



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Estudo da influência do polimorfismo dos genes *KIR-  
HLA* na suscetibilidade à malária em população de  
área endêmica da Amazônia Legal, Porto Velho – RO**

***DAIANA DE SOUZA PERCE DA SILVA***

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***DAIANA DE SOUZA PERCE DA SILVA***

Estudo da influência do polimorfismo dos genes *KIR-HLA* na suscetibilidade à malária em população de área endêmica da Amazônia Legal, Porto Velho – RO

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dalma Maria Banic

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2015

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

S586 Silva, Daiana de Souza Perce da

Estudo da influência do polimorfismo dos genes KIR-HLA na suscetibilidade à malária em população de área endêmica da Amazônia Legal, Porto Velho-RO / Daiana de Souza Perce da Silva. – Rio de Janeiro, 2015.

xxi, 162 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 141-147

1. KIR. 2. Malária. 3. *P. vivax*. 4. *P. falciparum*. 5. Marcadores genéticos. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTORA: DAIANA DE SOUZA PERCE DA SILVA***

Estudo da influência do polimorfismo dos genes *KIR-HLA* na  
suscetibilidade a malária em população de área endêmica da  
Amazônia Legal, Porto Velho – RO

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dalma Maria Banic

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira - Presidente**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Alda Maria da Cruz**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Cardoso**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Cynthia Chester Cardoso**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Mello De Luca**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo da influência do polimorfismo dos genes KIR-HLA na suscetibilidade a malária em população de área endêmica da Amazônia Legal, Porto Velho – RO

### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

Daiana de Souza Perce da Silva

A malária é a doença parasitária que mais causa mortes em todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública. O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e as células NK são uma importante subpopulação de linfócitos atuantes na fase aguda da resposta imunológica na malária. O controle da ação das células NK se dá através de receptores de membrana, dentre os quais estão os receptores KIR que reconhecem moléculas HLA de classe I expressas pela maioria das células do organismo. Esses receptores, altamente polimórficos, desempenham função significativa no controle da resposta imune inata e adaptativa de cada indivíduo. Dentro deste contexto, nosso trabalho caracterizou geneticamente a frequência dos receptores KIR e seus ligantes HLA-I de indivíduos (n=377) naturalmente expostos à malária (Porto Velho - RO), verificando uma possível associação entre a presença desses genes e a infecção. Após a extração de DNA, a genotipagem da população estudada foi realizada através da técnica PCR-SSO e a leitura pelo equipamento Luminex. A ancestralidade da população foi estimada através da genotipagem de 32 marcadores informativos. Observamos uma maior frequência dos genes *KIR2DL1*, *3DL1*, *2DS4* e *2DL3* (>89% em todos), *HLA-C1*, *-Bw4* e *-C2* (>66% em todos) e os pares *KIR2DL2/3\_C1*, *KIR3DL1\_Bw4* e *KIR2DL1\_C2* (>66% em todos) na população de Porto Velho, que é semelhante às de outras regiões brasileiras. Caracterizamos 46 genótipos *KIR*, todos com distribuição cosmopolita. Os dois genótipos mais comuns em Porto Velho, os genótipos 1 e 2 estavam presentes em frequências semelhantes nas Américas. A presença do haplótipo Bx nos indivíduos parece exercer um papel de proteção à malária. Análise de Componentes Principais com base nas frequências dos genes *KIR* da população de Porto Velho mostrou uma relação mais próxima dos mestiços da Venezuela, dos hispânicos americanos e de uma população do sul do Paraná. A análise de ancestralidade revelou que houve maior contribuição dos ameríndios na nossa população. Esta análise destaca o perfil multiétnico da população de Porto Velho. Foram identificados pares de genes *KIR-HLA* que parecem exercer influência ou serem marcadores tanto de susceptibilidade (*KIR3DL2\_A3/A11*, *KIR2DS1\_C1/C2* e *KIR2DS2\_C1/C2*) quanto de proteção (*KIR3DL1\_Bw4*, *KIR2DS1\_C2/C2* e *KIR3DS1\_Bw4*) à malária. Nesse estudo pudemos observar uma associação entre algumas citocinas e quimiocinas e a média ponderada de genes *KIR* ativadores, pares *KIR-HLA* e os parâmetros epidemiológicos. Indivíduos com maior média ponderada de genes *KIR* ativadores possuíam elevados níveis plasmáticos de TNF-  $\alpha$ , IL-4, IL-10, MIP-1 $\beta$  e IL-6, os dois últimos observados na malária vivax. Dentre os pares ativadores observamos as seguintes associações: i) *KIR3DS1\_Bw4* com elevados níveis de IL-6; ii) *KIR2DS1\_C1C2* com elevados níveis de MIP-1 $\beta$  e IL-10; iii) *KIR2DS1\_C2C2* com baixos níveis

de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e com elevados níveis de MIP-1 $\beta$  e IL-6, esta última encontrada na malária vivax; iv) *KIR2DS2\_C1C1* com elevados níveis de IL-1 $\beta$  e IL-2, na malária vivax; v) *KIR2DS2\_C2C2* com elevados níveis de TNF- $\alpha$ . Dentre os pares inibidores observamos as seguintes associaes: i) *KIR3DL1\_Bw4* com baixos níveis de TNF- $\alpha$ , na malária vivax; ii) *KIR2DL1\_C1C2* com elevados níveis de MIP-1 $\beta$  e IL-6, na malária vivax e com baixos níveis de IFN- $\gamma$ ; iii) *KIR2DL2/3\_C1C2* com baixos níveis de IFN- $\gamma$  e elevados níveis de IL-10; iv) *KIR2DL2/3\_C1C1* com baixos níveis de IL-10 e elevados níveis de MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e MCP-1. Os dados obtidos nesse trabalho poderão contribuir para futuros estudos sobre o impacto funcional desses genes na regulao da resposta imune, na relao com a incidência e na evoluo clínica da doença não só na malária como de outras doenças infecciosas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Influence of polymorphisms of KIR-HLA genes in susceptibility to malaria in endemic areas  
population of the Legal Amazon, Porto Velho – RO

### **ABSTRACT**

#### **PhD THESIS**

**Daiana de Souza Perce da Silva**

Malaria remains one of the most important parasitic disease that causes more deaths in the world, representing a serious public health problem. However, the mechanisms involved in the pathogenesis and /or production of an effective immune response are still unclear. The innate immune system is the first line of defense against infection and NK cells are an important subpopulation of innate lymphoid cells in the acute phase of active immune response in malaria. The control of the action of NK cells is via membrane receptors, among which are the KIR receptors that recognize HLA class I molecules expressed by the majority of cells of the human body. These receptors, highly polymorphic, play a significant role in controlling innate and adaptive immune response of each individual. Within this context, our work characterized the genetic frequency of KIR receptors and their ligands HLA-I in subjects (n = 377) naturally exposed to malaria (Porto Velho - RO) and the association between the presence of these genes and infection. After DNA extraction, genotyping of the population was performed by PCR-SSO utilizing a Luminex equipment for reading. The ancestry of the population was estimated by the genotyping of 32 informative markers. We observed a higher frequency of the genes KIR2DL1, 3DL1, 2DS4 and 2DL3 (> 89% in all), HLA-C1, -Bw4 and -C2 (> 66% in all) and pairs KIR2DL2/3\_C1, KIR3DL1\_Bw4 and KIR2DL1\_C2 (> 66% in all) in the population of Porto Velho, which is similar to other Brazilian regions. We identified 46 KIR profiles, all with a cosmopolitan distribution. The two most common genotypes in the Porto Velho communities, genotypes 1 and 2, were present at similar frequencies as in the Americas. The Bx haplotype seems to play an important role in malaria protection. Principal component analysis based on the frequencies of the KIR genes placed the Porto Velho population closer to the Venezuela Mestizos, USA California Hispanic and Brazil Paraná Mixed in terms of KIR gene frequencies. The ancestry analysis revealed a greater contribution of Amerindians in our population. This analysis highlights the multiethnic profile of the Porto Velho population. Most of the individuals had at least one inhibitory KIR-HLA pair. The KIR2DL2/3\_C1, KIR3DL1\_Bw4 and KIR2DL1\_C2 pairs were the most common. KIR-HLA pairs seems to play a role in malaria susceptibility (KIR3DL2\_A3/A11, KIR2DS1\_C1/C2 and KIR2DS2\_C1/C2) and protection (KIR3DL1\_Bw4, KIR2DS1\_C2/C2 and KIR3DS1\_Bw4). In this study, we observed an association between some cytokines and chemokines and the weighted average of activating KIR genes, KIR-HLA pairs and epidemiological parameters. Individuals with higher weighted average of activating KIR genes had elevated plasma levels of TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, MIP-1 $\beta$  and IL-6, the last two only in vivax malaria. Among the pairs of activators, we observed the following associations: i) KIR3DS1\_Bw4 with high levels of IL-6; ii) KIR2DS1\_C1C2 with high levels of MIP-1 $\beta$  and IL-10; iii) KIR2DS1\_C2C2 with low levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and high levels

of MIP-1 $\beta$ , and IL-6, the last two only in vivax malaria; iv) KIR2DS2\_C1C1 with high plasma levels of IL-1 $\beta$  and IL-2, in vivax malaria; v) KIR2DS2\_C2C2 with high levels of TNF- $\alpha$ . Among the pairs of inhibitors, we observed associations of: i) KIR3DL1\_Bw4 with low levels of TNF- $\alpha$ ; ii) KIR2DL1\_C1C2 with high levels of MIP-1 $\beta$  and IL-6, in vivax malaria and low levels of IFN- $\gamma$ ; iii) KIR2DL2/3\_C1C2 with low levels of IFN- $\gamma$  and high levels of IL-10; iv) KIR2DL2/3\_C1C1 with low levels of IL-10 and high levels of MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MCP-1. Taken together, these results should provide baseline information that will be relevant to population evolutionary history, malaria and other diseases studies in populations of the Brazilian Amazon region.



# *Dedicatórias*

Aos meus pais **Lenir Perce** e **Vilma Souza**, meus exemplos de vida e principais incentivadores na conclusão de mais essa etapa da minha vida. Aqueles que me motivam a sempre aprender e fazer o meu melhor.

Ao meu irmão, **Dionatan Perce** pela amizade, amor, entusiasmo e que mesmo de longe consegue se manter sempre presente no meu coração.

Ao meu grande amor **Josué Lima Junior**, pelo carinho, companheirismo, dedicação e paciência. Uma pessoa admirável e certamente foi uma das melhores coisas que esses anos de Fiocruz me proporcionou.

Aos meus sogros, **Josué Lima** e **Margarida da Costa** por me alegrar em vários momentos, mas sem deixar de me apoiar e compreender os momentos difíceis.

**Amo todos vocês!**

A minha orientadora **Dra. Dalma Maria Banic** por todos os anos dedicados a construção da minha formação e por tornar este trabalho possível. Um profissional admirável, de atitudes éticas inquestionáveis, além de estar sempre presente em todos os momentos de que mais precisei.

Obrigada por tudo!!!

## Agradecimentos

Agradeço a Deus por permitir que o meu sonho se tornasse realidade. E também a todos os envolvidos na realização desse trabalho, deixando clara a inegável importância de cada um. Desse modo, sem seguir nenhuma ordem de importância e predileção, meu sincero obrigada:

A minha orientadora Dalma Banic, sem a qual meu estudo jamais teria sido possível. Obrigado pelos 10 anos de empenho, paciência, dedicação e ensinamentos.

A Dra Marilza Maia Herzog, chefe do Laboratório de Simulídeos, Oncocercose e Infecções Simpátricas: Mansonelose e Malária que proporcionou uma infra-estrutura ótima para o desenvolvimento do meu trabalho. Além disso, agradeço aqueles que são responsáveis por tornar a rotina diária muito mais alegre como o Arion Túlio, Carol Valente, Erika Nascimento, Michele Lafayette, Raquel Wainfas, Raquel Cesário, Rafael Vinícius, Samantha Paço, Sr Luna, Vinícius Prado, Vladimir Vale e Yara Leite. Mas em especial preciso agradecer aqueles responsáveis pelas minhas melhores gargalhadas e conversas, como a Raquel Pinna, Thaise Melo, Dante Januzi, Walesca Luz e Raquel Wainfas.

Ao grupo do Laboratório de Histocompatibilidade da UERJ, em especial ao Dr. Luis Cristovão e a Dra. Juliana Cardoso pela grandiosíssima colaboração que foram fundamentais na execução dos experimentos dessa tese.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves, do Centro de Pesquisa Clínica HIV/AIDS do INI- Fiocruz, pela preciosa contribuição e ávida disposição em me ajudar na parte estatística desta tese.

A Dra. Cynthia Chester Cardoso e a Msc. Tailah Almeida, do Laboratório de Virologia Molecular Animal da UFRJ, pela paciência e pela imensurável colaboração na análise dos marcadores de ancestralidade.

Aos pesquisadores Dra Joseli Oliveira Ferreira, Dr. Josué da Costa Lima Junior, Dra Dalma Banic e Dra Fátima Santos pela valiosa contribuição na coleta das amostras em Rondônia, cerne de todo este trabalho.

Gostaria de agradecer a meus grandes amigos, no qual cada um à sua maneira contribuíram por tornar minha vida muito mais divertida. Sendo assim, obrigado Luciene Aquino, Lilian Riccio, Evelyn Riccio, Paulo Totino, Cesare Bianco, Luanda Neto, Juan Camilo e Virgínia Pereira amigos que Fiocruz me deu de presente e que me influenciaram positivamente tanto na parte científica quanto na parte pessoal. Falando em parte pessoal, aproveito para agradecer a minha família e meus amigos extra-Fiocruz responsáveis por me alegrar e me apoiar, demonstrando compreensão com minhas eventuais ausências.

Preciso também agradecer ao CNPq e à FAPERJ por terem financiado meus estudos e o projeto de pesquisa, possibilitando o desenvolvimento desse trabalho. À Fundação Oswaldo Cruz, em especial à Pós-Graduação em Biologia Parasitária, por financiar, no que pode, a minha participação em congressos e nos trabalhos de campo. E aos membros da banca pela imensurável contribuição na avaliação desse trabalho.

Devo meus agradecimentos especiais ainda, a todos os voluntários do estudo que confiaram no nosso trabalho e por isso gentilmente aceitaram participar do projeto.

## Sumário

Lista de Tabelas .....	xvi
Lista de Figuras .....	xvii
Lista de Abreviaturas .....	xx
<b>1. Introdução .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Epidemiologia atual da malária no mundo .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2 Epidemiologia da malária no Brasil .....</b>	<b>27</b>
1.2.1 Aspectos históricos .....	27
1.2.2 Aspectos recentes.....	29
<b>1.3 Área endêmica brasileira de malária.....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Estado de Rondônia .....	33
1.3.2 Município de Porto Velho.....	35
<b>1.4 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp. ....</b>	<b>36</b>
<b>1.5 Fatores genéticos do homem relacionados à susceptibilidade e/ou resistência a malária.....</b>	<b>40</b>
<b>1.6 Aspectos gerais da resposta imune frente ao <i>Plasmodium</i> spp.....</b>	<b>42</b>
1.6.1 Células NK e seus receptores.....	47
1.6.2 Família dos receptores KIR e sua nomenclatura.....	49
1.6.3 Organização genética do KIR e sua extensa variabilidade.....	52
1.6.4 Interações entre receptores KIR e seus ligantes.....	56
1.6.5 Associação entre KIR e doenças.....	59
<b>1.7 Marcadores de ancestralidade .....</b>	<b>61</b>
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>63</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>64</b>
<b>4. Material e métodos .....</b>	<b>65</b>

4.1 Área estudada.....	65
4.2 Voluntários e Aspectos Éticos da Pesquisa.....	65
4.2.1 Critérios de elegibilidade .....	66
4.3 Coleta de sangue .....	67
4.4 Diagnóstico parasitológico e avaliação da parasitemia .....	68
4.5 Diagnóstico molecular do gênero <i>Plasmodium</i> e espécie infectante.....	69
4.5.1 Extração do DNA genômico.....	69
4.5.2 Identificação molecular do <i>Plasmodium</i> sp. nos indivíduos estudados.....	69
4.6 Tipagem dos genes KIR e seus ligantes HLA-I .....	71
4.6.1 Quantificação do DNA.....	71
4.6.2 Genotipagem do KIR e HLA de classe I .....	71
4.6.2.1 Amplificação do DNA genômico por PCR (Etapa 1) .....	72
4.6.2.2 Desnaturação/Neutralização (Etapa 2), Hibridização (Etapa 3) e Marcação com a SAPE (Etapa 4) .....	73
4.6.2.3 Leitura pelo equipamento Luminex (Etapa 5) .....	74
4.7 Análise da ancestralidade genética da população pela plataforma OpenArray®.....	75
4.8 Dosagem de níveis plasmáticos de múltiplas citocinas (Multiplex) dos indivíduos com malária.....	78
4.9 Análises estatísticas .....	79
<b>5. Resultados .....</b>	<b>82</b>
5.1 Características epidemiológicas da população estudada.....	82
5.2 Análise da presença dos genes KIR na população estudada .....	84
5.3 Perfil genético dos receptores KIR .....	86
5.4 Análise do componente principal (PCA) .....	87
5.5 Frequências dos ligantes de KIR na população estudada .....	89
5.6 Distribuição das frequências gênicas dos pares KIR-HLA (-A; -B e -C) na população estudada.....	89
5.7 Comparação dos dados obtidos entre nativos e migrantes.....	93
5.8 Perfil do grupo dos indivíduos infectados com malária.....	96
5.9 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas dos indivíduos com malária.....	97
5.10 Relação entre os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas, os pares KIR-HLA, média ponderada de genes ativadores e inibidores e os parâmetros epidemiológicos .	101

5.11 Relação entre os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas, parâmetros epidemiológicos e pares KIR-HLA com influência na proteção ou susceptibilidade à malária.....	113
6. Discussão .....	119
7. Conclusão .....	130
8. Referências .....	131
9. Anexos .....	149



## Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Condições da reação de PCR e da ciclagem das regiões alvos do diagnóstico molecular de malária.....	70
Tabela 4.2: Região alvo dos iniciadores utilizados no diagnóstico molecular, sequência nucleotídica dos iniciadores (senso e antisenso) e o respectivo tamanho do fragmento.....	70
Tabela 4.3: Condições da reação de PCR e da ciclagem das regiões alvos dos genes KIR e HLA de classe I .....	73
Tabela 4.4: Condições da reação de SSO .....	74
Tabela 4.5: Marcadores ( <i>SNPs</i> ) informativos de ancestralidade selecionados para o presente estudo.....	76
Tabela 5.1: Principais características epidemiológicas da população do estudo .....	83
Tabela 5.2: Distribuição da frequência de cada gene KIR na população de área endêmica brasileira de malária .....	85
Tabela 5.3: Perfil genotípico do KIR na população de área endêmica de malária .....	87
Tabela 5.4: Distribuição das frequências dos ligantes de KIR (genes HLA-A, -B e -C) na população de área endêmica brasileira de malária .....	89
Tabela 5.5: Distribuição das frequências dos genes KIR na presença do seu ligante HLA-I (pares KIR-HLA) na população de área endêmica brasileira de malária.....	90
Tabela 5.6: Modelos de regressão de Poisson para associação entres os pares KIR-HLA e incidência de malária.....	92
Tabela 5.7: Distribuição das frequências dos marcadores de susceptibilidade e proteção a malária nos grupos dos migrantes e nativos .....	94
Tabela 5.8: Principais características epidemiológicas dos indivíduos do grupo com malária.....	97
Tabela 5.9: Comparação dos níveis plasmáticos das citocinas e quimiocinas entre os controles, indivíduos na fase aguda e de convalescença e frequência de positivos .....	98
Tabela 5.10: Resumo das alterações detectadas entre as variáveis genéticas, epidemiológicas e o efeito observado nas citocinas e quimiocinas.....	118

## Lista de Figuras

Figura 1.1: Distribuição mundial da malária em 2013 .....	26
Figura 1.2: Série histórica da incidência de casos de malária .....	28
Figura 1.3: Histórico populacional de 1950 a 2014.....	29
Figura 1.4: Áreas de transmissão de malária no Brasil .....	31
Figura 1.5: A e B - Habitações de indivíduos residentes em área endêmica de Malária (Porto Velho – RO); C - Habitações próximas ao Rio Madeira em Porto Velho - RO.....	32
Figura 1.6: Resumo epidemiológico nacional dos casos de malária em 2014.....	33
Figura 1.7: Mapa do Brasil e em destaque o estado de Rondônia .....	34
Figura 1.8: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp. no hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado.....	39
Figura 1.9: Visão geral da resposta imune humoral e celular contra a malária.....	46
Figura 1.10: A regulação dinâmica da função efetora das células NK mediante a interação dos receptores ativadores e inibidores e seus respectivos ligantes HLA-I .....	48
Figura 1.11: Esquema da localização cromossômica das duas famílias gênicas que codificam os receptores de células NK.....	49
Figura 1.12: Estrutura esquemática dos receptores KIR .....	51
Figura 1.13: Nomenclatura dos genes KIR adotada pelo HUGO .....	52
Figura 1.14: Organização dos genes KIR.....	53
Figura 1.15: Organização do conjunto de genes KIR e representação dos haplótipos.....	56
Figura 1.16: Interações entre os receptores KIR e seus respectivos ligantes HLA-I ....	58
Figura 4.1: Área endêmica e população de área rural (“linhas”) do município de Porto Velho, Rondônia.....	66
Figura 4.2: Principais etapas da genotipagem dos genes KIR e HLA.....	72
Figura 4.3: Esquema representando uma lâmina de genotipagem por OpenArray®.....	77
Figura 4.4: Representação gráfica dos resultados da genotipagem do marcador rs1426654 através da metodologia Taqman®.....	78
Figura 5.1: Procedência dos indivíduos estudados.....	84
Figura 5.2: Perfil genotípico do KIR na população de área endêmica de malária.....	88
Figura 5.3: Ancestralidade dos indivíduos oriundos de área endêmica (nativos) e dos oriundos de área não endêmica (migrantes) .....	93
Figura 5.4: Distribuição dos genótipos do KIR.....	95

