3.
- Campos FMF, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho ALS, de Paula SCO, Fontes CJ, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2010;9(1):327.

- Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira P a, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010;202(4):638–47.
- Ceravolo IP, Souza-Silva F a, Fontes CJF, Braga EM, Madureira a P, Krettli a U, et al. Inhibitory properties of the antibody response to Plasmodium vivax Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol*. 2008;67(3):270–8.
- Clemetson KJ. The role of platelets in defence against pathogens. *Hamostaseologie*. 2011;31(4):264–8.
- Coelho HCC, Lopes SCP, Pimentel JPD, Nogueira P a, Costa FTM, Siqueira AM, et al. Thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS One*. 2013;8(5):e63410.
- Collins WE, Jeffery GM, Roberts JM. A retrospective examination of anemia during infection of humans with Plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:410–2.
- Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BAM, Gomes LT, Fontes CJF, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(1):21–8.
- Costa F, Lopes S, Ferrer M. On cytoadhesion of Plasmodium vivax: raison d'être? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:79–84.
- Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.*; 2012;42(12):1099–105.
- Cunnington AJ, Riley EM, Walther M. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *Trends in Parasitology*. 2013. p. 585–92.
- D'Acromont V, Landry P, Mueller I, Pécoud A, Genton B. Clinical and laboratory predictors of imported malaria in an outpatient setting: An aid to medical decision making in returning travelers with fever. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:481–6.
- Dasari P, Fries A, Heber SD, Salama A, Blau I-W, Lingelbach K, et al. Malarial anemia: digestive vacuole of Plasmodium falciparum mediates complement deposition on bystander cells to provoke hemophagocytosis. *Med Microbiol Immunol*. 2014;203(6):383–93.
- Davis BK, Wen H, Ting JP-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707–35.
- De Mendonça VRR, Goncalves MS, Barral-Netto M. The host genetic diversity in malaria infection. *J Trop Med*. 2012:940616.
- Doeuvre L, Plawinski L, Toti F, Anglés-Cano E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J Neurochem*. 2009;110(2):457–68.

- Dondorp AM, Ince C, Charunwatthana P, Hanson J, van Kuijen A, Faiz MA, et al. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *J Infect Dis.* 2008;197:79–84.
- Dong J, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 2003;278(32):29633–9.
- Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One.* 2009;4.
- Douglas NM, Anstey NM, Buffet P a, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. *Malar J.* 2012;11:135.
- Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(39):E4110–8.
- El-Assaad F, Wheway J, Hunt NH, Grau GER, Combes V. Production, fate and pathogenicity of plasma microparticles in murine cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2014;10(3):e1003839.
- Faille D, Combes V, Mitchell AJ, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi M-C, et al. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J.* 2009;23:3449–58.
- Faustin B, Lartigue L, Bruet JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation. *Mol Cell.* 2007;25:713–24.
- Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PIA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1142–7.
- Feng S, Liang X, Kroll MH, Chung DW, Afshar-Kharghan V. Von Willebrand Factor is a cofactor in complement regulation. *Blood.* 2015.
- Floyd CN, Mustafa A, Ferro A. The PIA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(7):e101518.
- Francischetti IMB, Oliveira CJ, Ostera GR, Yager SB, Debierre-Grockiego F, Carregaro V, et al. Defibrotide interferes with several steps of the coagulation-inflammation cycle and exhibits therapeutic potential to treat severe malaria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(3):786–98.
- Franklin BS, Vitorino BLF, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos MLS, Campos FMF, et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of Plasmodium vivax malaria. *PLoS One.* 2011;6(5):e19842.
- Frevert U. Sneaking in through the back entrance: The biology of malaria liver stages. *Trends in Parasitology.* 2004. p. 417–24.

- Geldhoff M, Mook-Kanamori BB, Brouwer MC, Valls Seron M, Baas F, van der Ende A, et al. Genetic variation in inflammasome genes is associated with outcome in bacterial meningitis. *Immunogenetics*. 2013;65(1):9–16.
- Genton B, D’Acromont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008;5(6):e127.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Coleman LD, Pham Y, Cooke GE, Shear WS, Weiss EJ, et al. Higher prevalence of GPIIIa PI(A2) polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:1223–9.
- Good MF, Xu HJ, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immuneresponses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:69–99.
- Griffith JW, Sun T, McIntosh MT, Bucala R. Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. *J Immunol*. 2009;183:5208–20.
- Guerra C a, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e774.
- Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nature Immunology*. 2012. p. 321–4.
- Hesker PR, Nguyen M, Kovarova M, Ting JPY, Koller BH. Genetic Loss of Murine Pypin, the Familial Mediterranean Fever Protein, Increases Interleukin-1 β Levels. *PLoS One*. 2012;7.
- Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013;122(20):3405–14.
- Huizinga EG, Tsuji S, Romijn R a P, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, et al. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 2002;297(5584):1176–9.
- Ishida F, Ito T, Takei M, Shimodaira S, Kitano K. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib a with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism , and its relationship with coronary artery disease. *Br J Haematol*. 2000;111(4):1247–9.
- Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. *Arthritis Research & Therapy*. 2014;16(1):R52.
- Jiménez S, Tàssies D, Espinosa G, García-Criado a, Plaza J, Monteagudo J, et al. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(6):835–40.