Figura 5.5: Alterações dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (A a F) .....	99
Figura 5.6: Alterações dos níveis plasmáticos de citocinas anti-inflamatórias (A a C) e quimiocinas (D e E) .....	100
Figura 5.7: (A) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ no D0 e D15 e a média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores. (B a D) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , a média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores e as variáveis epidemiológicas (TREA, NEPM e espécie plasmoidal) .....	102
Figura 5.8: Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , o par KIR2DL2/3_C1C1 e o tempo de residência em área endêmica .....	103
Figura 5.9: (A) Relação entre os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , o par KIR2DL1_C1C2 e o tempo de residência em área endêmica. (B) Relação entre os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , o par KIR2DL2/3_C1C2 e o tempo de residência em área endêmica .....	104
Figura 5.10: (A) e (B) Relação entre os níveis plasmáticos de IL1 $\beta$ e IL-2, o par KIR2DS2_C1C1 e a espécie plasmoidal infectante. (C) e (D) Relação entre os níveis plasmáticos de IL6, a média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores e o par KIR2DL1_C1C2 e a espécie plasmoidal infectante .....	106
Figura 5.11: (A), (B) e (C) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-10 (D0 e D15) e a média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores e os pares inibidores KIR2DL2/3_C1C2 e KIR2DL2/3_C1C1. (D) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-4 (D0 e D15) e a média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores .....	108
Figura 5.12: Relação entre os níveis plasmáticos de MCP-1 (D0 e D15) e o par KIR2DL2/3_C1C1 .....	109
Figura 5.13: (A), (B) e (C) Relação entre os níveis plasmáticos de MCP-1, o par inibidor KIR2DL2/3_C1C1 e parâmetros epidemiológicos .....	110
Figura 5.14: (A) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$ (D0 e D15) e média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores. (B), (C) e (D) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$ , a média ponderada de genes KIR ativadores e inibidores e parâmetros epidemiológicos .....	112
Figura 5.15: (A) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$ , o par inibidor KIR2DL2/3_C1C1 e o tempo de residência em área endêmica. (B) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$ , o par inibidor KIR2DL1_C2C2 e a espécie plasmoidal .....	113
Figura 5.16: (A) e (B) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ , o par ativador KIR2DS1_C2C2 e o tempo de residência em área endêmica. (C) e (D) Relação entre os	

níveis plasmáticos de IL-6 e MIP-1 $\beta$ , o par KIR2DS1_C2C2 e espécie plasmodial infectante. .....	115
Figura 5.17: (A) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-6, o par ativador KIR3DS1_Bw4 e espécie plasmodial infectante. (B) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , o par inibidor KIR3DL1_Bw4 e espécie plasmodial infectante .....	116
Figura 5.18: (A) e (B) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-10 (D0 e D15) e MIP-1 $\beta$ (D0 e D15) e o par ativador KIR2DS1_C2C2 .....	117

## Lista de Abreviaturas

**ADCI:** Inibição celular dependente de anticorpo  
**AIMs:** Marcadores Informativos de Ancestralidade (*Ancestry Informative Markers*)  
**ANOVA:** Análise de variância  
**BPM:** *Brazil Parana Mixed*  
**BPV:** *Brazilian Porto Velho*  
**CD4:** Molécula expressa na superfície de células T auxiliares e em subpopulações de células *NKT* e *NK*  
**CD8:** Molécula expressa na superfície de linfócitos T citotóxicos, e em subpopulações de células *NKT* e *NK*  
**CD16:** Receptor de células *NK*, neutrófilos, monócitos e macrófagos  
**CD94:** Receptor de células *NK* (também conhecida como KLRD1 - killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1)  
**CEMH:** *China Eastern Mainland Han*  
**CEP:** Comitê de Ética em Pesquisa  
**CJPH:** *China Jiangsu Province Han*  
**CpG:** Dinucleotídeo ou sítio citosina-fosfato-guanina  
**CZPH:** *China Zhejiang Province Han*  
**DAP12:** Adaptador proteico transmembrana 12 (DNAX activation protein of 12 kD)  
**DP:** Desvio padrão  
**DDT:** Diclorodifeniltricloroetano  
**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico  
**dNTP:** Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
**EDTA:** Ácido Etilenodiamino Tetra-acético  
**FG:** Frequência genotípica  
**HCV:** Vírus da Hepatite B (*Hepatitis B Virus*)  
**HCV:** Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C Virus*)  
**HKC:** *Hong Kong Chinese*  
**HIV:** Vírus da Imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)  
**HLA:** Antígenos Leucocitários Humanos (*Human Leucocyte Antigen*)  
**HUGO:** Organização Genoma Humano (*Human Genome Organization*)  
**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**IC:** Intervalo de Confiança  
**IEAA:** *Iran East Azerbaijan Azerbaijani*  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon-gama  
**IgG:** Imunoglobulina G  
**IL:** Interleucina  
**IMP:** *India Mumbai Parsi*  
**INCRA:** Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária  
**IND:** *Israel North Druze*  
**IPA:** Índice Parasitário Anual  
**ITIM:** Imunoreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*)  
**ITAM:** Imunoreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina (inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*)  
**J3:** *Japan pop3*  
**JK:** *Japan Kyoto*  
**JT:** *Japan Tokyo*  
**Kb:** Quilobase

**Km:** Quilômetro  
**KIR:** Receptores do tipo Imunoglobulina das Células Natural Killer (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*)  
**KLR:** Receptores semelhantes à lectina (*Killer Lectin-like receptors*)  
**LRC:** Complexo de Receptores Leucocitários (*Leukocyte Receptor Complex*)  
**LIR:** Receptores de leucócitos semelhantes à imunoglobulina (*Leukocyte Ig-like Receptor*)  
**MCP-1:** Proteína Quimiotática de Monócitos -1 (também conhecida como CCL2)  
**min:** Minutos  
**MIP-1 $\beta$ :** Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 $\beta$  (também chamada de CCL4)  
**mL:** Mililitros  
 **$\mu$ g:** Micrograma  
 **$\mu$ L:** Microlitros  
**MS:** Ministério da Saúde  
**N:** Número de amostras  
**np:** número de positivos  
**ng:** nanograma  
**NK:** célula *Natural killer*  
**NKC:** Complexo de Receptores NK (*NK receptor complex*)  
**NKG2:** Receptor de ativação de células *NK* (também conhecido como *CD159a*)  
**NKT:** célula T do tipo *Natural killer*  
**NO:** Óxido nítrico  
**OMS (WHO):** Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)  
**pb:** Pares de bases  
**PCA:** Análise por Componente Principal (*Principal Components Analysis*)  
**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
**pg:** picograma  
**PIACM:** Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária  
**PNCM:** Plano Nacional de Controle da Malária  
**PV:** Porto Velho  
**Pv:** *Plasmodium vivax*  
**Pf:** *Plasmodium falciparum*  
**RO:** Rondônia  
**S:** *Senegal*  
**SC2:** *Singapore Chinese pop2*  
**SIDA:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**SINAN:** Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
**SISMAL:** Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária  
**SIVEP:** Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica  
**SK:** *South Korea*  
**SNP:** Polimorfismos de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphisms*)  
**SSO:** Sondas de Oligonucleotídeos Sequência-Específicos (*Sequence-Specific Oligonucleotide*)  
**SVS:** Secretaria de Vigilância em Saúde  
**TA:** Temperatura ambiente  
**Th1:** Célula T *helper* do tipo 1  
**Th2:** Célula T *helper* do tipo 2  
**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**USACAA:** *USA California Asian American*  
**USACH:** *USA California Hispanic*  
**Vf:** Volume final  
**VM:** *Venezuela Mestizo*

## 1. Introdução

---

A malária é uma doença parasitária que acomete a população humana desde a mais remota antiguidade. Apesar da associação com a malária ser incerta, há relatos em escrituras chinesas, hindus e gregas de febres sazonais e intermitentes que relacionavam a doença à punição de deuses e presença de maus espíritos (França 2008; Bruce-Chwatt 1988). No século V a.C., Hipócrates, considerado o “pai da medicina” foi o primeiro a descartar tais superstições, relacionando a ocorrência de febres na população local à proximidade de corpos d’água estagnados (Neghina 2010). Embora escassos, os estudos acerca da origem da malária apontam que o seu surgimento está vinculado a primatas não humanos, na Etiópia, e desenvolvido com os hominídeos ancestrais se difundindo com sua migração. Tal migração seguiu inicialmente para as regiões tropicais, subtropicais e temperadas do Velho Mundo e posteriormente para o Novo Mundo, com missionários, exploradores e escravos (Neghina 2010; Hayet *al.*2002a; Hay *et al.*2002b). Nas Américas, há evidências que a malária por *Plasmodium vivax* tenha sido introduzida por ondas migratórias de habitantes asiáticos através do Estreito de Bering, enquanto que a malária por *Plasmodium falciparum* tenha sido introduzida posteriormente por meio de escravos trazidos da África, exploradores e colonizadores europeus (Taylor *et al.* 2013; Gerszten *et al.* 2012; Yalcindag *et al.* 2012).

Os vetores da malária são as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*. Os representantes deste gênero são considerados cosmopolitas e há cerca de 500 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do mundo. Contudo, somente algumas espécies possuem capacidade vetorial necessária para transmitir a doença sob condições naturais (Forattini 2002). O *Anopheles gambiae*, encontrado no continente africano, é a espécie que mais apresenta o conjunto de características fisiológicas e comportamentais que envolvem a capacidade vetorial. Dentre as quais, se destacam: densidade e sobrevivência do vetor, frequência de hematofagia e competência de transmitir o patógeno em combinação com as variáveis ambientais, sendo por isso considerada a espécie vetora mais eficiente do mundo (Killeen 2014; Sinka *et al.* 2012). No Brasil, as espécies de maior capacidade vetorial são: *An. darlingi*, vetor primário na maior parte do território brasileiro pela sua abundância, elevada antropofilia e

endofagia, além de ser capaz de carrear diferentes espécies de plasmódios; e *An. aquasalis*, vetor secundário, por sua elevada exofagia e baixa antropofilia (Rios-Velásquez *et al.* 2013).

A forma natural de transmissão da malária se dá através do repasto sanguíneo da fêmea do anofelino infectada com protozoários do gênero *Plasmodium*. A transmissão da malária também pode ocorrer a partir de transfusão de sangue infectado, de compartilhamento de agulhas, de transplante de órgãos e da gestante para o filho (malária congênita) (Reader *et al.* 2015; Jahja *et al.* 2014). Atualmente, são cinco as espécies que parasitam naturalmente o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo as três primeiras, as espécies prevalentes em território brasileiro (Rey 2013; White 2008).

Cada espécie de *Plasmodium* apresenta particularidades associadas à distribuição geográfica, patogenia e biologia. As espécies mais prevalentes no mundo são o *P. falciparum* e o *P. vivax* (Snow 2015). O *P. falciparum* é responsável por relevantes prejuízos à saúde pública, em virtude de sua alta virulência, provocando altas taxas de morbidade, mortalidade, além de apresentar multirresistência aos fármacos antimaláricos (Snow 2015). O *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo, sendo a principal causa de malária fora da África, afetando especialmente a Ásia e as Américas. Sua infecção é altamente debilitante, causando importantes perdas sócio-econômicas e atualmente há notificações de malária grave em diferentes cenários epidemiológicos mundiais (Dalrymple *et al.* 2015).

A infecção por *Plasmodium* spp. apresenta um estágio assintomático, extra-eritrocítico, que ocorre no fígado, seguido de um estágio sintomático, eritrocítico, momento em que ocorrem as manifestações clínicas da doença. Durante ambos os estágios da infecção malárica, o sistema imune do hospedeiro desenvolve uma potente resposta contra o parasito, causando alterações em quase todos os seus componentes. A ativação e a mobilização de elementos celulares necessários tanto na resposta imune inata quanto na adquirida resultam de interações complexas e de diferentes mecanismos efetores de imunidade. Embora sejam observados em soros de pacientes de área endêmica de malária, altos níveis de anticorpos para diferentes proteínas candidatas a



vacina, a imunidade protetora parece ser adquirida após várias exposições ao parasito durante um longo período de tempo (Doolan *et al.* 2009).

A resposta imune celular é considerada mais importante no controle do estágio hepático. Os hepatócitos expressam Antígenos Leucocitários Humanos (da sigla em inglês, HLA - *Human Leukocyte Antigen*) de classe I e essas células são alvos potenciais das células T citotóxicas em resposta a fase exoeritrocítica da infecção (Lyke *et al.* 2011). Além disso, diversos trabalhos sugerem que outros tipos celulares como as células *Natural Killer* (NK) e um subtipo de células T (NKT) atuem nesse controle principalmente através da produção de citocinas, como Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Wunderlich *et al.* 2014; Tse *et al.* 2011; McCall e Sauerwein 2010). As células NK e NKT expressam na sua superfície, Receptores do tipo Imunoglobulina das Células Natural Killer (da sigla em inglês *KIR - Killer Immunoglobulin-like Receptor*) que se ligam às moléculas HLA de classe I. A atividade das células NK resulta, dentre outros fatores, de um balanço da interação entre receptores KIR (ativadores e inibidores) e ligantes presentes nas moléculas HLA de classe I. Evidências sugerem que, na malária por *P. falciparum*, as células NK sejam as primeiras a serem ativadas quando células mononucleares são expostas a hemácias parasitadas (Hermsen *et al.* 2003). Desse modo, o extenso polimorfismo dos genes KIR e também dos genes HLA de classe I pode contribuir para a heterogeneidade de resposta das células NK, além de influenciar na evolução da doença e no desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

O interesse pelo estudo da família gênica dos receptores KIR tem aumentado nos últimos anos e muitos trabalhos vêm demonstrando sua eficiência como bons marcadores genéticos em estudos de associação com doenças. Além disso, esses genes são bastante utilizados em estudos populacionais para a compreensão da história biológica e evolutiva das populações (Augusto *et al.* 2015a). Desse modo, a avaliação das relações existentes entre os polimorfismos dos genes KIR são fatores importantes a serem considerados para uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro, e os resultados obtidos poderão auxiliar no delineamento de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos mais eficazes, visto que a eficácia desses pode variar em diferentes cenários epidemiológicos.

## **1.1 Epidemiologia atual da malária no mundo**

Apesar do progresso obtido pela Organização Mundial de Saúde (OMS ou, em inglês, WHO - *World Health Organization*) no combate à malária até finais da década de 70, atualmente ela é um dos mais sérios problemas mundiais de saúde pública. Em virtude de sua ocorrência estar localizada nas regiões tropicais e temperadas do planeta (Figura 1.1), a malária permanece como uma doença estritamente ligada à pobreza (Battle *et al.* 2012).

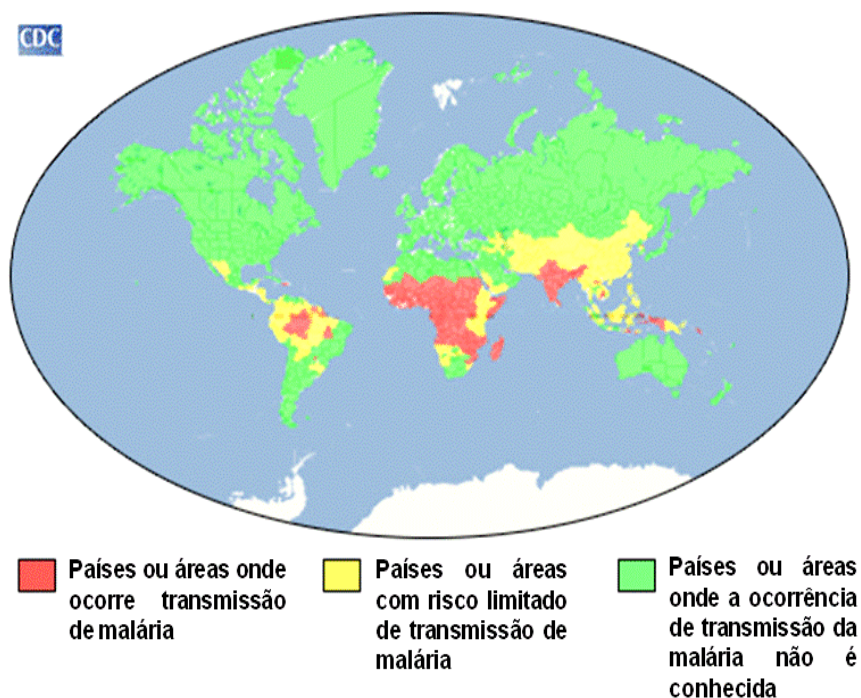
A notificação dos casos de malária, de modo geral, é subestimada tendo em vista a baixa qualidade dos sistemas de registro de informações em saúde. Estimativas da OMS indicam que 3,2 bilhões de pessoas em 97 países estão sob o risco de contrair malária. Em 2013, ocorreram aproximadamente cerca de 198 milhões de casos com 584 mil mortes em todo o planeta, sendo que a maioria destes ocorreram na África, e a maioria das mortes ocorre em crianças abaixo de 5 anos de idade (WHO, 2014). Mais de 90% dos casos estimados ocorrem em 18 países da África, como exemplo, República Democrática do Congo e Nigéria, que juntos respondem por 40% do total global de casos estimados. Os outros 10% estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e Ilhas Oceânicas.

A espécie *P. falciparum* é responsável por aproximadamente 80% do número total de casos no mundo, sendo a espécie de maior prevalência na África (WHO, 2014). Entretanto, nos últimos anos, a incidência de casos por essa espécie plasmodial vem diminuindo e a causa provável está relacionada tanto ao diagnóstico precoce quanto a características biológicas do *P. falciparum*. A espécie em questão gera gametócitos mais lentamente e, em geral antes mesmo de produzir a forma infectante para o vetor, o tratamento já foi administrado, controlando a doença e impedindo a continuidade do ciclo. Em contrapartida, a incidência de *P. vivax* vem diminuindo em taxas mais lentas, sugerindo que esta espécie reage mais devagar às medidas de controle empregadas, logo, os programas de controle da malária precisam dar um enfoque maior ao controle de *P. vivax* em países onde ambas as espécies são simpátricas (Alegana *et al.* 2014).

Atualmente, nas Américas, a malária é endêmica em 21 países e apesar da alta endemicidade, a maioria das áreas com taxa de transmissão estável coincide com baixas

densidades populacionais, diminuindo a contribuição deste continente como populações globais em risco. Os países e territórios endêmicos das Américas diferem em termos de: tamanho populacional, exposição do hospedeiro vertebrado ao vetor infectado, carga parasitária, impacto da geografia na transmissão e sucesso dos programas de controle. Além disso, dentro de um mesmo país ou território, algumas áreas podem apresentar transmissão contínua, outras podem estar em fase de controle ou eliminação e outras podem estar livres da doença, exigindo por isso abordagens direcionadas para cada situação epidemiológica.

As estratégias de controle pautadas na pulverização residual intradomiciliar, mosquiteiros impregnados com inseticida de longa duração, diagnóstico precoce e tratamento com medicamentos antimaláricos adequados, de acordo com a espécie plasmodial, vêm contribuindo com a redução do número de casos em todo o mundo, sobretudo nas Américas. Mas apesar dos resultados promissores, o Brasil ainda é o país que contribui com o maior número de casos de malária desse continente, sendo responsável por mais da metade do total de casos nas Américas (WHO, 2014).



**Figura 1.1:** Distribuição mundial da malária em 2013. Fonte: Adaptado de CDC - *Malaria's Impact in the Malaria-Endemic World*.

## **1.2 Epidemiologia da malária no Brasil**

### **1.2.1 Aspectos históricos**

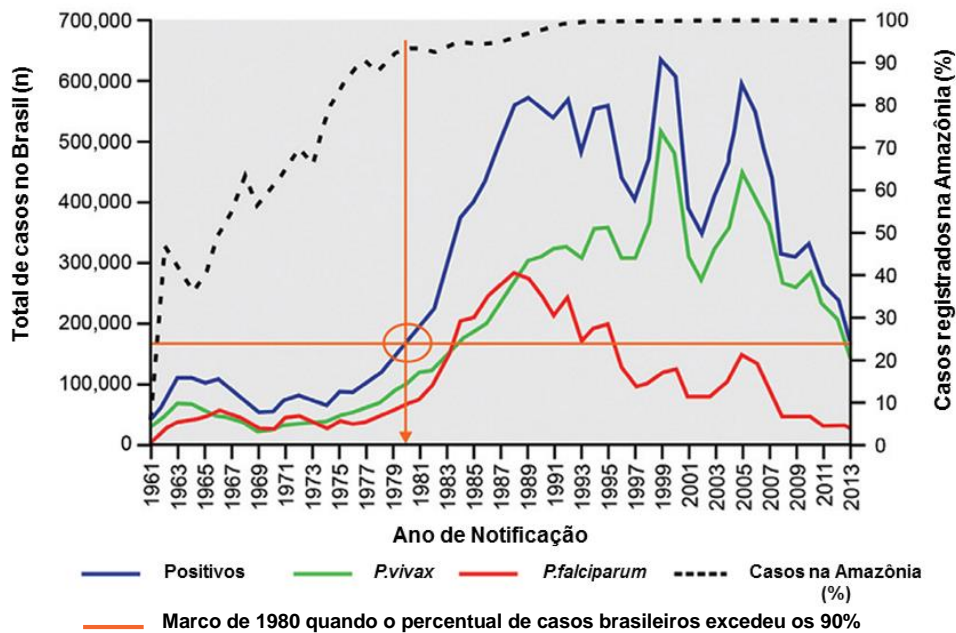
Nos escritos médicos brasileiros é possível identificar relatos de malária a partir do século XVI, porém, somente no final do século XIX foram obtidos registros quantitativos sobre sua prevalência. No final desse século era possível observar que a malária estava distribuída em todo território nacional, em especial na faixa litorânea, poupando apenas algumas áreas dos estados sulinos (Camargo 2003).

O final do século XIX foi marcado por um período de mudanças na história da região Amazônica, tanto no aspecto construtivo, devido ao grande interesse no látex brasileiro (momento histórico conhecido como Ciclo da Borracha) proporcionando visibilidade à região e conseqüente crescimento econômico e social, quanto no aspecto destrutivo, com a primeira grande epidemia de malária em virtude da intensa migração de indivíduos não imunes atraídos pelas promissoras perspectivas da extração do látex (Camargo 2003). Dessa migração maciça nasceu a cultura do extrativismo seringalista e a miscigenação de indígenas e migrantes, na sua maioria nordestinos, dando origem aos amazônidas do século XX (Camargo 2003).

No início do século XX ocorreram duas grandes epidemias de malária que assolaram o país. A primeira, durante a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, motivo pelo qual batizaram essa estrada como “Ferrovia do Diabo” testemunhada por Oswaldo Cruz e Carlos Chagas (Schweickardt 2007; Chagas 1913; Cruz 1910). A segunda, nos anos 30, no nordeste brasileiro, quando navios franceses que faziam a rota postal França-Natal introduziram o *An. gambiae*, até então ausente no país, mas que foi erradicado após grandes esforços e investimentos realizados pelo Governo Federal e pela Fundação Rockefeller (Parmakelis 2008).

Com o uso intensivo do DDT (sigla de Diclorodifeniltricloroetano) e o tratamento em massa da população, a década de 50 foi marcada por uma redução significativa no número de casos, restringindo a doença à região Amazônica. Contudo, a partir da década de 70 constatou-se, em vários países, incluindo o Brasil, o aumento do número de casos de malária (Figura 1.2). Esse fenômeno foi conseqüência do aparecimento da resistência -

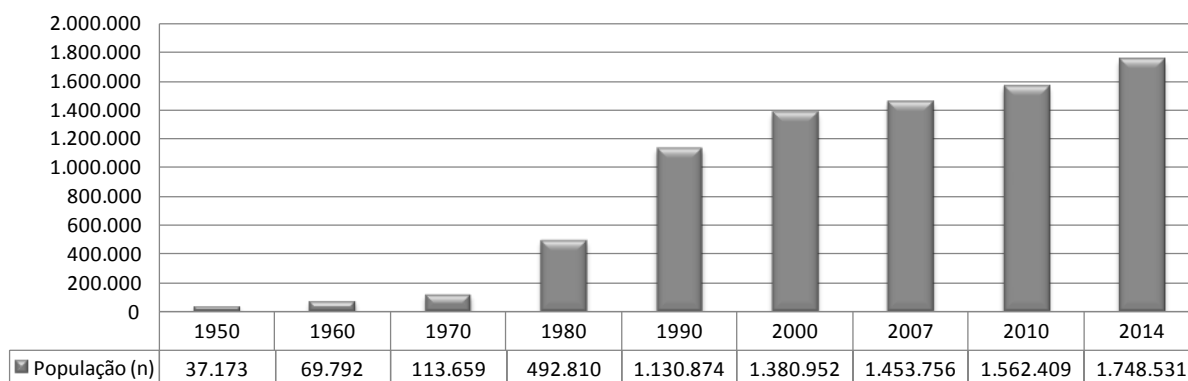
tanto dos anofelinos aos inseticidas quanto dos plasmódios aos antimaláricos - assim como da dificuldade em manter as estratégias de controle da doença em áreas endêmicas.



**Figura 1.2:** Série histórica da incidência de casos de malária por espécie plasmodial, 1960 a 2012. Fonte: Adaptado de Pina-Costa *et al.* 2014.

Na década de 70, investimentos governamentais, como o do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), favoreceram o crescimento agrícola na Região Norte Brasileira, acelerando o processo migratório e atraindo indivíduos de diferentes regiões do país (Figura 1.3). O Estado de Rondônia, desde sua colonização, foi cenário de diversas ondas migratórias, sendo este o fenômeno que mais exerceu influência na sua estrutura populacional (de Farias *et al.* 2012). Como consequência dos incentivos fiscais, entre as décadas de 70 e 80, a região Amazônica recebeu, aproximadamente, um milhão de migrantes, na maioria indivíduos não imunes, que se concentraram principalmente no Estado de Rondônia, proporcionando a rápida expansão da doença (Cruz Marques 1987).

### Histórico populacional de Rondônia - 1950 a 2014



**Figura 1.3:** Histórico populacional de Rondônia de 1950 a 2014. Fonte: adaptado dos Censos demográficos do IBGE & Almeida Silva A *et al.*, 2009.

Na década de 70, Porto Velho, capital de Rondônia, e regiões próximas a ela receberam vários trabalhadores oriundos do Sul e Sudeste do Brasil com ascendência europeia, como italianos e alemães, contribuindo assim, para a miscigenação da população de Rondônia. As características genéticas, advindas do intenso fluxo gênico de vários processos migratórios, desde o século XVII até os dias atuais, tornam a população desse estado favorável à investigação de marcadores de susceptibilidade e/ou resistência a patógenos, devido à diversidade de combinações de variantes em diferentes *locus* gênicos, possibilitando o estudo de interações genéticas, que em populações homogêneas não seria possível (Zembruski VM *et al.*, 2006).

#### 1.2.2 Aspectos recentes

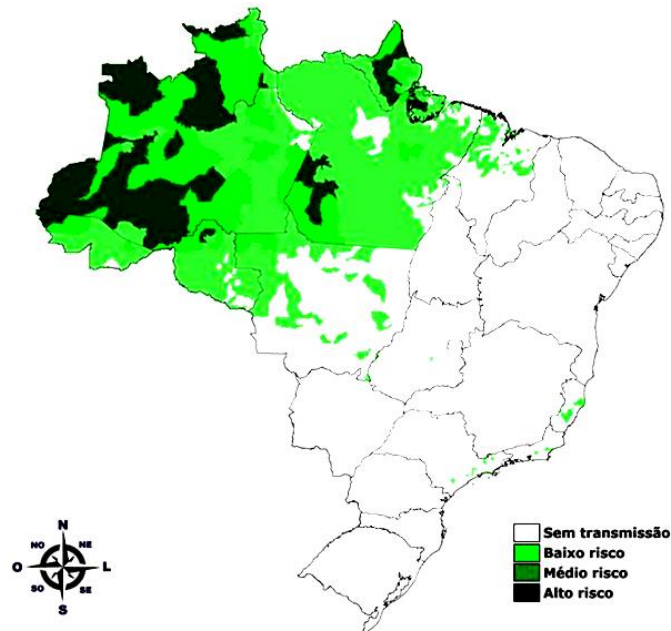
No período de 2000 a 2003 o Ministério da Saúde elaborou dois planos de controle da malária. O primeiro deles se chamou Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), que foi um sucesso no alcance do seu principal objetivo que era de reduzir a incidência dos casos em 50%. O segundo foi criado em 2003, com o nome de Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM) que visava no mínimo manter os bons resultados obtidos com o plano anterior. Entretanto, apesar dos esforços, os resultados não foram animadores e o número de casos tornou a aumentar perdurando por três anos

consecutivos. Esse aumento tem sido relacionado com a ocupação marginal de cidades como Manaus (Amazonas), Porto Velho (Rondônia) e Cruzeiro do Sul (Acre), além de atividades extrativistas, agrícolas e surgimento de assentamentos ilegais (Barbosa *et al.* 2014; de Pina-Costa *et al.* 2014).

A partir de 2006, o número de casos de malária no Brasil começou a decair como resultado de ações integradas de controle, realizadas no âmbito federal, estadual e municipal. Tal decréscimo está relacionado a diversos fatores, dentre os quais se destacam: vigilância epidemiológica, implementação de diagnóstico e tratamento rápido, os quais também foram responsáveis pela diminuição acentuada no número de infecções causadas por *P. falciparum* (Oliveira-Ferreira *et al.* 2010).

Atualmente no Brasil, mais de 60% do território brasileiro é favorável à transmissão da malária. A área endêmica do país concentra-se na região da Amazônia Legal composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão (Figura 1.4). O maior número de casos se concentra em cinco municípios: Cruzeiro do Sul (Acre), Porto Velho (Rondônia), Itaituba (Pará), Eirunepé (Amazonas) e Manaus (Amazonas) (de Pina-Costa *et al.*, 2014), mostrando que a distribuição da doença nessa região não é homogênea.

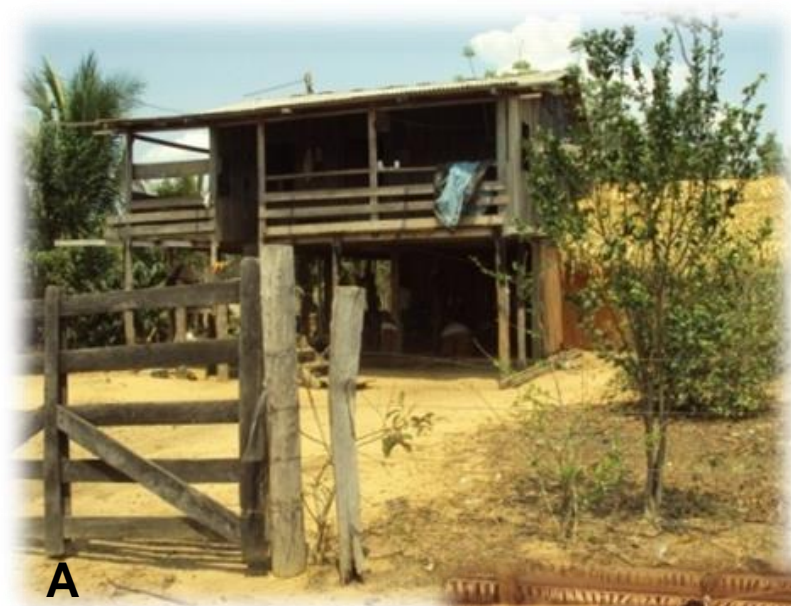
A ocorrência anual de casos de malária na região amazônica é estimada pela Incidência Parasitária Anual (IPA), que é expressa pelo número de casos positivos de malária por mil habitantes em determinado espaço geográfico (Saraiva *et al.*, 2009). De acordo com esse índice, é possível estratificar as áreas maláricas como de transmissão alta (IPA:  $\geq 50,0$ ), média (IPA: 10,0 a 49,9) e baixa (IPA: 0,1 a 9,9) (DATASUS, 2014). No Brasil, esse padrão de endemicidade é heterogêneo, predominando áreas de baixo e alto risco (WHO, 2014).



**Figura 1.4:** Áreas de transmissão de malária no Brasil. Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

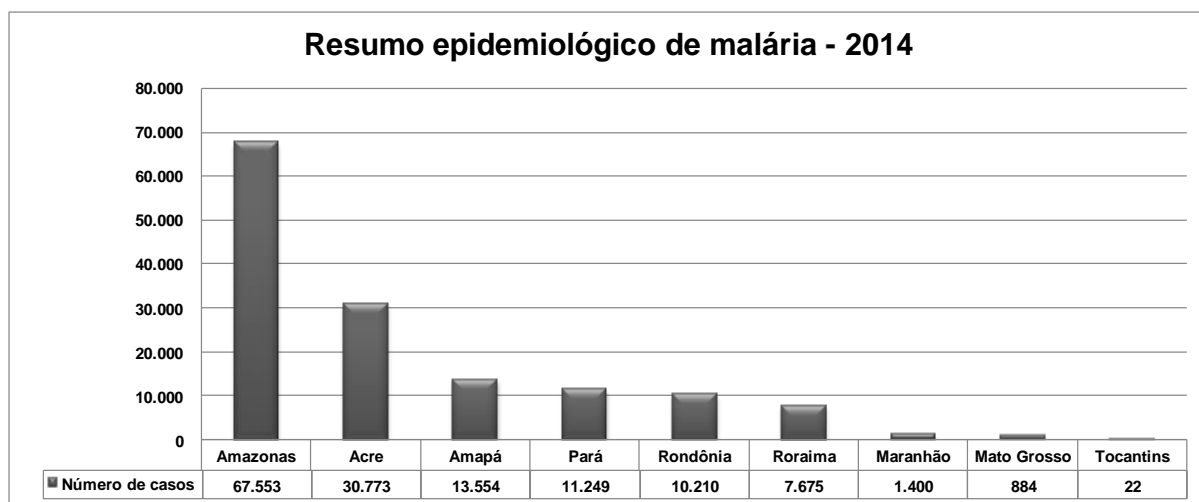
O controle da malária ainda é um desafio, pois as condições sócio-ambientais das áreas endêmicas (como ausência de sustentabilidade nos programas de controle da malária) e geo-climáticas (como a grande hidrografia das áreas endêmicas, bem como o calor e a umidade) contribuem com a proliferação dos anofelinos em coleções de água e, conseqüentemente, do *Plasmodium* spp. mediante a presença dos seus dois hospedeiros. Além disso, as formas de ocupação humana através do desmatamento desordenado para construção de habitações sem paredes ou com paredes incompletas propiciam o íntimo contato entre o homem e o transmissor, impossibilitando a longa duração do efeito dos inseticidas aplicados. Adicionalmente, o difícil acesso a várias residências dificulta a busca de indivíduos infectados e o posterior tratamento dos casos (Figura 1.5).





**Figura 1.5:** **A e B** - Habitações de indivíduos residentes em área endêmica de Malária (Porto Velho – RO); **C** - Habitações próximas ao Rio Madeira em Porto Velho - RO. Fonte: Fotos da autora

Em 2014 foram registrados 143.280 casos de malária no Brasil, sendo 119.332 causados por *P. vivax*, 22.238 por *P. falciparum*, 27 por *P. malariae* e 01 por *P. ovale*, além de 1.063 infecções mistas (*P. vivax* + *P. falciparum*) (Sivep-Malária, 2015). Dados relatados de 2014 mostram que Rondônia, nossa área de estudo, ocupa o 5º lugar do país em número de casos (Figura 1.6).

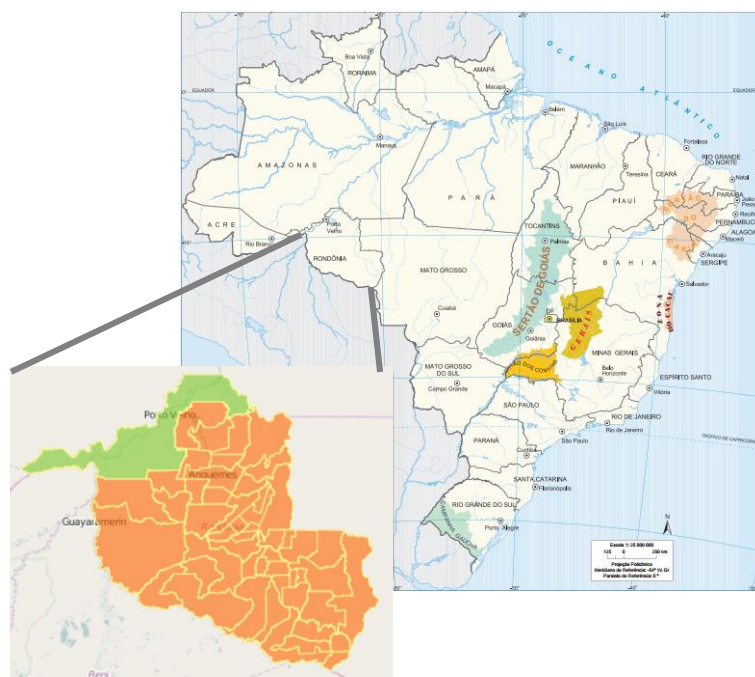


**Figura 1.6:** Resumo epidemiológico nacional dos casos de malária em 2014. Fonte: adaptado de Sivep-Malária/SVS/MS.

### **1.3 Área endêmica brasileira de malária**

#### **1.3.1 Estado de Rondônia**

Rondônia se localiza na Região Norte do território brasileiro e tem como limites os estados do Mato Grosso a leste, Amazonas ao norte, Acre a oeste e a República da Bolívia a oeste e sul, portanto este incluído na área da Amazônia Legal (Figura 1.7).



**Figura 1.7:** Mapa do Brasil e em destaque a localização geográfica do estado de Rondônia (em verde a capital Porto Velho). Fonte: IBGE, 2014.

Seus 52 municípios estão compreendidos em uma área total de 237.590 km<sup>2</sup> e, conforme a contagem populacional estimada pelo IBGE em 2014, o número de habitantes foi de 1.748.531, sendo considerado o 3º estado mais populoso da região Norte, perdendo somente para o Amazonas e Pará (IBGE, 2014).

No estado de Rondônia, a transmissão da malária é encontrada ao longo do ano com flutuações sazonais e um aumento do número de casos entre abril e setembro (Oliveira-Ferreira *et al.* 2010). Sua população é composta por nativos da floresta tropical e também de migrantes de áreas não-endêmicas do Brasil. Os nativos da floresta tropical são descendentes principalmente de ameríndios da Amazônia, que são os habitantes originais da região, misturados com os colonizadores europeus e africanos subsaarianos que chegaram a partir do século XIX até o início do século XX (Ferreira *et al.* 2002). Os imigrantes brasileiros são descendentes principalmente de pessoas que vieram das regiões Sul e Sudeste na década de 1970 e 1980 e tiveram predominantemente

antepassados europeus (principalmente italianos, alemães e poloneses) (Ferreira *et al.* 2002), devido a programas de colonização implementados pelo governo (Fearnside 2005).

A malária em Rondônia, assim como nos outros estados da região Amazônica, não está distribuída de forma homogênea (de Pina-Costa *et al.* 2014). Regiões com maior crescimento econômico e pequenos centros mais urbanizados apresentam um menor índice de casos quando comparados às regiões rurais que ainda representam a grande maioria dos casos do estado. Foram registrados 10.210 casos de malária em Rondônia em 2014, contudo, do total de casos neste estado, aproximadamente 65% deles foram notificados no município de Porto Velho (Sivep-Malária/SVS/MS).

### **1.3.2Município de Porto Velho**

Porto Velho é a capital e o município mais populoso do estado de Rondônia, o quarto mais populoso da Região Norte (estimativa de 494.013 habitantes em 2014), ficando atrás de Manaus, Belém e Ananindeua (IBGE, 2015). Destaca-se também por sua extensão territorial, abrangendo uma área de 34.068 km<sup>2</sup> e por sua localização ao norte do estado de Rondônia e à margem direita do rio Madeira, fazendo desse município um dos principais pontos de chegada de imigrantes e visitantes provenientes de diversas regiões brasileiras (Katsuragawa TH *et al.* 2010). Apesar de ser o principal centro econômico do Estado de Rondônia, Porto Velho apresenta ainda algumas áreas de profundo atraso social. A menos de 30 km do centro da cidade, podem ser observadas famílias sem saneamento básico vivendo praticamente de pesca e agricultura de subsistência às margens do rio Madeira e seus afluentes, ou até mesmo em assentamentos de terra promovidos pelo governo.

Possui um relevo pouco acidentado, não apresentando grandes elevações ou depressões, formado por planícies com serras de baixa altitude e por área de floresta tropical apresentando o clima tropical superúmido como predominante. Dessa maneira, a transmissão e a manutenção de alta incidência de casos de malária na região podem ser explicadas pelas condições locais que permitem a manutenção do ciclo biológico do

parasito, no qual fatores determinantes como o clima e a presença de criadouros de mosquitos do gênero *Anopheles* sp. (em especial o *An. darlingi*) fazem da maioria das localidades dentro do município de Porto Velho e adjacências regiões de alto risco de transmissão. Como agravante, a maioria das casas apresenta estrutura aberta, além de ficarem muito próximas da floresta e de coleções de água, proporcionando um íntimo contato dos moradores com os anofelinos presentes no local.

#### **1.4 Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.**

O ciclo biológico do plasmódio envolve dois hospedeiros: um vertebrado onde ocorre reprodução assexuada que se divide em uma fase pré-eritrocítica e uma fase eritrocítica; e outro invertebrado onde ocorre a reprodução sexuada. O ciclo pode variar entre as espécies de parasitos e hospedeiros, porém mantém pontos semelhantes entre eles (Figura 1.8).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino infectada libera junto com seu fluido salivar os esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado. Nesse local, os esporozoítos são móveis e capazes de penetrar em pequenos vasos sanguíneos, enquanto outros permanecem na pele, provavelmente sendo fagocitados e eliminados (Guttery *et al.* 2014; Vanderberg 2014; Ménard *et al.* 2013; Ejigiri e Sinnis 2009; Amino *et al.* 2007). Os esporozoítos podem também cair na circulação linfática, atingindo os linfonodos, onde desenvolvem-se em formas exoeritrocíticas (observadas em modelo experimental murino) gerando merozoítos infectantes, sendo liberados através de merossomos, como tipicamente observado no fígado (Gueirard P *et al.* 2010). No entanto, apenas os parasitos que atingem a circulação sanguínea são capazes de dar continuidade ao ciclo biológico, migrando para o fígado e infectando os hepatócitos.

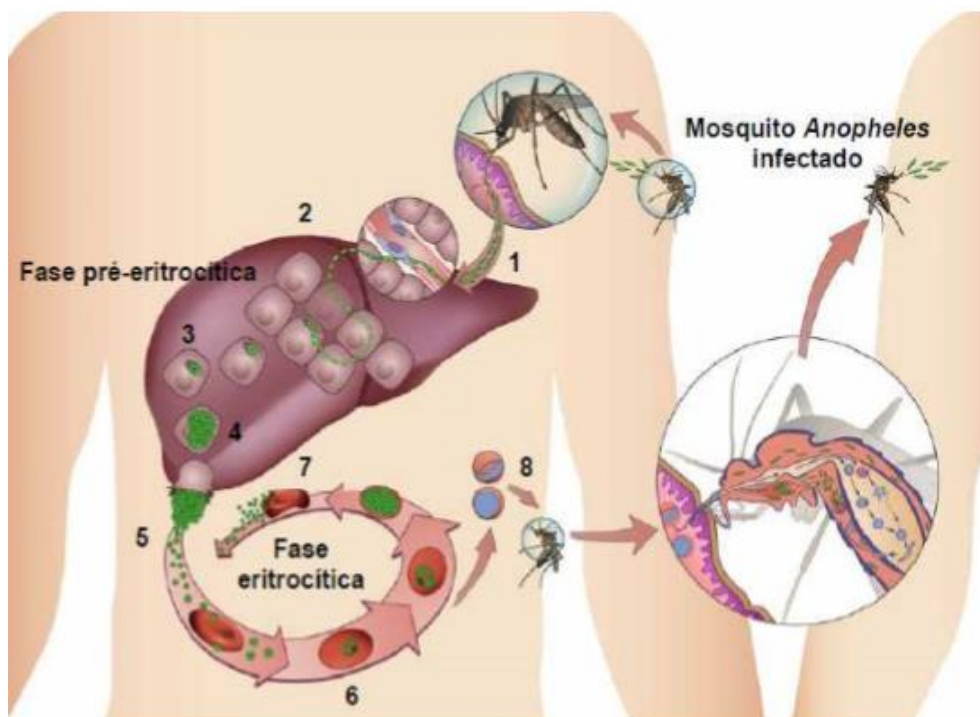
A partir daí o processo se torna bastante complexo e dependente de várias interações do tipo ligante-receptor e da migração dos parasitos por várias células hospedeiras. Os esporozoítos se locomovem para os vasos sinusóides do fígado onde penetram através das células de Kupffer, no hepatócito e iniciam o ciclo pré-eritrocítico (Frevert *et al.* 2008; Baer *et al.* 2007). Sendo assim, no parênquima hepático, esses

esporozoítos atravessam ativamente numerosos hepatócitos, até invadirem um determinado hepatócito no qual ocorre a formação do vacúolo parasitóforo bem delimitado. Dentro do vacúolo parasitóforo, os esporozoítos iniciam um processo de maturação e se diferenciam em um pequeno trofozoíto crescendo em tamanho ao longo de alguns dias. Após 6 ou 7 dias de crescimento e de desenvolvimento primário, um esquizonte totalmente maduro é formado com milhares de merozoítas envolvidos por uma membrana do vacúolo parasitóforo. Nessa fase pré-eritrocítica a infecção é assintomática. Essa etapa ocorre em aproximadamente 1 a 2 semanas, variando de espécie para espécie: 6 dias para o *P. falciparum*, 8 dias para *P. vivax*, 9 dias para o *P. ovale*, 9 a 12 dias para o *P. knowlesi* e para o *P. malariae* pode durar mais tempo – 12 a 16 dias (Servonnet *et al.* 2012; Rey 2013). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns dos merozoítos não entram para a corrente sanguínea e permanecem quiescentes nos hepatócitos, sendo denominados de hipnozoítos. Portanto, passado algum tempo, o indivíduo infectado pode voltar a ter crises de malária, isto é, recidivar (Markus 2015).