- Kamada AJ, Pontillo A, Guimarães RL, Loureiro P, Crovella S, Brandão LAC. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):960–3.
- Kano FS, Sanchez B a M, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012;17(8):989–1000.
- Kastbom A, Verma D, Eriksson P, Skogh T, Wingren G, Söderkvist P. Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(4):415–7.
- Kochar DK, Das A, Kochar A, Middha S, Acharya J, Tanwar GS, et al. Thrombocytopenia in Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets*. 2010;21:623–7.
- Kraft P, De Meyer SF, Kleinschnitz C. Next-generation antithrombotics in ischemic stroke: preclinical perspective on “bleeding-free antithrombosis”. *J Cereb Blood Flow Metab*. Nature Publishing Group; 2012;32(10):1831–40.
- Krotoski WA, Garnham PCC, Cogswell FB, Collins WE, Bray RS, Gwasz RW, et al. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. IV. Pre-erythrocytic schizonts and/or hypnozoites of Chesson and North Korean strains of Plasmodium vivax in the chimpanzee. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35:263–74.
- Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood*. 1997;89:1939–43.
- Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre M a a, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012;11:12.
- Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: Who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011. p. 52–63.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):397–411.
- Leal-Santos F a, Silva SBR, Crepaldi NP, Nery AF, Martin TOG, Alves-Junior ER, et al. Altered platelet indices as potential markers of severe and complicated malaria caused by Plasmodium vivax: a cross-sectional descriptive study. *Malar J*. 2013;12:462.
- Lee W-C, Malleret B, Lau Y-L, Mauduit M, Fong M-Y, Cho JS, et al. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood*. 2014;123(18):e100–9.
- Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β

- processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:2952–6.
- Lopes SCP, Albrecht L, Carvalho BO, Siqueira AM, Thomson-Luque R, Nogueira PA, et al. Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *J Infect Dis*. 2014;209(9):1403–7.
- López JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994;5:97–119.
- Love MS, Millholland MG, Mishra S, Kulkarni S, Freeman KB, Pan W, et al. Platelet factor 4 activity against *P. Falciparum* and its translation to nonpeptidic mimics as antimalarials. *Cell Host Microbe*. 2012;12:815–23.
- Machado-Siqueira A, Lopes Magalhães BM, Cardoso Melo G, Ferrer M, Castillo P, Martín-Jaular L, et al. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1934.
- MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol*. 1985;119:385–401.
- Marín-Menéndez A, Bardají A, Martínez-Espinosa FE, Bôtto-Menezes C, Lacerda M V, Ortiz J, et al. Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4):e2155.
- Mast Q De, Groot E, Asih P. ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(3):492–8.
- McMorran BJ, Marshall VM, de Graaf C, Drysdale KE, Shabbar M, Smyth GK, et al. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science*. 2009;323:797–800.
- McMorran BJ, Wiczorski L, Drysdale KE, Chan J-A, Huang HM, Smith C, et al. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2012;338(6112):1348–51.
- Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):701–12.
- Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2013;12:69.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976;295:302–4.
- Morrell CN. Understanding platelets in malaria infection. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(5):445–9.

- Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lämmle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, et al. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: A case-control study. *Lancet*. 1999;353:351–4.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001;291:141–4.
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(9):555–66.
- Muley A, Lakhani J, Bhirud S, Patel A. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* Malaria: How Significant? *J Trop Med*. 2014:567469.
- O'Donnell J, Goldman JM, Wagner K, Ehinger G, Martin N, Leahy M, et al. Donor-derived *Plasmodium vivax* infection following volunteer unrelated bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*. 1998. p. 313–4.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil PP, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CCT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
- Pina-Costa A De, Brasil P, Santi SM Di, Araujo MP De, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFES, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):618–33.
- Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto J a T, Donadi E a, Crovella S, et al. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012a;45(4):271–8.
- Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJS. Polymorphisms in 'Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2012b. p. 121–5.
- Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, et al. NLRP1 L155H Polymorphism is a Risk Factor for Preeclampsia Development. *Am J Reprod Immunol*. 2014;1–5.
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax* malaria: Neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:79–87.
- Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet JL, Geddes BJ, Distefano PS, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277:13952–8.
- Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior JDC, Fonseca BDPFE, Antas PRZ, Baldez A, Storer FL, et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):154–62.
- Ru Y-X, Mao B-Y, Zhang F, Pang T, Zhao S, Liu J, et al. Invasion of erythroblasts by *Plasmodium vivax*: A new mechanism contributing to malarial anemia. *Ultrastructural pathology*. 2009. p. 236–42.

- Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:722–35.
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821–32.
- Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):644–61.
- Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009. p. 1759–66.
- Srivastava K, Cockburn IA, Swaim A, Thompson LE, Tripathi A, Fletcher CA, et al. Platelet factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2008;4:179–87.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313:1287–90.
- SVS Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. 2010.
- Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*. 2002;70:6524–33.
- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*. 2008;5(6):e128.
- Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*. 1994;145:1057–69.
- Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet*. 1997;350:1217–9.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu O, Dondorp AM, et al. Malaria. *Lancet*. 2013;383:723–35.
- WHO World Health Organization. World Malaria Report 2014. 2014.
- WHO World Health Organization. World Malaria Report 2009. 2009.
- Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Bailliere's Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13:277–99.
- Yeaman MR, Yount NY, Waring AJ, Gank KD, Kupferwasser D, Wiese R, et al. Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2007;1768:609–19.

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

Yusof R, Lau YL, Mahmud R, Fong MY, Jelip J, Ngian HU, et al. High proportion of knowlesi malaria in recent malaria cases in Malaysia. *Malar J.* 2014;13:168.