Após a fase pré-eritrocítica, os merozoítas são, então, liberados na corrente sanguínea para infectar sua célula alvo, os eritrócitos. A penetração dos merozoítos em eritrócitos é um processo que envolve interações moleculares específicas de proteínas ligantes no complexo apical e na superfície do merozoíto com receptores nas membranas das hemácias. O mecanismo de penetração é complexo e envolve muitas etapas incluindo: 1) reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; 2) reorientação apical irreversível do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; 3) formação de uma junção no ponto de contato entre o cone apical do parasito e a membrana celular do eritrócito, e 4) movimento da junção ao redor do merozoíto com simultânea invaginação da membrana do eritrócito, até que o parasito se encontre dentro da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo, culminando na invasão propriamente dita (Wright e Rayner 2014). No vacúolo parasitóforo, os merozoítos se diferenciam em trofozoítas (jovem e maduro), que por sua vez, se multiplicam (esquizogonia eritrocítica) e dão origem a esquizontes sanguíneos, também repletos de merozoítos. Essas formas parasitárias recém formadas são liberadas e invadem outros eritrócitos. Esse momento coincide com manifestações clínicas da doença, notadamente o paroxismo febril, caracterizado por calafrio, febre e sudorese.

O ciclo eritrocítico se repete sucessivas vezes, a cada 24h (*P. knowlesi*), 48h (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*) ou a cada 72h (*P. malariae*) (Müller e Schlagenhauf 2014) Dependendo da espécie de *Plasmodium*, os sintomas podem se manifestar na forma não complicada, evoluindo ou não para a forma complicada. Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* predomina a forma não complicada, caracterizada por febre intermitente e intensa debilidade física, dentre outros sintomas. Nas infecções por *P. falciparum*, manifestações mais graves podem ocorrer, podendo levar o paciente ao óbito. Dentre essas, destacam-se: anemia grave, malária cerebral e acidose metabólica (Miller *et al.* 2002). Relatos recentes vêm demonstrando que o *P. knowlesi*, também pode causar doença grave. Pacientes com as formas graves ou fatais preenchem os critérios preconizados pela OMS para malária grave por *P. falciparum*. Entretanto, até o momento não houve relatos de coma ou anemia grave em adultos (Millar *et al.* 2015).

Após algumas gerações, alguns merozoítos sanguíneos se diferenciam em formas sexuadas, gametócitos masculinos e femininos. Esses, ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles*, darão continuidade ao ciclo do parasito com a formação de gametas. A fusão dos gametas masculino e feminino no interior do estômago do inseto origina um zigoto móvel denominado oocineto, que, após atravessar a parede intestinal do mosquito, por um mecanismo transcelular, aloja-se na membrana basal onde se desenvolve em oocisto (Zhang *et al.* 2015). No interior do oocisto ocorrem diferenciação e divisão nuclear que resulta na formação de milhares de esporozoítos (esporogonia). Parte dos esporozoítos liberados na hemocele migra para as glândulas salivares do mosquito. A fêmea do anofelino, ao realizar repasto sanguíneo, inoculará essas formas no hospedeiro vertebrado, reiniciando um novo ciclo no hospedeiro vertebrado (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. no hospedeiro vertebrado (homem) e no hospedeiro invertebrado (mosquito *Anopheles* sp.) Fonte: adaptado de Sturm e Heussler 2007. Fase pré-eritrocítica: Esporozoítos injetados na derme do hospedeiro vertebrado atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado infectando os hepatócitos [1]. No parênquima hepático, os esporozoítos atravessam numerosos hepatócitos à procura de um hepatócito adequado para o desenvolvimento do esporozoíta [2]. Formação de um vacúolo parasitóforo onde os esporozoítos se desenvolvem assexuadamente [3] dando origem a milhares de merozoítos [4]. Merozoítos liberados do fígado para a circulação sanguínea [5]. Fase eritrocítica: Merozoítos penetram nos eritrócitos e se diferenciam em trofozoítas [6]. Estes se multiplicam originando esquizontes repletos de merozoítos que infectarão novos eritrócitos dando continuidade ao ciclo eritrocítico [7]. Num dado momento, alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuais (gametócitos masculinos e femininos) que, ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles*, dão continuidade ao ciclo biológico do parasito [8].

### **1.5 Fatores genéticos do homem relacionados à susceptibilidade e/ou resistência a malária**

As primeiras discussões sugerindo que as mutações de alguns genes se mantêm em uma elevada frequência numa população como consequência de uma vantagem



seletiva proporcionada por alguma doença foi feita por Haldane (Haldane 1949). Mais tarde esta hipótese, que ficou conhecida como “Hipótese da malária”, foi comprovada por Anthony Allison (Allison 1954). Esse pesquisador evidenciou que indivíduos heterozigotos para o gene da Hemoglobina S (gene HbS) teriam uma vantagem seletiva em regiões hiperendêmicas de malária, concluindo que a endemicidade da área é um importante fator na seleção de indivíduos com traços falciformes. Entretanto, a busca do entendimento acerca da predisposição ou resistência dos indivíduos a diferentes doenças se intensificou, principalmente após o advento da Biologia molecular. Somente a partir de ferramentas moleculares foi possível identificar polimorfismos genéticos nos indivíduos que estão associados ao fenótipo de susceptibilidade e/ou resistência.

Os fatores genéticos do hospedeiro humano contribuem significativamente para a diversidade relacionada aos fenótipos de susceptibilidade ou resistência à malária. Embora saibamos que a transmissão da malária se dá através da picada do anofelino fêmea infectado, relatos da literatura com crianças que vivem em área de elevada endemicidade na África sugerem que a maioria dos repastos sanguíneos de mosquitos fêmeas infectadas não causa doença e só raramente causa as manifestações graves, como o coma e malária cerebral (Machado *et al.* 2010; Greenwood *et al.* 1991). Outro estudo também envolvendo crianças, mas provenientes do Gâmbia, sugeriu que a susceptibilidade à forma grave da doença pode estar associada a fatores genéticos ao refutar a hipótese de que a exposição prévia a malária é a principal razão para o desenvolvimento de malária grave por *P. falciparum*. Esse estudo mostrou que crianças com malária grave tinham sido expostas a infecções anteriores tão frequentemente quanto as crianças com doença moderada (Erunkulu *et al.* 1992). Dessa maneira, estudos relacionados com a variabilidade da enzima G6PD, com as talassemias, assim como trabalhos associados ao antígeno eritrocitário *Duffy*, todos em consonância com a resistência a malária, mostraram que pelo menos no que concerne a essa doença parasitária, importantes mecanismos genéticos podem estar associados à infecção e à gravidade da sua manifestação (Lelliott *et al.* 2015; Amoako *et al.* 2014).

Vários mecanismos de resistência do hospedeiro têm sido descritos em ambas as fases de desenvolvimento e multiplicação do plasmódio (fase hepática e eritrocítica). Resistências de base genética estão envolvidas na alteração da invasão de eritrócitos

por merozoítas, na redução de crescimento do parasito ou na viabilidade do merozoíta após ser liberado dos esquizontes (López *et al.* 2010; Smith *et al.* 2002). Entre as principais alterações que conferem resistência à malária algumas delas são hemoglobinopatias e polimorfismos eritrocitários (Michon *et al.* 2001). Dentre as hemoglobinopatias, as talassemias referem-se a alterações na síntese de uma das cadeias de globina (Vento *et al.* 2006). A alfa talassemia é uma das desordens genéticas humanas mais comuns do globo. Esta exibe uma síntese de alfa-globina anormal, enquanto a quantidade de beta-globina é diminuída na condição dos betas talassêmicos (Machado *et al.* 2010; Richer e Chudley 2005; Smith *et al.* 2002). Estudos anteriores reportaram uma proteção do hospedeiro contra malária por *P. falciparum* em regiões africanas onde essas doenças são simpátricas, no entanto o mecanismo de ação da talassemia sobre a malária ainda é incerto (Kuesap *et al.* 2015; Opi *et al.* 2014). Estudos têm mostrado que tanto o polimorfismo no gene receptor de complemento 1 (CR1) quanto a alfa talassemia estão associados com a deficiência de CR1 nos eritrócitos (Lan *et al.* 2015; Cockburn *et al.* 2004). Tal fato reduz a capacidade dos eritrócitos em formar rosetas e conseqüentemente confere proteção contra a forma grave da malária. Entretanto, o mecanismo responsável pela redução de CR1 em eritrócitos com  $\alpha$ -talassemia ainda permanece obscuro (Cockburn e Rowe 2006). O perfil de beta talassemia heterozigota é associado com anemia extremamente leve e alterações morfológicas em eritrócitos, de forma diferente ao perfil homozigoto, que é associado com anemia grave (Weatherall 2000).

A anemia falciforme refere-se a um grupo de doenças com mutações no gene HbB que produzem a hemoglobina na forma anormal conhecida como hemoglobina S (HbS) (Richer e Chudley 2005). Estudos têm sugerido que indivíduos portadores do traço falcêmico (HbAS, que apresentam o alelo normal A e o alelo mutado S) não apresentam problemas clínicos e têm proteção contra as formas letais da malária por *P. falciparum* (Lopera-Mesa 2015; Albiti e Nsiah K 2014). Tal proteção é considerada uma vantagem seletiva conferida pela HbAS. Os mecanismos envolvidos nessa proteção ainda não foram completamente esclarecidos, mas há evidências que eritrócitos com HbAS inibem o crescimento dos plasmódios devido as condições de desoxigenação (Taylor *et al.* 2012; Ackerman *et al.* 2005; Aidoo *et al.* 2002; Friedman 1978). Outro exemplo clássico da diferença de susceptibilidade à malária em populações humanas é a associação entre o

grupo sanguíneo Duffy, receptor eritrocítico para o *P. vivax* e a susceptibilidade à infecção por essa espécie de plasmódio. Apesar disso, já foram observados casos de malária causada pelo *P. vivax* em indivíduos Duffy negativos em regiões com diferentes perfis de endemicidade, do Brasil e da África, que sofrem pressões seletivas diversificadas (Woldearegai *et al.* 2013; Carvalho *et al.* 2012; Dhorda *et al.* 2011; Cavasini *et al.* 2007).

Sendo assim, as diferentes localizações geográficas onde estão presentes as alterações genéticas que conferem proteção contra a malária tem levantado a hipótese de que as várias populações humanas foram evoluindo junto com os parasitos da malária, em vez de evoluir de maneira e em tempos diferentes. Este processo de coevolução pode ter resultado em benefícios mútuos para os organismos: por um lado, conferindo proteção relativa contra a infecção do parasito no hospedeiro e, por outro lado, limitando a virulência do parasito, permitindo assim permanecer dentro do hospedeiro por mais tempo (Lopez *et al.*, 2010).

### **1.6 Aspectos gerais da resposta imune frente ao *Plasmodium* spp.**

A aquisição de uma imunidade protetora natural anti-*Plasmodium* spp. pode ser adquirida, após sucessivas infecções, e essa imunidade, denominada de premunicação, torna os sintomas clínicos da doença geralmente ausentes (imunidade clínica ou antidoença) e os níveis de parasitos sanguíneos extremamente baixos (imunidade antiparasito), atingindo níveis subpatentes (Langhorne *et al.* 2008; Schofield e Grau 2005; Miller *et al.* 2002).

O processo de aquisição de imunidade na malária é, ainda hoje, pouco compreendido, sendo que inúmeros fatores o influenciam, como: a complexidade do ciclo biológico do *Plasmodium* spp., sua extensa diversidade antigênica, o perfil de transmissão da área endêmica, estado nutricional do indivíduo, maturidade do sistema imunológico relacionado à idade e os mecanismos de resistência natural que diferem entre regiões e até mesmo entre populações de etnias distintas (Doolan *et al.* 2009; Langhorne *et al.* 2008).

As respostas imunes na malária podem ser dicotomizadas em respostas pré-eritrocíticas (contra esporozoítos e parasitos do estágio hepático) e respostas eritrocíticas

(contra merozoítas e parasitos intraeritrocíticos). A resposta pré-eritrocítica contra os hepatócitos infectados é mediada principalmente por células T CD8<sup>+</sup> que exerce um importante papel na eliminação destes hepatócitos. Níveis altos de células T CD8<sup>+</sup> específicas para as proteínas deste estágio parecem estar correlacionadas com proteção (Wunderlich *et al.* 2014; Bejon *et al.* 2007).

Numerosos estudos corroboram o papel crucial das células T CD8<sup>+</sup> na imunidade pré-eritrocítica sugerem que estas células lisam diretamente hepatócitos infectados destruindo parasitos intracelulares com o auxílio de perforinas e granzimas estimuladas pelo IFN- $\gamma$  produzidos por linfócitos T e células NK (Wunderlich *et al.* 2014; Tseet *et al.* 2011; McCall e Sauerwein 2010). As células NK e NKT são as populações de linfócitos mais abundantes que residentes no fígado, sendo mais frequentes neste órgão do que em quaisquer outros tecidos (Wunderlich *et al.* 2014; Crispe 2009; Nemeth *et al.* 2009).

A resposta protetora de células T CD8<sup>+</sup> em modelos murinos e em humanos parece ser dependente de células T CD4<sup>+</sup> e da persistência da apresentação de antígenos do esporozoíta (Overstreet *et al.* 2011; Cockburn *et al.* 2010). Porém, uma elevada quantidade de células T CD8<sup>+</sup> de memória é necessária para mediar uma imunidade completa contra as formas do parasito neste estágio (Schmidt *et al.* 2008). Nesse sentido, indivíduos que vivem em áreas endêmicas e são continuamente reinfectados pelo esporozoíta do *Plasmodium* desenvolvem certo grau de imunidade pré-eritrocítica, porém essa imunidade em geral é incompleta (Stanisic *et al.* 2013).

Ainda na fase pré-eritrocítica, os anticorpos podem contribuir neutralizando os esporozoítas e conseqüentemente inibindo a invasão de hepatócitos (Dupset *et al.* 2014). No entanto, são necessários níveis elevados de anticorpos para evitar a invasão de todos os esporozoítas. Embora os anticorpos específicos de esporozoítas estejam presentes em indivíduos que vivem em áreas endêmicas, o seu papel na imunidade natural não é claro (Dups *et al.* 2014; Offeddu V *et al.* 2012). Uma evidência inicial do papel de anticorpos na proteção contra a doença veio a partir da identificação de anticorpos monoclonais anti-CSP capazes de induzir o bloqueio da infecção *in vitro* e *in vivo* (Dups *et al.* 2014). Outro estudo demonstrou que a imunização com peptídeos da região N-terminal da proteína CSP pode induzir anticorpos bloqueadores de invasão em modelos murinos (Rathoreet *et al.* 2005). Além disso, também tem sido observada uma correlação

entre a presença de anticorpos para esta região com uma redução na morbidade da malária (Bongfen *et al.* 2009).

Na fase eritrocítica a imunidade adquirida pode ocorrer naturalmente, após sucessivas infecções. Em regiões de alta transmissão no continente Africano, onde o *P. falciparum* é a espécie predominante, os recém-nascidos são relativamente resistentes à infecção durante os primeiros meses de vida devido a transferência passiva de anticorpos IgG da mãe para o feto durante a gestação (Chizzolini *et al.* 1991; Sehgal VM *et al.* 1989). A importância dos anticorpos na imunidade protetora foi claramente demonstrada em estudos cuja administração de anticorpos de adultos com elevado grau de imunidade contra a malária proporcionou a redução da parasitemia em crianças infectadas (Sabchareon *et al.* 1991; McGregor 1964; Cohen *et al.* 1961).

Experimentos em modelos simianos evidenciaram que os anticorpos também atuam em mecanismos efetores na fase eritrocítica inibindo a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, prevenindo a adesão de hemácias parasitadas em receptores teciduais e opsonizando os merozoítos ou os eritrócitos parasitados por meio de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 para posterior fagocitose ou mediando o processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo em cooperação com monócitos e macrófagos (Inibição Celular Dependente de Anticorpo, da sigla em inglês, *ADCI - Antibody-Dependent Cellular Inhibition*), levando à remoção e eliminação desses merozoítos (Druilhe e Perignon 1994; Garraud *et al.* 1993; Lunel e Druilhe 1989; Druilhe e Khusmith 1987). Corroborando estes dados, alguns trabalhos verificaram que as subclasses de IgG citofílicas têm um papel central na mediação do fenômeno de premunicação na malária, visto que tais subclasses são preponderantes em indivíduos naturalmente protegidos (Soe *et al.* 2004; Soe *et al.* 2002; Bouharoun-Tayoun *et al.* 1995; Bouharoun-Tayoun *et al.* 1990).

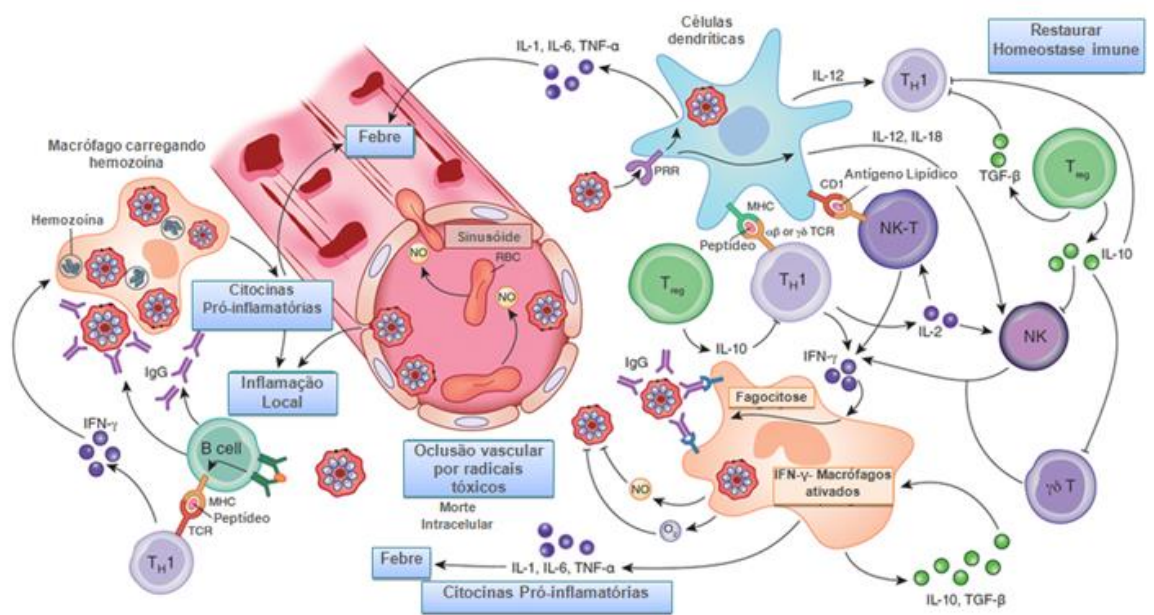
Além dos anticorpos, a resposta imune mediada por células também apresenta um papel essencial na aquisição da imunidade contra as formas eritrocíticas. Em modelo murino envolvendo uma cepa virulenta de *P. yoelii* foi demonstrado que as células T CD8+ podem desempenhar um papel protetor no estágio eritrocitário da doença, no qual foi proposto que eritrócitos ativem células TCD8+ por apresentação cruzada entre células apresentadoras de antígenos que tenham fagocitado as hemácias parasitadas (Imai *et*

*al.* 2010). Estudos realizados em seres humanos sadios e sem história prévia de malária demonstram que, após repetidos inóculos com doses ultra-baixas de eritrócitos infectados com *P. falciparum*, eles desenvolvem uma imunidade protetora contra a doença, com ausência de parasitemia e sintomas clínicos. Esses indivíduos apresentaram um perfil de resposta imune caracterizada por proliferação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e secreção de IFN- $\gamma$ , mas não apresentaram secreção de IL-4 e IL-10, consistindo em uma resposta imunológica do tipo Th1. Além disso, foi observada nestes indivíduos uma alta concentração da atividade da enzima óxido nítrico sintase em células mononucleares do sangue periférico (Pombo *et al.* 2002).

Trabalhos têm sugerido que as interações iniciais entre os parasitos e as células do sistema imune inato são importantes no controle, além de moldar a resposta imune adaptativa e conseqüente resolução da infecção (Liehlet *al.*2015). Além disso, recentemente Liehl P e colaboradores demonstraram, utilizando modelo murino, um fenótipo de resistência à reinfeção ao *P. berghei* dependente da ativação do IFN tipo I e da expressão do IFN- $\gamma$ . Os camundongos foram submetidos à reinfeção tanto através da aplicação intravenosa de quantidades elevadas de esporozoítos como pela transmissão natural da doença, ou seja, através da picada do anofelino (Liehl *et al.*2015). Em virtude dos hepatócitos não serem produtores de IFN- $\gamma$ , os autores sugerem que componentes do sistema imune inato, em particular, as células NK e NKT tenham um papel crucial nesse desfecho de resistência (Horras *et al.*2011; Schoenborn e Wilson 2007).

O principal papel da imunidade inata parece estar relacionado à produção de citocinas imunorreguladoras, como a interleucina IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são críticas para o desenvolvimento de resposta tipo Th1 envolvendo células T CD4<sup>+</sup>, células B e células efectoras que mediam a resposta imune adaptativa tanto celular e quanto humoral (Langhorne *et al.* 2008). Entretanto, a expressão clínica da malária pode ser modulada pela expressão dos alelos pertencentes ao complexo *Natural Killer*, logo dependendo da expressão destes alelos, essas células podem secretar níveis diferentes de citocinas que irão delinear um perfil de resposta anti-inflamatória ou pró-inflamatória (Riley *et al.* 2006). Sendo assim, além de todos os mecanismos efetores da resposta imune, componentes genéticos individuais do hospedeiro também influenciam diretamente na qualidade da

resposta imune frente à infecção malárica (natural ou induzida). A visão geral da resposta imune humoral e celular contra a malária está ilustrado na figura 1.9.



**Figura 1.9:** Visão geral da resposta imune humoral e celular contra a malária. Fonte: Adaptado de Riley *et al.* 2013.

### 1.6.1 Células NK e seus receptores

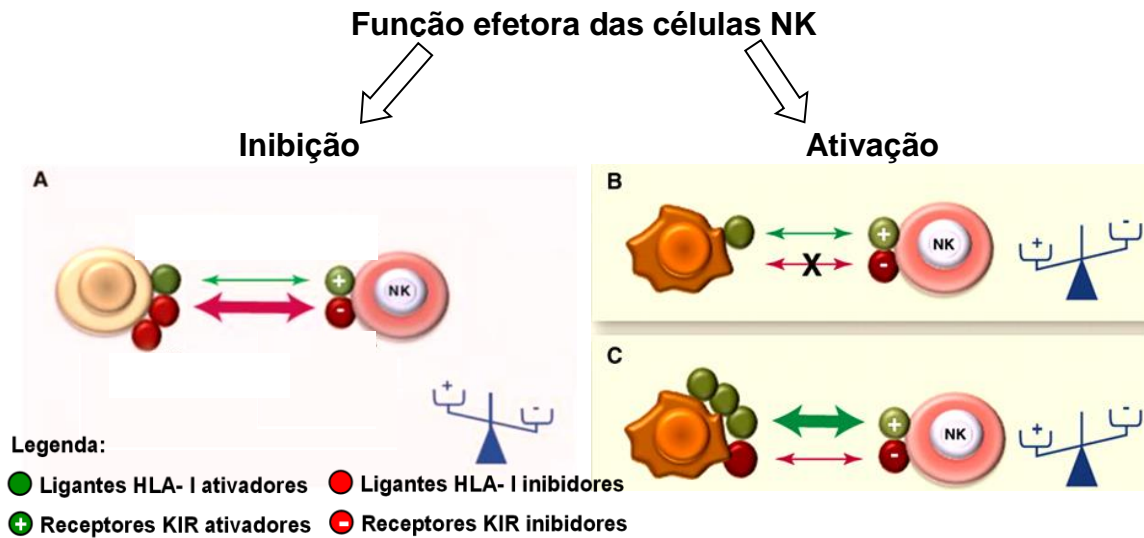
As células NK representam um subgrupo de linfócitos granulares originados de um precursor linfóide da medula óssea. Recentemente, elas foram classificadas como membros do grupo-1 de Células Linfoides Inatas (ILCs), por não ocorrer rearranjo gênico de seus receptores antigênicos, dependente de RAG (Genes Ativadores de Recombinação) e serem fortes produtoras de IFN- $\gamma$  (Paolini *et al.* 2015). As células NK compõem de 10 a 15% das células mononucleares sanguíneas e de 30 a 50% dos linfócitos do fígado (Lysakova-Devine *et al.* 2014).

As células NK são células efetoras do sistema imune inato, cuja função principal é sua rápida atividade citotóxica. A destruição das células alvo mediada por células NK ocorre através da exocitose de grânulos, principalmente perforinas e granzimas. Além

disso, essas células são poderosas produtoras e secretoras de citocinas e quimiocinas, principalmente o IFN- $\gamma$ , regulando a interação com células dendríticas e ativando macrófagos a destruírem microorganismos fagocitados, bem como secretarem citocinas pró-inflamatórias direcionando para uma resposta imune tipo Th1 (Paolini *et al.* 2015). Tais células são componentes cruciais no controle imune de células tumorais, infectadas e sob estresse. O IFN- $\gamma$  é a citocina intimamente relacionada aos efeitos citotóxicos da célula NK, bem como na ativação de macrófagos. Entretanto, as células NK são estimuladas através da interleucina IL-12 produzidas pelos macrófagos, criando um processo de reativação positiva que ativa ambas as células no tecido infectado. Dessa maneira, as células NK são predominantes no início da infecção no que tange à produção de IFN- $\gamma$ , ativando os macrófagos a secretarem citocinas que iniciam a resposta imune adaptativa com a chegada dos linfócitos T (Paolini *et al.* 2015; Cooper *et al.* 2001).

A reatividade das células NK ocorre pelo reconhecimento da diminuição da expressão ou até mesmo da ausência de moléculas HLA em células infectadas ou células tumorais, conhecido como hipótese do “*missing-self*” (perda de expressão do próprio) (Ljunggren e Karre 1990). Entretanto, atualmente é consenso que a ativação das células NK, para que se tornem citotóxicas, é desencadeada pela expressão abundante de ligantes para receptores de ativação na superfície da célula alvo (Boyton e Altmann 2007), enquanto que as interações entre os receptores de inibição e seus respectivos ligantes previnem as células NK de matar células hospedeiras normais. A vista disto, a vigilância imunológica das células NK pode ser realizada tanto pela expressão diminuída ou ausente de moléculas HLA de classe I nas células alvo quanto pelo desequilíbrio entre sinais ativadores e inibidores mediados por receptores existentes nas células NK (Figura 1.10).

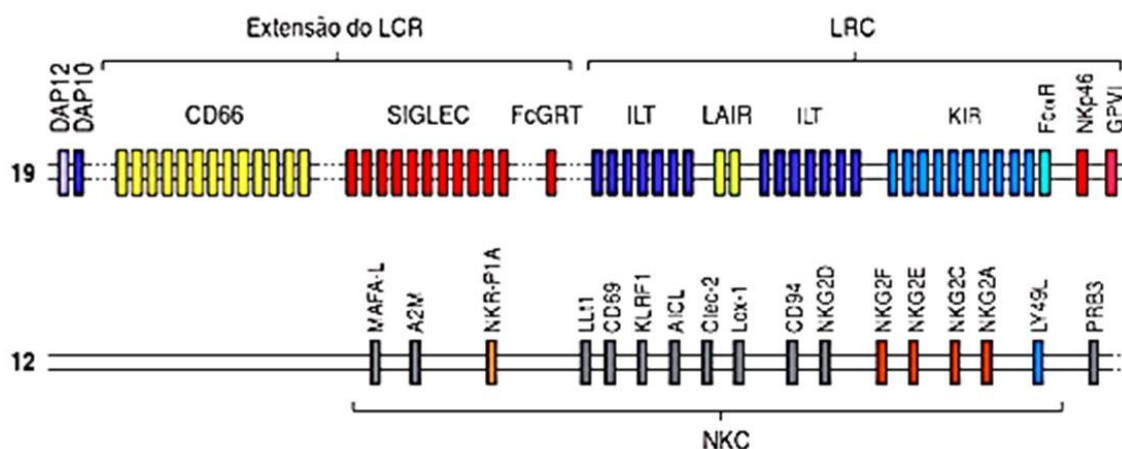




**Figura 1.10:** A regulação dinâmica da função efetora das células NK mediante a interação dos receptores ativadores e inibidores e seus respectivos ligantes HLA-I. (A) Quando sinais inibidores prevalecerem sobre os sinais ativadores a célula NK não é ativada. (B) A ausência de sinais inibidores permite que os sinais ativadores promovam a atividade citotóxica da célula NK. (C) De maneira semelhante, se o conjunto de sinais ativadores for mais forte que o conjunto de sinais inibidores a célula NK é ativada. Fonte: adaptado de Vivier *et al.* 2011.

Os receptores das células NK são codificados por genes presentes em dois cromossomos distintos e, dentre os receptores que reconhecem moléculas HLA de classe I, podemos destacar duas grandes famílias. A família dos Receptores semelhantes à lectina da sigla em inglês KLR (*Killer Lectin-like receptors*), que fazem parte de um grupamento gênico maior denominado Complexo de Receptores NK da sigla em inglês NKC (*NK receptor complex*) presentes no braço curto do cromossomo 12 (Figura 1.11). Os membros mais representativos da família KLR são as moléculas NKG2 que associadas às moléculas CD94 formam o receptor funcional. A outra família é a dos Receptores do tipo Imunoglobulina das Células *Natural Killer* da sigla em inglês KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*), que pertencem a um grupo maior de genes conhecidos como Complexo de Receptores Leucocitários da sigla em inglês LRC (*Leukocyte*

*Receptor Complex*) presentes no braço longo do cromossomo 19 (Figura 1.11) (Murphy 2014; Brooks *et al.* 2000). Os receptores KIR, bem como seus ligantes HLA de classe I apresentam uma alta diversidade genética e haplotípica na população humana. Desta maneira, vários estudos vêm demonstrando associações de determinados genes KIR e/ou genótipos KIR/HLA com a incidência e com a progressão de diversas doenças, como as autoimunes, inflamatórias, tumorais e infecciosas, dentre elas a malária (De Re *et al.* 2015; Olaniyan *et al.* 2014; Jarduli *et al.* 2014; Kulkarni *et al.* 2008)



**Figura 1.11:** Esquema da localização cromossômica das duas famílias gênicas que codificam os receptores de células NK. Fonte: Murphy 2014.

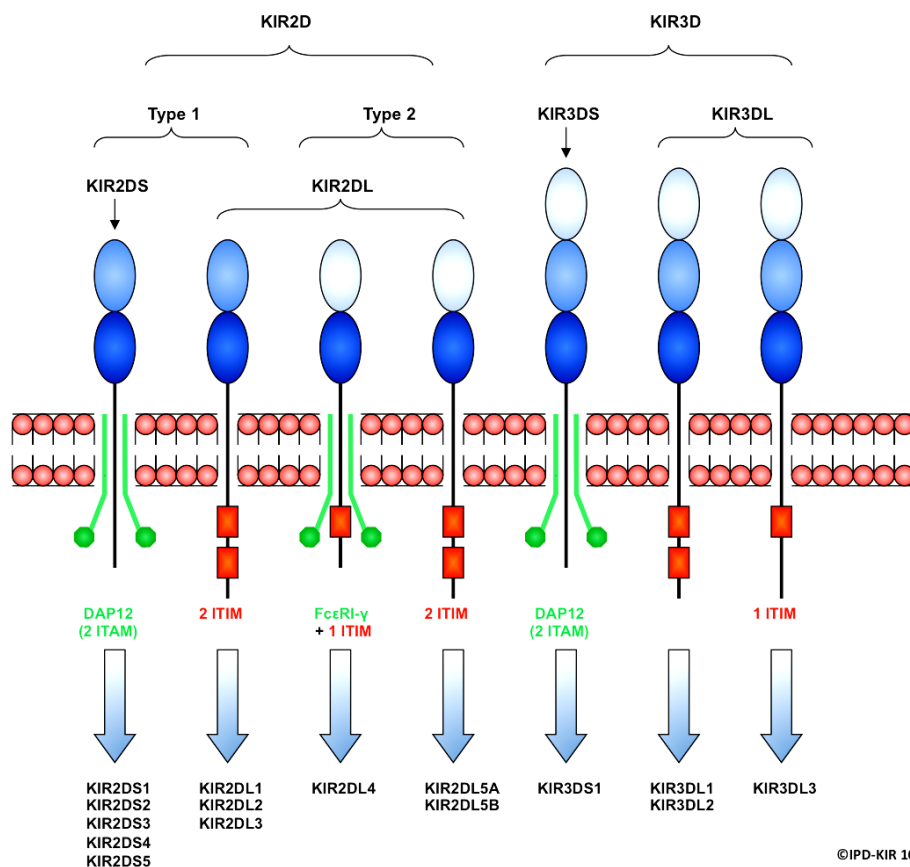
### 1.6.2 Família dos receptores KIR e sua nomenclatura

Os receptores KIR são codificados por uma família multigênica altamente polimórfica localizada na região cromossômica 19q13.47, dentro do Complexo de Receptores Leucocitários (LCR). Esses receptores são expressos pelas células NK e subtipos de células T ( $\gamma\delta$ ,  $\alpha\beta$  efetora e de memória) (Hansen *et al.* 2007). Dos 16 genes KIR conhecidos, sete codificam os receptores inibidores KIR2DL1-3, KIR2DL5 e KIR3DL1-3, seis codificam os receptores ativadores KIR2DS1-5 e KIR3DS1, um codifica o receptor ativador/inibidor KIR2DL4 e dois são pseudogenes, KIR2DP1 e KIR3DP1, que não codificam um receptor funcional. Os genes estão dispostos *em tandem* em um segmento de 100 a 200 kb de DNA (Carrington e Norman 2003; Trowsdale 2001). Em

virtude do elevado polimorfismo encontrado nessa família, a sequência genômica completa dos genes KIR varia de 4 a 16kb, apresentando de 4 a 9 éxons (Vilches e Parham 2002).

O sistema de nomenclatura da Organização Genoma Humano (da sigla em inglês HUGO - *Human Genome Organization*) é o designado para nomear os genes KIR e seus alelos (Marsh *et al.* 2003). Essa nomeação é baseada em duas características: a primeira é o número de domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina denominada pela letra “D” (dois domínios é designada como 2D e três domínios é designada como 3D, ex: KIR2D ou KIR3D) (Figura 1.11). A segunda característica é o tamanho e a constituição da cauda citoplasmática, a qual pode ser longa designada pela letra “L” (do inglês, *long*; ex: KIR2DL) ou curta, designada pela letra “S” (do inglês, *short*; ex: KIR2DS) (Figura 1.11). Os números de 1 a 5 após o sufixo S ou L foram sendo denominados à medida que os genes foram sendo descobertos, por exemplo o gene KIR2DL1 é um loco KIR que codifica para dois domínios extracelulares de imunoglobulina (“2D”), um segmento citoplasmático longo (“L”) e é o primeiro loco KIR descrito (“1”) com essas características (Marsh *et al.* 2003) (Figura 1.12).

De um modo geral, as moléculas KIR que possuem caudas citoplasmáticas longas promovem sinais inibidores em virtude da presença de Imunorreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina conhecida pela sigla ITIM (do inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*), responsáveis pela sinalização de inibição da transdução dos sinais ativadores nas células NK (Abeyweera *et al.* 2011) (Figura 1.12). Em contrapartida, as caudas citoplasmáticas curtas promovem sinais ativadores, em função da presença de Imunorreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina conhecida pela sigla ITAM (do inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) que, associados com uma proteína de sinalização acessória denominada DAP12, induzem a sinalização intracelular acarretando na ativação e diferenciação das células NK, levando à liberação dos grânulos citotóxicos (Mason *et al.* 2000) (Figura 1.12). O receptor KIR2DL4 é conhecido como o único apresentando função inibidora e ativadora (Maxwell *et al.* 2002) (Figura 1.12). Os pseudogenes KIR são identificados pela letra “P” logo após o dígito correspondente ao tipo de domínio, só havendo o KIR2DP e o KIR3DP.



**Figura 1.12:** Estrutura esquemática dos receptores KIR. As moléculas adaptadoras do KIR ativador estão mostradas em verde, enquanto que as moléculas ITIM do KIR inibidor estão mostradas em vermelho. Fonte: Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>

Como demonstrado na Figura 1.13, após a nomeação dessas duas características, é usado o asterisco como separador antes do código numérico que designará o alelo. Os três primeiros números deste código designam os alelos que diferem nas sequências de aminoácidos das proteínas que codificam (mutações não sinônimas). Os dois números subsequentes são utilizados para distinguir alelos que somente diferem entre si por uma ou mais mudanças sinônimas dentro da região codificante do gene (por serem substituições sinônimas não alteram as sequências de aminoácidos). Os dois últimos números distinguem alelos que diferem entre si por mudanças nucleotídicas numa região

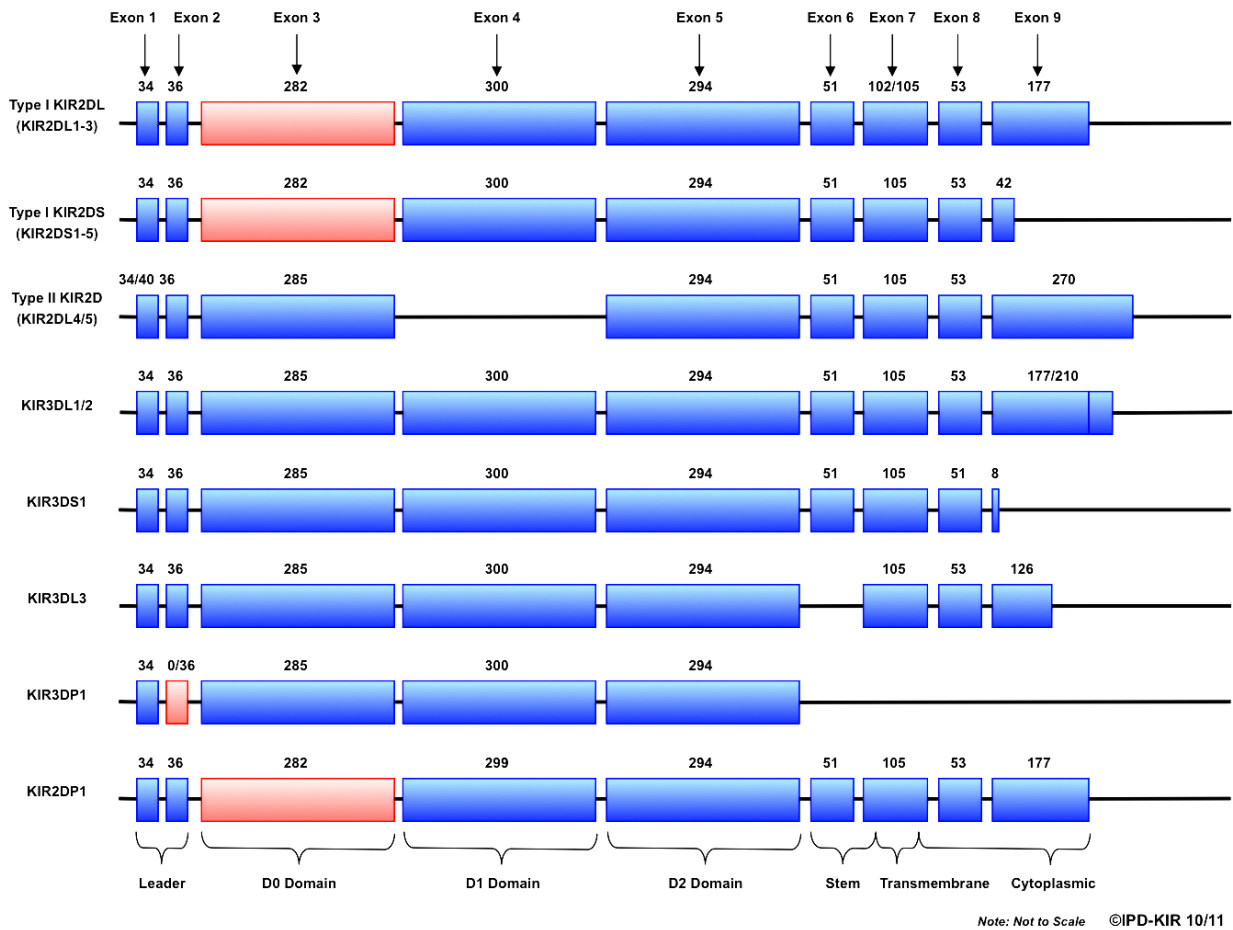
não codificante da sequência do gene, como introns e promotor (Marsh *et al.* 2003) (Figura 1.13).



**Figura 1.13:** Nomenclatura dos genes KIR adotada pelo HUGO. Fonte: adaptado de Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>

### 1.6.3 Organização genética do KIR e sua extensa variabilidade

O arranjo estrutural da maioria dos genes KIR consiste na organização mostrada na figura 1.14. Os dois primeiros éxons codificam as sequências sinais ou líderes. Os domínios semelhantes a imunoglobulinas D0 (pseudoéxon), D1 e D2, são codificados pelos éxons três, quatro e cinco, respectivamente. O éxon seis codifica a região de inserção da molécula na membrana plasmática, e o éxon sete codifica a região transmembrana. Por último, os éxons oito e nove codificam os domínios citoplasmáticos (Wilson MJ *et al.*, 1997).



**Figura 1.14:** Organização dos genes KIR. As regiões codificantes estão representadas pelas caixas azuis e seu tamanho em pares de bases (pb) acima das caixas. O exon 3 não expresso do gene KIR2DP1 e o exon 2 que por estar deletado no gene KIR3DP1 são mostrados em vermelho. Fonte: Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>

A ampla variabilidade das moléculas KIR pode ser observada: na diversidade alélica, na diversidade haplotípica, ou seja, haplótipos que carregam diferentes genes em diferentes números, bem como a combinação dos haplótipos herdados pelos pais, e, por fim, na presença ou ausência de genes KIR. Desta maneira, assim como se observa para o genótipo HLA, dificilmente, exceto para gêmeos monozigóticos, dois indivíduos apresentarão o mesmo perfil genético de KIR. Sendo diplóides, os seres humanos

normalmente têm duas cópias de cada gene autossômico, um por cromossomo. No entanto, a família de genes KIR viola esta regra básica devido à intensa recombinação e duplicação que ocorre ao longo do cromossomo, podendo resultar na existência de genes duplicados em um haplótipo ou até mesmo a deleção de alguns genes (Rajalingam 2011; Parham 2005; Uhrberg *et al.*2002; Wilson *et al.*2000).

Até o presente momento, de acordo com o banco de dados público *Allele frequencies* (Gonzalez-Galarza *et al.* 2011; Middleton *et al.* 2003) disponível em [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net), o repertório genético de KIR compreende 553 perfis diferentes, provenientes de 18.312 indivíduos pertencentes a 151 populações de diferentes regiões geográficas e etnias. As análises de tipagem genética convencionais não conseguem demonstrar o estado de homozigose ou hemizigose dos diferentes genes KIR que constituem o genótipo. Portanto, na prática o termo mais utilizado é “repertório KIR” (também chamado “perfil KIR”) o qual descreve a presença de todos os genes KIR observados num indivíduo, sem detalhar se estes *loci* KIR encontram-se em estado homozigótico (presentes nos dois cromossomos) ou hemizigótico (presente somente num dos dois cromossomos).

Essa elevada variabilidade também se reflete na expressão destes receptores KIR nas células. A expressão clonal desses genes resulta de uma seleção combinatória, na qual cada uma das células adquire, ao longo do seu desenvolvimento na medula óssea, um conjunto de receptores KIR que pode variar de um a todos os genes funcionais existentes no genótipo do indivíduo. Essa recombinação pode ser a mais variada possível e este fenótipo adquirido permanece estável na célula NK durante toda sua vida (Uhrberg *et al.* 2005). Logo, nem todas as células NK de um indivíduo apresentam os mesmos receptores. Essa expressão diferencial entre as células NK pode contribuir para a heterogeneidade nos níveis de ativação das células NK, observada tanto entre diferentes indivíduos quanto entre diferentes subpopulações de células NK de um mesmo indivíduo. Além disso, determinadas interações KIR/HLA também contribuem para essa heterogeneidade (Kim *et al.* 2008). Contudo, os mecanismos moleculares que regulam a expressão e distribuição celular dos receptores KIR para assim gerar diferentes repertórios nas células NK ainda não são bem compreendidos. Entretanto, mecanismos epigenéticos, como a metilação de citosinas nos dinucleotídeos CpG, tem sido o principal

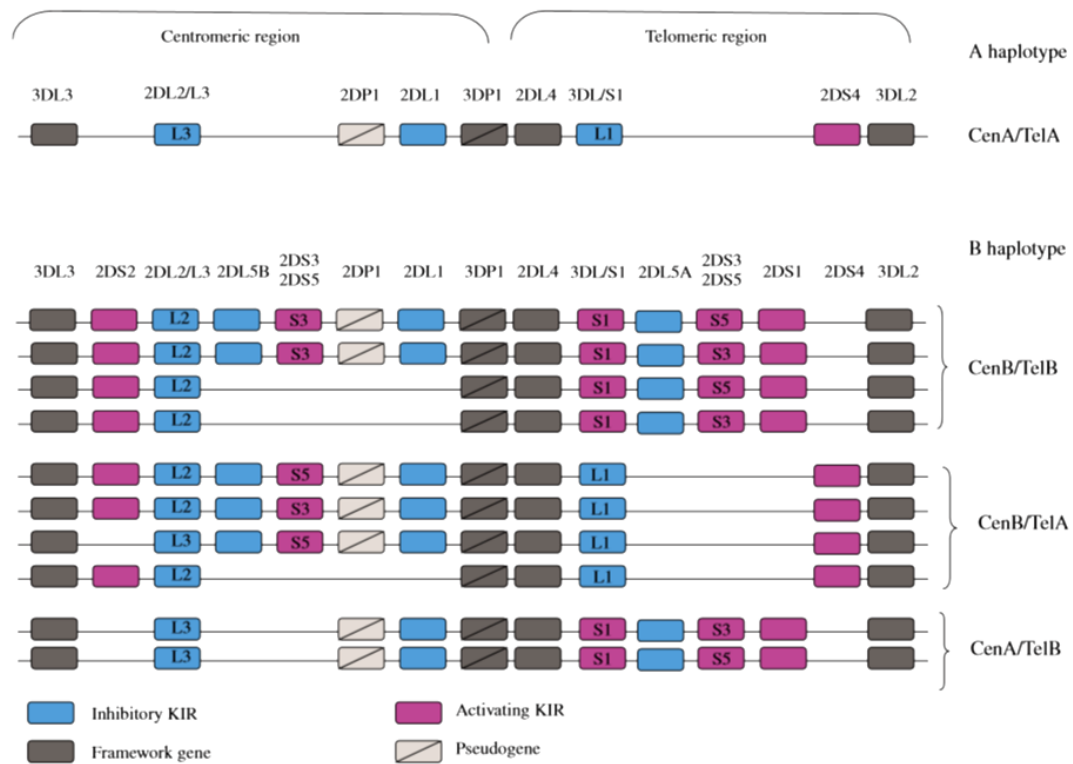
mecanismo encontrado para explicar a transcrição diferenciadas dos genes KIR (Gardiner 2008).

Os genes KIR formam diferentes haplótipos, que são um conjunto de genes do mesmo cromossomo herdados em bloco. Esses haplótipos podem ser classificados em dois haplogrupos distintos (A e B) de acordo com o conteúdo gênico (Figura 1.15). Em todos os haplótipos KIR descritos é possível observar o flanqueamento na região centromérica e telomérica pelo KIR3DL3 e KIR3DL2, respectivamente, e na região central a presença do KIR3DP1 e KIR2DL4.

Os haplótipos do grupo A contêm nove genes KIR e têm como característica a presença de somente um gene que codifica um receptor ativador, o KIR2DS4 (Vendelbosch *et al.* 2015). Esse haplótipo tem baixa variabilidade genética, mas apresenta vários genes com grande diversidade alélica. Foi relatado que alguns indivíduos apresentam variantes alélicas do KIR2DS4 não funcionais (Vendelbosch *et al.* 2015), no qual as proteínas são transcritas, mas não são expressas na superfície da célula devido a uma deleção de 22 pb no éxon 5 após o domínio D2 (Middleton e Gonzalez 2007; Middleton *et al.* 2005). A ausência de domínio citoplasmático e transmembranar unido a uma alta frequência deste alelo nas populações humanas sugerem a possibilidade desta proteína KIR ser secretada pelas células NK (Vendelbosch *et al.* 2015).

O haplótipo B tem entre um a cinco genes que codificam receptores ativadores e apresenta extrema diversidade em termos de conteúdo gênico, entretanto possui menor variabilidade alélica. Acredita-se que os receptores inibidores são relativamente mais polimórficos, enquanto os receptores ativadores são mais conservados (Vendelbosch *et al.* 2015). Os genes KIR3DL3, KIR3DL2, KIR2DL4 e KIR3DP1 estão presentes em ambos os haplótipos e por isso são denominados de *framework* (genes estruturais ou genes moldura) (Figura 1.15) (Vendelbosch *et al.* 2015).





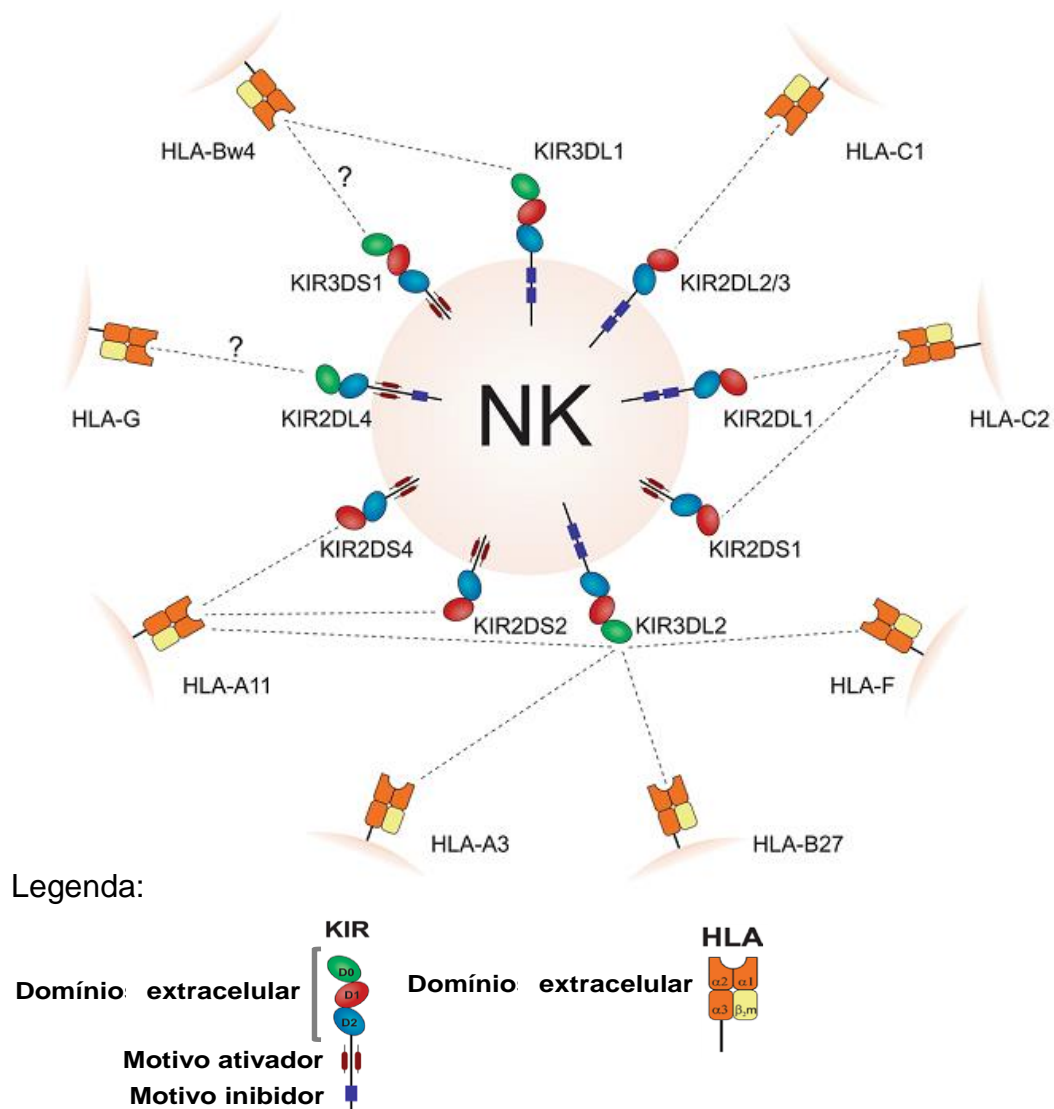
**Figura 1.15:** Organização do conjunto de genes KIR e representação dos haplótipos A e B. Fonte: Falco *et al.* 2013.

#### 1.6.4 Interações entre receptores KIR e seus ligantes

Para vários receptores KIR ainda não se conhece os ligantes. Entretanto, os ligantes considerados mais importantes são as moléculas HLA-C em virtude de reconhecerem a maioria dos genes KIR (Figura 1.16). A molécula HLA que possui o epítipo C1, compartilhados pelos alelos que codificam Ser77Asn80 (Cw1, w3, w7, w8 e outros alelos relacionados) são reconhecidos pelos KIR inibidores, KIR2DL2 e KIR2DL3, enquanto que o HLA que possui o epítipo C2, compartilhado pelos alelos que codificam Asn77Lys80 (Cw2, w4, w5, w6 e outros alelos relacionados), é reconhecido pelo KIR inibidor KIR2DL1 (Kulkarni *et al.* 2008). A posição 44 no domínio D1 dos genes KIR parece determinar sua habilidade em discriminar entre os dois grupos de HLA-C (Winter e Long 1997). Entretanto, estudos *in vitro*, sugerem que os KIR ativadores 2DL2 e 2DL3 possam também ligar fracamente alguns alotipos HLA-C2 (Moesta *et al.* 2008).

Outro receptor KIR cujo ligante está bem definido é o KIR3DL1, que reconhece o HLA-B com epítipo Bw4 (Cella *et al.* 1994), no entanto uma baixa afinidade com o epítipo Bw6 já foi relatado (Carr *et al.* 2005). Outros KIR têm especificidades menos definidas, como KIR3DL2, que reconhece algumas variantes de HLA-A, como o A3 e o A11 (Döhning *et al.* 1996) ou não têm nenhum ligante conhecido até o momento. Apesar do receptor KIR2DL4 apresentar cauda intracitoplasmática longa, essa molécula é atípica. Isso deve-se ao fato de que este receptor é o único capaz de transmitir tanto sinais ativadores quanto inibidores (Augusto e Petzl-Erler 2015; Moradi *et al.* 2015). A molécula HLA-G vem sendo sugerida como seu ligante (Wiśniewski *et al.* 2015; Rajagopalan *et al.* 2006), porém há estudos que não corroboram esta interação (Moradi *et al.* 2015; Le Page *et al.* 2014). Dessa forma, a importância biológica do KIR2DL4 e seu possível ligante HLA-G ainda não foi totalmente esclarecida.

Apesar dos receptores KIR ativadores apresentarem uma estrutura de reconhecimento do ligante muito semelhante à dos receptores inibidores, como no par 2DL1/2DS1 e no trio 2DL2/2DL3/2DS2, a afinidade de ligação das variantes ativadoras é fortemente reduzida em comparação às variantes inibidoras. Por isso, quando há ligação de receptores inibidores e ativadores ao mesmo tempo, acredita-se que o sinal inibidor prevaleça.



**Figura 1.16:** Interações entre os receptores KIR e seus respectivos ligantes HLA-I. Fonte: adaptado de Augusto e Petzl-Erler 2015.

É importante salientar que os genes KIR e os genes HLA de classe I estão mapeados em cromossomos diferentes (cromossomo 19 e cromossomo 6, respectivamente), assim, a herança de ambos os genes é independente. Conseqüentemente, um determinado KIR ou o seu ligante HLA específico pode estar ausente em um indivíduo, acarretando uma situação funcional nula (Carrington e Norman 2003). Entretanto, o papel central atribuído à interação KIR-HLA na modulação das respostas imunes sugere que estes genes evoluíram conjuntamente, mantendo relações

funcionais apropriadas, de modo que algumas moléculas codificadas por determinados alelos KIR possuam maior ou menor afinidade às moléculas HLA (Gendzekhadze *et al.* 2009).

### **1.6.5 Associação entre KIR e doenças**

Diversos motivos têm despertado o crescente interesse da comunidade científica em avaliar uma potencial associação entre os genes KIR e doenças humanas. Em síntese, tais motivos são relacionados à variabilidade destes genes, ao papel funcional destes receptores, bem como à heterogeneidade de resposta das células NK mediante a interação com o ligante HLA-I presente na célula alvo. A partir da importância imunológica e sua diversidade genética, estudos de associação entre os genes KIR e/ou KIR-ligantes vêm sendo realizados, a fim de entender sua participação no desenvolvimento de doenças como autoimunes, câncer e infecções (Hou *et al.* 2015; De Re *et al.* 2015; Giebel *et al.* 2014; Jarduli *et al.* 2014; Kulkarni *et al.* 2008).

Nas doenças autoimunes, acredita-se que o componente genético em geral responsável pelo aumento da susceptibilidade seja um excesso da combinação ativadora KIR–HLA de classe I nos indivíduos afetados em comparação com o grupo controle. Estudos envolvendo indivíduos acometidos por psoríase vulgar, doença inflamatória de pele comum, foi observada uma elevada frequência do gene ativador KIR2DS1 sozinho ou com seu ligante HLA-Cw6 (Łuszczek *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2004), enquanto que na psoríase artropática, uma desordem inflamatória menos frequente, foi observada associação entre outro KIR ativador, o KIR2DS2 (Chandran *et al.* 2014). Recentemente, foi encontrado uma associação entre KIR2DS1 e o lúpus eritromatoso sistêmico (Hou *et al.* 2015).

Nas doenças infecciosas, estudos apontam que a interação entre receptores KIR e ligantes do grupo HLA-Cw1 tem um papel importante na progressão da hepatite pelo vírus da hepatite C (HCV, da sigla em inglês, *Hepatitis C Virus*). A maior frequência dos indivíduos homozigotos para KIR2DL3 e seus ligantes do grupo HLA-Cw1 foi observada em indivíduos que respondiam bem ao tratamento, baixando os níveis de viremia (Vidal-Castiñeira *et al.* 2010). Por outro lado, a maior frequência dos genótipos KIR2DS2 e

KIR2DL2 está associada à susceptibilidade a infecção por hepatite C crônica, enquanto que uma associação da presença de KIR2DS3 e ausência de KIR2DS5 é encontrada em pacientes com baixas viremias (Kuśnierczyk *et al.* 2015). Em relação à hepatite pelo vírus da Hepatite B (HBV, da sigla em inglês, *Hepatitis B Virus*), foi observado que a combinação entre os genes KIR2DL3 e KIR3DS1 pode estar associada à proteção (Kibar *et al.* 2014). Na infecção pelo HIV (da sigla em inglês, *Human Immunodeficiency Virus*), os genes HLA de classe I amplamente aceitos como protetores são aqueles que compartilham o epítipo público Bw4, especialmente os alelos B\*27 e B\*57 (Hernández-Ramírez *et al.* 2015). Desta forma, estudos demonstraram que a progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é mais lenta nos pacientes que possuem associações epistáticas entre os receptores KIR3DL1 e KIR3DS1, e seu ligante comum HLA-Bw4 quando comparado a indivíduos que apresentam HLA-Bw6 (Hernández-Ramírez *et al.* 2015). Para a doença de Chagas, a combinação do receptor ativador KIR2DS2 com seu ligante HLA-C1 na ausência do KIR2DL2 foi demonstrado como marcador de risco da forma crônica da doença (Ayo *et al.* 2015). Em pacientes com tuberculose foi observada uma elevada frequência dos receptores inibidores KIR2DL3 em homozigose combinados com HLA-C1 (alelo C\*03) (Habegger de Sorrentino *et al.* 2014)

Quando o enfoque é malária, dados da literatura são muito escassos. Em 2003, Artavanis-Tsakonas e colaboradores descreveram, *in vitro*, pela primeira vez, o possível envolvimento dos receptores KIR na ativação de células NK frente a hemácias infectadas por *P. falciparum*. Resultado esse intrigante, visto que as hemácias não expressam, em sua superfície, os principais ligantes conhecidos dos receptores KIR, que são as moléculas HLA-I. Observaram, ainda, que as células NK que apresentavam o alelo KIR3DL2\*002 secretavam altos níveis de IFN- $\gamma$  em relação às demais. Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que linhagens de células NK são capazes de formar rosetas com hemácias infectadas com *P. falciparum*, proporcionando a liberação de citocinas (Chen *et al.* 2014; Baratin *et al.* 2005; Roetyneck *et al.* 2006; Korbel *et al.* 2005). Em virtude da falta de expressão de HLA-I nas hemácias, esses resultados sugerem que essa interação seja mediada por ligantes não HLA-I como proteínas plasmodiais expressas na superfície das hemácias (Roetyneck *et al.* 2006). O primeiro trabalho associando malária aos receptores KIR é recente, e foi desenvolvido por Taniguchi e Kawabata em 2009.

Nesse estudo, eles relataram uma maior frequência dos genes KIR3DL1/S1 e KIR2DS4 nos indivíduos infectados por *P. falciparum* (Taniguchi e Kawabata 2009). Posteriormente, estudos realizados em diferentes populações expostas a malária, como na Nigéria, Gâmbia, Quênia, Tailândia, Índia e Ilhas Salomão, demonstraram associações entre os genes KIR e seus ligantes HLA com susceptibilidade à infecção (Olaniyan *et al.* 2014; Omosun *et al.* 2012; Hirayasu *et al.* 2012; Yindom *et al.* 2012; Lourembam *et al.* 2011). No Brasil, o nosso grupo foi pioneiro na caracterização dos perfis genéticos de KIR e seus ligantes HLA-I, bem como na investigação de possíveis marcadores genéticos, em indivíduos naturalmente expostos à malária residentes em comunidades de Porto Velho, Rondônia (Perce-da-Silva *et al.* 2015 – Anexo 1) e este estudo constitui parte integrante desta tese de doutorado.

### **1.7 Marcadores de ancestralidade**

A composição de grupos étnicos distintos encontrados na população brasileira é resultado de um longo processo de miscigenação, em virtude de cinco séculos de contribuições étnicas adquiridas por colonos europeus, escravos africanos e nativos ameríndios (Fridman *et al.* 2014). O território brasileiro não apresenta homogeneidade étnica, mas sim, há predominância de alguns grupos e essa distribuição dos principais grupos étnicos foi consequência do povoamento distinto das regiões do país.

Recentes estudos vêm demonstrando que indicadores de aparência física, como cor da pele e autodeclaração étnica são considerados pobres descritores da ancestralidade genômica de uma população (Cardena *et al.* 2013). Dessa forma, faz-se necessário a análise de ancestralidade através de marcadores genéticos designados Marcadores Informativos de Ancestralidade (da sigla em inglês *AIMs*, *Ancestry Informative Markers*) que capturam diferenças nas frequências alélicas entre populações (européias, africanas e ameríndias) e, assim, possam atribuir a ancestralidade de um indivíduo.

A investigação dos perfis de ascendência genética das populações humanas é uma ferramenta valiosa para entender a dinâmica das migrações e eventos de colonização, bem como para determinar os padrões de mistura dentro de populações

(Manta *et al.* 2013). A descoberta e validação de um grande número de Polimorfismos de Base Única (da sigla em inglês, SNP -*Single Nucleotide Polymorphisms*) em humanos vem proporcionando o desenvolvimento de diferentes painéis de *AIMs* que envolvem diversos marcadores (Li *et al.* 2014; Manta *et al.* 2013; Nievergelt *et al.* 2013; Santos *et al.* 2010). No entanto, alguns autores defendem que quanto mais distantes geneticamente, menor o número de marcadores necessários para diferenciar duas populações. Logo, marcadores bem selecionados apresentam a mesma capacidade de discriminação do que conjuntos maiores de marcadores (Lins *et al.* 2010; Kosoy *et al.* 2009).

No caso específico dos estudos genéticos de associação, em especial aqueles que são desenvolvidos em amostras de populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira, a distribuição destes perfis de ancestralidade deve ser considerada (Augusto *et al.* 2015; Tomaz *et al.* 2015). Faz-se necessário avaliar possíveis variações associadas ao *background* genético de cada população, a fim de evitar interpretações errôneas dos dados genéticos, gerando associações espúrias ou ainda subestimando o efeito dos genes/alelos sob análise (Manta *et al.* 2013). Para eliminar o efeito desta variável, os estudos genéticos de associação comumente incluem a genotipagem de *AIMs* como marcadores ideais para estimativas eficazes de mistura populacional.

## 2. Justificativa

---

A malária, segundo a OMS, ainda é a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo (WHO, 2014). Apesar dos esforços, o controle da malária ainda é um desafio. Dessa maneira, indivíduos residentes em área endêmica estão em constante risco de contrair a doença. A proteção clínica, bem como os mecanismos exatos envolvidos na patogênese são, ainda hoje, pouco compreendidos. Dentre os inúmeros fatores que influenciam na aquisição de imunidade, os fatores genéticos do hospedeiro têm um papel fundamental tanto na suscetibilidade como na evolução clínica da infecção.

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e as células NK são uma importante subpopulação de linfócitos atuantes na fase aguda da resposta imunológica na malária. Além disso, essas células também são importantes no desencadeamento das respostas imunológicas adaptativas contra malária (McCall e Sauerwein 2010; McCall *et al.* 2010). O controle da ação das células NK se dá através de receptores de membrana, entre os quais estão os receptores KIR, que reconhecem moléculas HLA de classe I expressas pela maioria das células do organismo. O extenso polimorfismo genético dos receptores KIR, assim como a regulação da sua expressão em diferentes clones de células NK são fatores importantes no delineamento da resposta imune inata e adaptativa de cada indivíduo.

O interesse pelo estudo da família gênica dos receptores KIR tem aumentado nos últimos anos e muitos trabalhos vêm demonstrando sua eficiência como bons marcadores genéticos em estudos de associação com doenças (De Re *et al.* 2015; Hou *et al.* 2015). Além disso, são bastante utilizados em estudos populacionais para a compreensão da história biológica e evolutiva das populações (Augusto e Petzl-Erler 2015; Manser *et al.* 2015; Moffett e Colucci 2015). Deste modo, o conhecimento da distribuição da frequência gênica dos receptores KIR e de seus ligantes HLA de classe I em populações de área endêmica de malária é essencial para o entendimento de seu papel na regulação da resposta imune, na relação com a incidência e a evolução clínica da doença.



### **3. Objetivos**

---

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os perfis da diversidade gênica dos receptores KIR e seus ligantes HLA (-A, -B e -C) de indivíduos residentes em área endêmica brasileira e verificar a influência desses como possíveis marcadores na infecção malárica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o perfil da frequência gênica e haplotípica do repertório de KIR nos indivíduos expostos a malária residentes em área endêmica da Amazônia Brasileira;
- Analisar a distribuição da variabilidade dos genes KIR e seus ligantes HLA (-A, -B e -C) na população estudada em relação à ancestralidade genética, por meio de marcadores informativos de ancestralidade (*AIMs*);
- Investigar a possível influência dos genes KIR e dos seus ligantes HLA (-A, -B e -C) sobre a susceptibilidade à malária através da análise de associação entre estes genes e parâmetros epidemiológicos como: número de malárias anteriores, tempo de residência em área endêmica de malária e espécies infectantes anteriores;
- Avaliar a influência do perfil gênico dos receptores KIR e de seus ligantes HLA (-A, -B e -C) sobre a infecção malárica através da análise de associação entre esses genes, parâmetros epidemiológicos e níveis plasmáticos de citocinas dos pacientes com malária.

## **4. Material e métodos**

---

### **4.1 Área estudada**

Frente à sua importância epidemiológica como área endêmica de malária, o município de Porto Velho e seus arredores (margens do rio Madeira e alguns dos seus afluentes) foram as áreas escolhidas para esse estudo. Durante os anos de coleta do nosso estudo, que foram 2001, 2002 e 2007, Porto Velho apresentou o IPA de 41, 41 e 85, respectivamente. Em 2014, foram notificados 6.640 casos de malária em Porto Velho e, destes, 85,7% foram causados por *P. vivax*, seguido de 13,8% por *P. falciparum* e 0,5% por infecções mistas (Sivep-Malária/SVS/MS).

### **4.2 Voluntários e Aspectos Éticos da Pesquisa**

As amostras utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram coletadas por diferentes pesquisadores, no contexto de um macroprojeto intitulado “Influência do polimorfismo do hospedeiro (KIR/HLA/TNFr/CYP) e de proteínas de *P. vivax* e *P. falciparum* candidatas à vacina antimalárica na resposta imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção”. Essa população é composta por indivíduos residentes às margens do rio Madeira e alguns de seus afluentes, como os rios Candeias e Jamari, e por indivíduos residentes em área rural, constituída por estradas de barro denominadas de “Linhas” (perpendiculares à BR 364), que penetram por dezenas de quilômetros no interior da floresta (Figura 4.1).

Os indivíduos foram classificados quanto à presença ou não da infecção malárica no momento da coleta, em grupo de indivíduos com malária e sem malária, e, ainda, os grupos dos indivíduos com malária foram subdivididos de acordo com a espécie plasmodial infectante. Essa classificação deu origem ao grupo *P. vivax* (Grupo Pv) e ao grupo *P. falciparum* (Grupo Pf). Na análise dos níveis plasmáticos das citocinas produzidos pelos indivíduos infectados, dividimos os grupos em produtores de citocinas pró-inflamatórias, produtores de citocinas anti-inflamatórias e produtores de quimiocinas. Um grupo controle (N=12) foi criado para análises dos níveis plasmáticos de citocinas.

Este grupo era composto de indivíduos residentes no centro de Porto Velho, apresentavam exame negativo para malária (gota espessa e PCR), com idade superior a 10 anos, sem história pregressa de malária.



**Figura 4.1:** Área endêmica e população de área rural (“linhas”) do município de Porto Velho, Rondônia.

#### ***4.2.1 Critérios de elegibilidade***

Foram estabelecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão no estudo:

a) Inclusão:

- Residentes em Porto Velho e seus arredores
- Idade superior a 10 anos
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado antes de qualquer procedimento

b) Exclusão:

- Populações indígenas
- Militares
- Presidiários
- Deficientes intelectuais
- Gestantes, parturientes e lactantes

Os voluntários selecionados foram informados sobre as formas de transmissão da malária, os seus métodos profiláticos e sobre o projeto de pesquisa em desenvolvimento. Após o consentimento dos indivíduos, foi obtida a assinatura no TCLE do voluntário ou de seu responsável formalizando a sua participação no projeto (Anexo 2). Em seguida, os voluntários participaram de uma entrevista para obtenção de dados gerais, como nome e idade, e dados de caráter epidemiológico, como tempo de residência em área endêmica de malária, tempo desde a última malária, número de malárias anteriores, características da moradia e das atividades do dia a dia, dentre outros (Anexo 3).

O protocolo de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz- CEP/FIOCRUZ – Registro nº 354/06 (Anexo 4)

#### **4.3 Coleta de sangue**

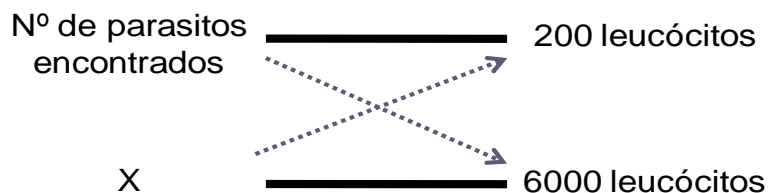
Após a assinatura do termo de consentimento de participação no projeto de pesquisa e do preenchimento do questionário com os dados epidemiológicos e as informações pessoais do indivíduo, foram coletadas amostras de sangue por punção endovenosa com o sistema a vácuo de coleta, utilizando tubos do tipo vacutainer (Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, USA) contendo EDTA (10 mL de sangue) para extração de DNA. No campo, em Porto Velho, as amostras de sangue foram centrifugadas (3500 x g) por 10 min para a separação do plasma dos elementos figurados do sangue. O sedimento (papa de hemácias e leucócitos) e o plasma foram distribuídos

em alíquotas de 1 e 5 mL, respectivamente, congelados a -20°C e transportados em gelo seco para a Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro.

#### 4.4 Diagnóstico parasitológico e avaliação da parasitemia

O diagnóstico parasitológico de malária foi feito por meio de lâminas de distensão sanguínea e gota espessa coradas com Giemsa (Sigma Chemical CO, St Louis, USA). O diagnóstico foi realizado em todos os indivíduos que participaram do estudo. A parasitemia foi calculada através do método de avaliação relativa à contagem de leucócitos na gota espessa. Esse método visa realizar a contagem do número de parasitos (considerando todas as espécies e estágios presentes) até alcançar 200 leucócitos.

Assumindo uma leucometria média de 6.000 leucócitos/ $\mu$ l de sangue para todo paciente com malária foi realizado uma regra de três para obter a parasitemia/ $\mu$ l de sangue. Se nove ou menos parasitas fossem encontrados, 300 leucócitos adicionais eram contados, a fim de obter uma maior precisão na parasitemia final destes pacientes.



Todos os voluntários diagnosticados com malária, logo após a coleta de sangue, foram submetidos ao tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil no ano da coleta

#### **4.5 Diagnóstico molecular do gênero Plasmodium e espécie infectante**

##### **4.5.1 Extração do DNA genômico**

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

##### **4.5.2 Identificação molecular do Plasmodium sp. nos indivíduos estudados**

Com a finalidade de confirmar o diagnóstico parasitológico, todas as amostras foram submetidas à amplificação por *Nested*-PCR (Tabelas 4.1 e 4.2) segundo o protocolo abaixo:

**Tabela 4.1:** Condições da reação de PCR e da ciclagem das regiões alvos do diagnóstico molecular de malária.

Condições da reação de PCR ( <i>Plasmodium</i> sp, <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> )*		Condições da ciclagem*	
Mix da reação	Concentração final	1 ciclo	95 °C - 5 min
<sup>a</sup> Iniciador (senso)	250 nM/μL	29 ciclos	58 °C - 2 min
<sup>a</sup> Iniciador (antisenso)	250 nM/μL		72 °C - 2 min
<sup>b</sup> Master mix	10 μL		94 °C - 1 min
Água	4 μL	1 ciclo	58 °C - 2 min
Amostra de DNA	1 μL	(extensão final)	72°C - 2 min
Volume final: 20μl		4°C - ∞	

a. Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA.; b. Promega, Madison, WI (Solução do *Master mix*: 0,3U taq DNA Polimerase, 200mM dATP, 200mM dGTP, 200mM dCTP, 200mM dTTP e 1,5mM MgCl<sub>2</sub>); Fonte: \*Snounouet *al.* 1993.

**Tabela 4.2:** Região alvo dos iniciadores utilizados no diagnóstico molecular, sequência nucleotídica dos iniciadores (senso e antisenso) e o respectivo tamanho do fragmento.

PCR	Região alvo (ssrRNA)	Iniciadores	Sequência nucleotídica	Tamanho do fragmento
<i>Nested</i> 1 <sup>a</sup> reação	<i>Plasmodium</i> sp.	rPLU5	5' -CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC- 3'	1200 pb
		rPLU6	5' -TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG- 3'	
<i>Nested</i> 2 <sup>a</sup> reação	<i>P. vivax</i>	rVIV1	5' -CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC- 3'	120 pb
		rVIV2	5' -TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT- 3'	
	<i>P. falciparum</i>	rFAL1	5' -TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'	205 pb
		rFAL2	5' -ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC- 3'	

Fonte: Snounouet *al.* 1993.

#### 4.6 Tipagem dos genes *KIR* e seus ligantes *HLA* de classe I

Essa etapa do trabalho foi feita em colaboração com Laboratório de Histocompatibilidade da UERJ.

#### **4.6.1 Quantificação do DNA**

A quantificação de DNA das amostras foi efetuada através de um método espectrofotométrico (260nm), com o equipamento NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA), usando o software NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Scientific). A leitura de densidade ótica determina a quantidade de DNA, a 260 nm, e a existência de substâncias contaminantes (majoritariamente proteínas), a 280 nm. A razão das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm deve ser entre 1,6 e 1,8, indicando que a amostra apresenta um grau de pureza adequada. A absorbância lida para 260 nm foi utilizada para a estimativa da concentração de DNA em ng/μl, a qual foi posteriormente ajustada para 20 ng/μl.

#### **4.6.2 Genotipagem do KIR e HLA de classe I**

Os 16 genes KIR e os grupos alélicos de HLA classe I (HLA-A, -B e -C) foram genotipados com o auxílio de dois kits comerciais: KIR SSO Genotyping Test e LABType SSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA, para ambos), respectivamente. Dessa maneira, a genotipagem foi realizada em cinco etapas (Figura 4.2), que são:

Etapa 1: Amplificação do DNA pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (da sigla em inglês PCR, *Polymerase Chain Reaction*) usando oligonucleotídeos iniciadores locus-específicos.

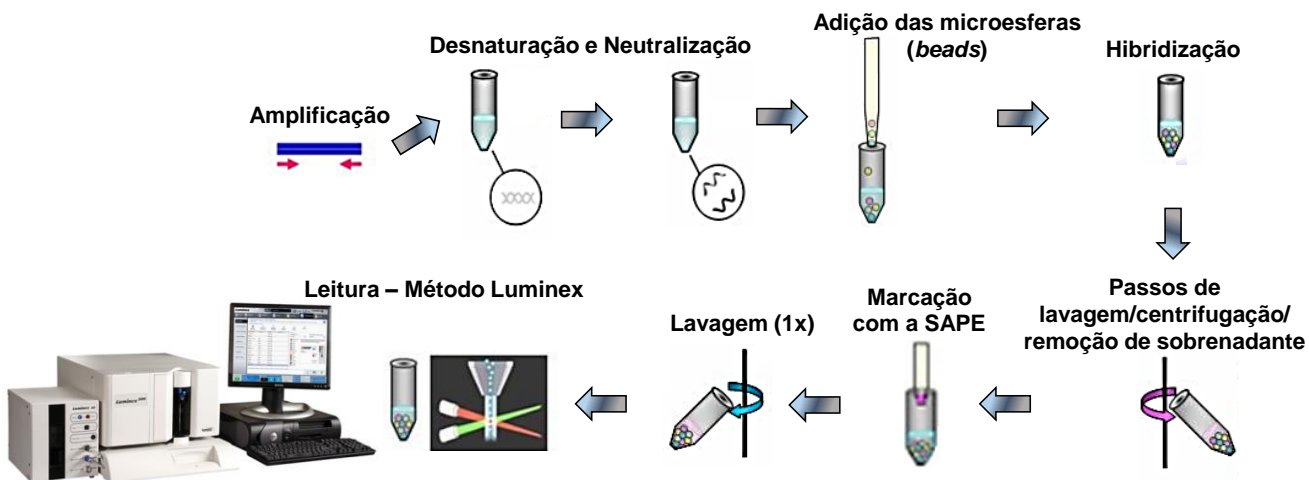
Etapa 2: Desnaturação e Neutralização do produto amplificado.

Etapa 3: Hibridização das microesferas (*beads*) codificadas fluorescentemente com sondas de Oligonucleotídeos Sequência-Específicos (da sigla em inglês SSO, *Sequence-Specific Oligonucleotide*).

Etapa 4: Marcação com a SAPE (estreptavidina conjugada com ficoeritrina)



Etapa 5: Leitura através de um analisador de fluxo LABScan™ 100 (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) para identificar a intensidade de fluorescência em cada microesfera.



**Figura 4.2:** Principais etapas da genotipagem dos genes KIR e HLA. Fonte: adaptado de [www.biometrix.com.br](http://www.biometrix.com.br)

#### 4.6.2.1 Amplificação do DNA genômico por PCR (Etapa 1)

A amplificação dos segmentos gênicos correspondentes às regiões codificantes dos genes KIR e HLA de classe I foi realizada através da técnica de PCR.

Para os genes KIR, cada amostra de DNA foi submetida a três diferentes reações de PCR, utilizando três pares diferentes de iniciadores lócus-específicos marcados com biotina. Um par de iniciador abrange os éxons 3 e 4, outro par compreende o éxon 5 e o terceiro par os éxons 7 a 9. Para os genes HLA de classe I foi utilizado somente um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos compreendendo toda a região alvo. Para a realização da técnica de PCR foi utilizada a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Já os iniciadores lócus-específicos, bem como os demais reagentes necessários para a reação (dNTPs, tampão da enzima e cofatores da enzima – solução D-Mix) foram fornecidas pelo fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador modelo GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O

protocolo da reação de PCR, bem como as condições de amplificação são mostradas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Condições da reação de PCR e da ciclagem das regiões alvos dos genes KIR e HLA de classe I.

Reagentes	Quantidade ( $\mu$ l)	Condições de amplificação	
D-Mix	13,8	1 ciclo	96°C - 3min
Primer	4,0		96°C - 20s
Taq Polimerase	0,2	5 ciclos	60°C - 20s
DNA	2		72°C - 20s
Volume final: 20 $\mu$ l		30 ciclos	60°C - 15s
			72°C - 20s
		1 ciclo	72°C - 20s
			4°C - $\infty$

Em seguida, 2 $\mu$ l do produto da PCR é aplicado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e expostos a luz ultravioleta (UV) para visualização dos fragmentos amplificados.

#### **4.6.2.2 Desnaturação/Neutralização (Etapa 2), Hibridização (Etapa 3) e Marcação com a SAPE (Etapa 4)**

Após a amplificação, foram transferidos 5 $\mu$ L de DNA amplificado para um poço estéril. Em seguida, foi adicionado o tampão de desnaturação (fornecido pelo fabricante) e homogeneizado com auxílio do vórtex. A placa foi incubada por 10 min a temperatura ambiente (entre 20 e 22°C), seguido da adição do tampão de neutralização (fornecido pelo fabricante) segundo as quantidades que constam na Tabela 4.4.

Após a neutralização, foi adicionado tampão de hibridização e as sondas ligadas a microesferas em cada poço. A placa foi selada e homogeneizada com auxílio do vórtex, seguida de um período de aquecimento a 60°C por 15 min no termociclador. Após o

aquecimento, foi adicionado o tampão de lavagem e a placa foi centrifugada por 5 min a 2700 rpm. O sobrenadante foi descartado por leve inversão e foram repetidos os passos de lavagens e centrifugação por mais duas vezes.

Após a centrifugação, foi adicionada a solução SAPE 1X (estreptavidina conjugada com ficoeritrina) nos poços, a placa foi selada e homogeneizada com auxílio de vórtex. A placa foi aquecida com o auxílio do termociclador por 5 min a temperatura de 60°C. Após o aquecimento, foi adicionado o tampão de lavagem, a placa foi selada, homogeneizada com o auxílio do vórtex e centrifugada por 5 min a 2700 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão e em seguida foi adicionado 70µl do tampão de lavagem em cada poço, o material foi transferido para uma placa de leitura e levada ao equipamento Luminex LABScanTM 100.

**Tabela 4.4:** Condições da reação de SSO.

Reagentes	Quantidade (µl)
Produto amplificado	5
Tampão de desnaturação	2,5
Tampão de neutralização	5
Tampão de hibridação	34
Tampão de lavagem	100/lavagem
Mistura das microesferas	4
SAPE 1X	50

#### ***4.6.2.3 Leitura pelo equipamento Luminex (Etapa 5)***

As reações foram lidas num analisador de fluxo LABScanTM 100, o qual emprega a tecnologia conhecida como Luminex. O laser de cor vermelha com comprimento de onda de 633 nm reconhece a cor da microesfera e outro laser verde, com comprimento de onda 532 nm, reconhece se esta microesfera está ou não marcada com SAPE, o que

determina sua positividade. Os resultados dos sinais fluorescentes foram analisados pelo software (LABTyper HD, LuminexR version 2.2) fornecido pelo fabricante do material utilizado.

#### **4.7 Análise da ancestralidade genética da população pela plataforma OpenArray®**

Essa etapa do trabalho foi feita em colaboração com Laboratório de Virologia Molecular Animal da UFRJ.

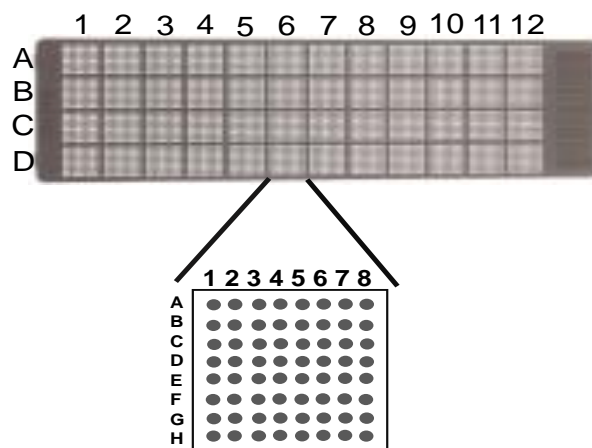
A análise de ancestralidade através de marcadores genéticos designados Marcadores Informativos de Ancestralidade (*AIMs*) capturam diferenças nas frequências alélicas entre populações (européias, africanas e ameríndias), foi realizada em 47% (137/377) da nossa população de estudo.

A tabela 4.5 mostra os 32 *SNPs* informativos de ancestralidade selecionados para o presente estudo. Dentre estes, 28 *SNPs* foram validados por Lins e colaboradores (2010) para uso em estimativas de ancestralidade europeia, africana e ameríndia em população brasileira e outros 4 *SNPs* adicionais foram selecionados a partir de uma lista ampliada descrita por Smith e colaboradores (2004). Os dados para a determinação dos padrões de frequência dos *SNPs* em populações representativas de ancestralidade europeia, africana e ameríndia foram obtidos através de dois bancos de dados públicos, o HapMap (International HapMap Project, 2011) e o 1000 genomas (The 1000 genomes Project Consortium, 2010).

**Tabela 4.5:** Marcadores (*SNPs*) informativos de ancestralidade selecionados para o presente estudo.

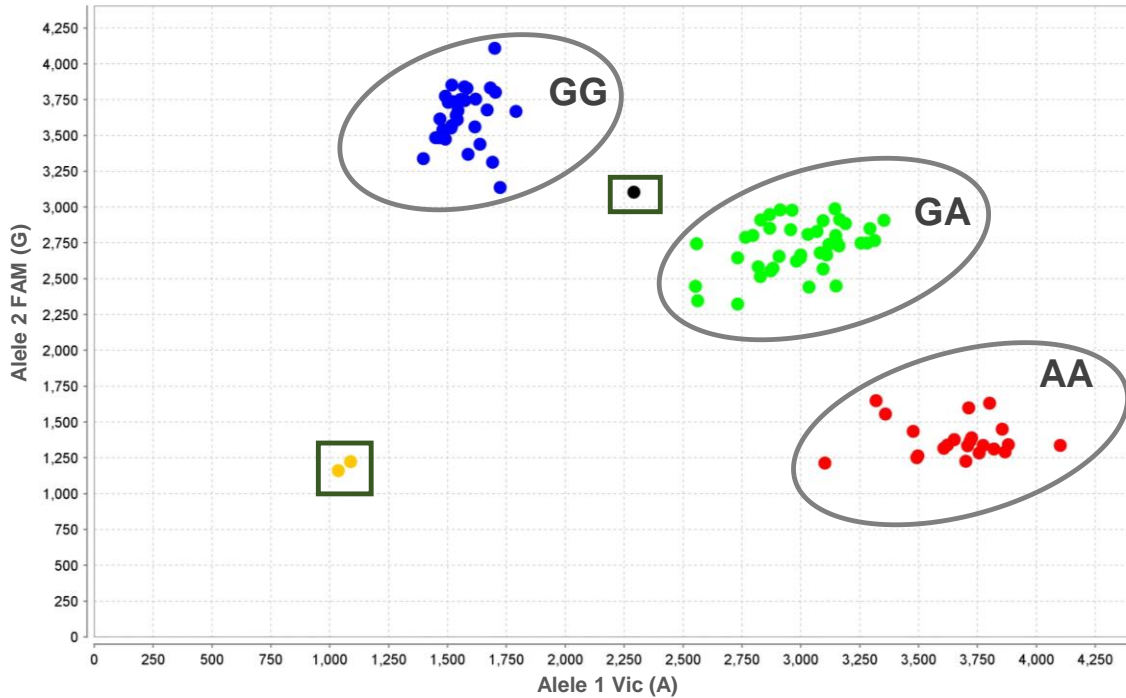
Região Cromossômica	Gene	SNP	Troca
15q21	Família Carreadora de Solute 24, membro 5 (SLC24A5)	rs1426654	A/G
1q32	Neurofascin	rs2065160	C/T
6q24	Utrophin	rs4305737	A/G
22q13	Aconitase 2, Mitochondrial	rs727563	A/G
15q26	Capping Protein (Actin Filament) Muscle Z-Line, Alpha 2 Pseudogene	rs734780	C/T
14q32	Delta-Like 1 Homolog	rs730570	A/G
15q13	HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2	rs1129038	A/G
1p36.3	Mitochondrial Ribosomal Protein L20	rs1240709	A/G
3p14	ADAM Metallopeptidase Thrombospondin Type1 Motif, 9	rs3796384	C/G
5p15.2	Rhopilin Associated Tail Protein 1-Like	rs2278354	G/T
8q13	Corticotropin Releasing Hormone	rs3176921	C/T
1q23	Duffy Blood Group, Chemokine Receptor	rs2814778	A/G
8p21	Lipoprotein Lipase	rs285	C/T
6q23	Phosphodiesterase 7B	rs1480642	C/T
20p12	Ribosome Binding Protein 1 Homolog	rs6034866	A/G
10p11.2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	rs7349	C/T
9q33	RAB Gtpase Activating Protein 1	rs803733	A/G
8q24.3	Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter), Member 4	rs1871534	C/G
6q16	Zinc Finger CCCH-Type Containing 14 Pseudogene	rs222541	C/G
5q22	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, D Pseudogene	rs267071	C/T
20q13.3	Chromosome 20 Open Reading Frame 195	rs310612	A/G
2p13	Cytochrome P450, Family 26, Subfamily B, Polypeptide 1	rs3768641	C/G
9q21	Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha 14	rs3780293	A/G
2q35	Tensin 1	rs3791896	A/G
13q22	TBC1 Domain Family, Member 4	rs4280128	A/G
12q24.2	Mrna-Harakiri, BCL2 Interacting Protein (Contains Only BH3 Domain), Transcript Variant 1	rs4766807	A/T
17q21	K(Lysine) Acetyltransferase 2A	rs730086	C/T
7p15	Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1 (Pituitary) Receptor Type I	rs736556	C/T
3q27	Enolase-Phosphatase 1 Pseudogene	rs3846193	G/T
Xq11.2	Mrna-Ankyrin Repeat And SOCS Box Containing 12	rs1414370	A/C
1p31	Keratin 8 Pseudogene 21	rs6662385	C/T
18p11.2	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, M	rs1941141	C/T

A genotipagem dos marcadores informativos de ancestralidade foi realizada com o auxílio da Plataforma OpenArray® (Applied Biosystems), que utiliza como base a metodologia TaqMan® de discriminação alélica. Nesta plataforma, as reações ocorrem em lâminas contendo um total de 3072 poços (Figura 4.3) para reações em volume final de 33nl.



**Figura 4.3:** Esquema representando uma lâmina de genotipagem por OpenArray®. Cada lâmina possui 48 subarranjos (A1 a D12) e cada subarranjo (em destaque) possui 64 poços (A1 a H8), totalizando 3072 poços. Fonte: Adaptado de <http://www.lifetechnologies.com/>

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa TaqMan® Genotyper, que gera um gráfico como o mostrado na Figura 4.4. Este gráfico gerado pelo programa TaqMan® Genotyper corresponde ao marcador rs1426654, no qual observamos os três grupos de amostras equivalentes aos diferentes genótipos. Os eixos x e y representam a intensidade de fluorescência que determina cada um dos alelos e cada ponto no gráfico representa uma amostra. Quanto mais um ponto se desloca pelo eixo, mais clara é a determinação do genótipo. Pontos deslocados para fora de um grupo genotípico definido são representados pela cor preta e considerados indeterminados e pontos muito próximos ao controle negativo são representados pela cor amarela e considerados não amplificados (Figura 4.4). Ambos são considerados genótipos nulos e são desconsiderados na análise estatística.



**Figura 4.4:** Representação gráfica dos resultados da genotipagem do marcador rs1426654 através da metodologia Taqman®. As amostras que se deslocam mais acentuadamente no eixo x foram genotipadas como homozigotas para o alelo A representado pela fluorescência VIC, já aquelas que se deslocam mais acentuadamente no eixo y foram genotipadas como homozigotas para o alelo G, representado pela fluorescência FAM e as que ficam mais centralizadas são genotipadas como heterozigotas AG.

#### **4.8 Dosagem de níveis plasmáticos de múltiplas citocinas (Multiplex) dos indivíduos com malária**

Os níveis séricos de 9 citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e 2 quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) foram avaliados pelo equipamento Luminex, utilizando o kit comercial (17-plex *human cytokine panel*, Nº catálogo 171-A11171, Bio-Rad, EUA) contendo microesferas do tipo multiplex.

Em resumo, placas de 96-poços com filtro (fornecidos pelo kit), foram pré-umedecidas com 150µL do “tampão de amostra”, sendo a solução aspirada em seguida, utilizando uma sucção a vácuo (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Concluída a etapa inicial, 50 µL das microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os 17 alvos analisados foram adicionadas aos poços, sendo a placa aspirada à vácuo logo em seguida.

Conforme instruções do fabricante, após essa etapa, a placa foi lavada com “tampão de lavagem”, aspirada a vácuo. Em seguida, 50 µL das amostras das curvas padrões de cada citocina avaliada, em concentrações variando de 32.000 a 1,95 pg/mL para elaboração das respectivas curvas, e de plasma, na diluição de 1:4 em tampão de amostra, foram adicionados aos poços correspondentes da placa. As placas foram incubadas no escuro, sob leve agitação por 2 horas, sendo, em seguida, colocadas novamente para sucção a vácuo.

Após nova lavagem, foram adicionados, em cada poço, 25 µL de anticorpos de detecção, diluídos conforme orientação do fabricante, incubados por 30 min no escuro sob leve agitação. Por fim, a placa foi incubada sob leve agitação com 50 µL por poço de Streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE), por 10 min no escuro. Após nova lavagem e aspiração, foram adicionados 125 µL de “tampão de amostra”, a cada poço, para análise no leitor de Luminex (Luminex 100™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, EUA). As concentrações de cada parâmetro analisado nas amostras de plasma foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-Plex Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Os níveis séricos das citocinas foram expressos como quantidade total por mililitro (pg/mL).

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os dados foram armazenados no banco de dados Epi-info 2007 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA) e analisados através dos programas Graphpad Prism versão 5.0 (San Diego, CA) e “R” versão 2.14.0 (disponível em <http://www.R-project.org/>).



No Graphpad Prism foram utilizados os seguintes testes estatísticos: O teste t de Student, utilizado para avaliar as diferenças entre as médias dos parâmetros epidemiológicos observados; Teste de Mann Whitney, utilizado na comparação das medianas entre duas variáveis não pareadas; Teste de Spearman, utilizado na avaliação das correlações entre duas variáveis mensuradas ordinalmente, contínuas e do mesmo tamanho; Teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), para avaliar se as proporções observadas entre dois grupos são estatisticamente distintas. Foram considerados significativos dados que apresentavam  $P \leq 0,05$ .

No programa “R” foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Análise por Componente Principal (da sigla em inglês PCA - *Principal Components Analysis*), utilizada para analisar as inter-relações entre um grande número de variáveis visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas dos dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Essa análise foi realizada com base nas frequências dos genes KIR tanto de Porto Velho quanto de 51 populações distribuídas pelo globo disponíveis no banco de dados público *Allele frequencies* disponível em [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net). Para evitar associações ilegítimas resultantes da utilização de dados não robustos, nós não utilizamos os dados com populações inferiores a 100 indivíduos e aqueles cujos dados não foram previamente publicados. Todas as análises foram realizadas utilizando a versão R 2.14.0 (disponível em <http://www.R-project.org/>); Modelo de Regressão de Poisson (Frome EL & Checkoway H, 1985), utilizado para avaliar a análise multivariada para as estimativas das razões das taxas de incidências (RR) bem como seus intervalos de confiança de 95% (IC95%). Nas estimativas das taxas de incidência (RR) a contribuição por pessoa-ano foi dada pelo relato do tempo de residência em área endêmica (TREA). As taxas de incidência foram apresentadas em 100 pessoas-ano e o Intervalo de Confiança 95% (IC95%) foram estimados de acordo com a distribuição Gamma (Fay e Feuer 1997). Quando apropriado, esses modelos foram corrigidos por gênero. O valor de  $RR > 1$  indica susceptibilidade, enquanto que o valor de  $RR < 1$  indica proteção; Two-way ANOVA, utilizado para avaliar a influência de diferentes combinações de dois fatores principais e sua interação com os níveis plasmáticos de diferentes citocinas e quimiocinas. Foram considerados significativos dados que apresentavam  $P \leq 0,05$ .

O método empregado para se calcular a frequência gênica foi por meio da contagem direta de indivíduos que possuem pelo menos uma cópia do gene. Fez-se necessário pré-assumir que as frequências se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg dado que a técnica empregada para a tipificação dos genes *KIR* não consegue distinguir entre um indivíduo homozigoto para a presença de um mesmo loco daquele hemizigótico para a presença desse loco. A frequência genotípica (FG) foi calculada pela fórmula  $FG = 1 - \sqrt{1 - FPG}$ , que foi derivada a partir da frequência portador do gene (FPG) = frequência (F)% / 100 (Single RM et al., 2008). Para os HLA-C (C1 e C2) foram calculados o desvio de Hardy-Weinberg (HWE) utilizando uma calculadora on-line com um grau de liberdade (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>).

As estimativas de ancestralidade foram realizadas com o auxílio do software Structure v. 2.3.3 (Pritchard JK et al. 2000). As análises foram realizadas utilizando todas as amostras para o cálculo de frequências alélicas e assumindo a presença de três populações (k=3). Os demais parâmetros de análises foram mantidos de acordo com as recomendações do software, incluindo período de Burn-in de 10000 (período de simulação antes do início da coleta de dados) e 10000 repetições (quantas vezes a aproximação Bayesiana deve ser simulada após o período de Burn-in). O resultado das estimativas foi apresentado como percentual de cada ancestralidade. E consideramos que houve proporcionalidade na contribuição da ancestralidade avaliada, quando a diferença entre o percentual dos marcadores de duas populações ancestrais era menor que 15%.

## 5. Resultados

---

### 5.1 Características epidemiológicas da população estudada

A Tabela 5.1 resume as principais características epidemiológicas da população estudada. Participaram do presente estudo 377 indivíduos independentes de estarem com malária ou não, no momento da coleta. Desses, observamos que a maioria dos indivíduos era do sexo masculino (59%) e que embora tenhamos observado uma variação na idade entre 10 e 85 anos, os nossos dados indicam que a população de estudo é adulta, tendo média de idade de 34 anos (Desvio Padrão/DP=16 anos).

Para avaliação do tempo de exposição à malária foram utilizadas informações obtidas no questionário epidemiológico, no qual os indivíduos informavam sobre o tempo de residência em áreas endêmicas de malária. Conforme demonstrado na Tabela 5.1, os indivíduos residiam em área endêmica de malária em média há 22 anos. Foi observada uma correlação positiva entre o tempo de residência na área endêmica e a idade (Spearman's  $r = 0,6974$ ; Intervalo de Confiança/IC= 0,6416-0,7454;  $P < 0,0001$ ).

A história pregressa de malária na população de área endêmica foi avaliada com base em dados relatados pelos indivíduos. A maioria dos indivíduos (86,5%) relatou pelo menos um episódio prévio de malária, logo, dos 377 indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária, apenas 51 (13,5%) relataram nunca ter contraído a doença ou não se recordavam, incluindo aqueles que nasceram em área endêmica ( $\chi^2 = 271,01$ ;  $P < 0,0001$ ). Além disso, a média do número de malárias anteriores é de 12 infecções, sendo que a média do tempo desde a última infecção por malária é de 40 meses.

Observou-se que o número de episódios prévios de malária (NEPM) e o tempo (em meses) desde a última malária (TDUM) foram significativamente maiores em indivíduos com a mediana de idade superior a 31 anos ( $>31$  anos *versus*  $<31$  anos:  $P = 0,0006$  e MW = 14,130 para NEPM;  $P = 0,0003$  e MW 1,1230 para TDUM). Sendo assim, os 167 indivíduos maiores de 31 anos apresentavam NEPM= 5(IC: 5,9 - 8,1) e TDUM = 24 meses (IC: 40,1 - 61,3), enquanto que os 159 indivíduos menores de 31 anos apresentavam NEPM = 3 (IC: 4,4 - 7,2) e TDUM= 10meses (IC: 19,1 - 32,1).

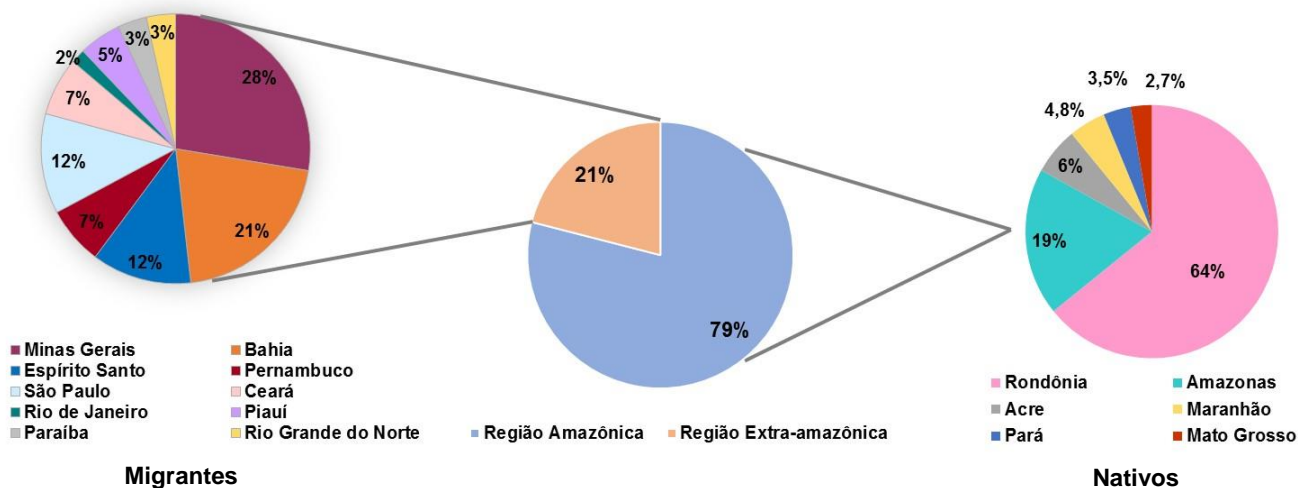
No momento da coleta de sangue, 108 (28,6%) indivíduos estavam infectados, 74 (68,5%) com *P. vivax*, 33 (30,5%) com *P. falciparum* e um indivíduo com ambas as espécies. A análise de ancestralidade estimou o grau de miscigenação encontrada na nossa população. Embora esta análise tenha sido realizada em 47% (137/377) dos indivíduos, os resultados indicam que a população de Porto Velho tenha uma contribuição de ancestralidade maior por parte dos ameríndios (76%) (Tabela 5.1) quando comparada às populações africana e europeia.

**Tabela 5.1:** Principais características epidemiológicas da população do estudo.

<b>Características Epidemiológicas</b>		
Gênero	Masculino (N/%)	224/59
	Feminino (N/%)	153/41
	Total (N)	377
Idade ( $\bar{x} \pm DP$ )		34 $\pm$ 16
Indivíduos	sem história pregressa de malária (N/%)	51/13,5
	com história pregressa de malária (N/%)	326/86,5
<b>Exposição a malária e História pregressa de malária</b>		
Tempo (em anos) de residência em área endêmica ( $\bar{x} \pm DP$ )		22 $\pm$ 17
Número de episódios prévios de malária ( $\bar{x} \pm DP$ )		12 $\pm$ 9
Tempo (em meses) desde a última infecção ( $\bar{x} \pm DP$ )		40 $\pm$ 60
Indivíduos com malária (N/%)		108/28,6
<i>P. vivax</i> (N/%)		74/68,5
<i>P. falciparum</i> (N/%)		33/30,5
Mista: <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (N/%)		1/1
<b>Ancestralidade (N= 137)</b>		
Ameríndia ( $\bar{x} \pm DP$ )		0,76 $\pm$ 0,28
Africana ( $\bar{x} \pm DP$ )		0,16 $\pm$ 0,25
Européia ( $\bar{x} \pm DP$ )		0,07 $\pm$ 0,14

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

Os dados de procedência dos indivíduos das localidades estudadas, de acordo com seus próprios relatos, mostram que a população é composta basicamente de indivíduos nativos da região amazônica (298/79%) principalmente do estado de Rondônia (190/64%), enquanto que os migrantes, oriundos de regiões não endêmicas de malária (79/21%) são na sua maioria provenientes das regiões sudeste e nordeste (58/72,5%) (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Procedência dos indivíduos estudados.

## 5.2 Análise da presença dos genes KIR na população estudada

A distribuição das frequências de genes KIR (F%) está apresentada na Tabela 5.2. Todos os 16 genes KIR investigados (14 genes e 2 pseudogenes) foram detectados na população em estudo, e os genes estruturais *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* estavam presentes em todos os indivíduos.

Em geral, as frequências dos genes que codificam receptores KIR inibidores foram maiores do que 89%, com a exceção do *KIR2DL2* e *KIR2DL5* (com frequências de 46,4% e 58,6%, respectivamente), em contrapartida, a porcentagem de indivíduos que possuíam qualquer um dos genes que codificam receptores ativadores variou de 22,5% a 43,2% (exceto para o *KIR2DS4*, com uma frequência de 93,6%). O gene *KIR2DS4*

apresenta variantes mutadas que são solúveis (*KIR2DS4\*003*-*\*010*, *\*012* e *\*013*) e selvagens, que, quando expressas, ficam ligadas à membrana (*KIR2DS4\*001*, *\*002*, *\*011*, *\*014* e *\*015*). Em nossa população de estudo, observamos que 66,5% (N=155) dos indivíduos possuíam a versão mutada, enquanto que 33,5% (N=78) apresentavam a versão selvagem do gene *KIR2DS4*.

**Tabela 5.2:** Distribuição da frequência dos genes *KIR* na população de área endêmica brasileira de malária (N=377).

Genes <i>KIR</i>	(Np)	F%	Frequência Genotípica
<b>Inibidores</b>			
<i>KIR2DL1</i>	359	94,9	0,774
<i>KIR2DL2</i>	176	46,4	0,267
<i>KIR2DL3</i>	337	89,1	0,669
<i>KIR2DL5</i>	222	58,6	0,356
<i>KIR3DL1</i>	354	93,9	0,753
<b>Ativadores</b>			
<i>KIR2DS1</i>	163	43,2	0,246
<i>KIR2DS2</i>	157	41,4	0,234
<i>KIR2DS3</i>	86	22,5	0,119
<i>KIR2DS4</i>	354	93,6	0,747
<i>KIR2DS5</i>	162	42,9	0,244
<i>KIR3DS1</i>	153	40,6	0,229
<b>Estruturais</b>			
<i>KIR2DL4</i>	377	100	1
<i>KIR3DL2</i>	377	100	1
<i>KIR3DL3</i>	377	100	1
<sup>a</sup> <i>KIR3DP1</i>	377	100	1
<b>Pseudogene</b>			
<i>KIR2DP1</i>	360	95,6	0,790

Np: número de indivíduos positivos; F%: Frequência dos genes *KIR*; <sup>a</sup>: gene estrutural e pseudogene.

### **5.3 Perfil genético dos receptores KIR**

O repertório genotípico dos receptores KIR da população estudada está demonstrado na Tabela 5.3. Dentre os 377 indivíduos que participaram do estudo, um total de 46 diferentes genótipos KIR foi identificado. Todos os genótipos encontrados na população de Porto Velho estão descritos no banco de dados público *Allele frequencies* ([www.allelefrequenciest.net](http://www.allelefrequenciest.net)). Classificamos nossa população de acordo com os dois haplogrupos existentes para os genes KIR (haplogrupos A e B), sendo que o haplogrupo B foi denominado Bx em virtude da falta de distinção entre o haplótipo AB e BB (Tabela 5.3). O haplogrupo Bx foi o mais frequente na nossa população (69%).

Com relação aos genótipos, o genótipo 1 foi responsável por 31% da frequência de todos os genótipos encontrados. Esse foi o único genótipo representante do haplótipo AA na nossa população. Desta forma, 117 dos 377 indivíduos apresentam somente o gene KIR2DS4 com perfil ativador (Figura 5.3). Os genótipos 2, 4, 3 e 5 foram detectados em 15,4%, 7,4%, 6% e 5,6%, respectivamente (Figura 5.3). Mais da metade, ou seja, 26 dos 46 genótipos (56,5%) estavam em frequência bem baixa na população (menos de 1%). Os indivíduos portadores desses genótipos pouco frequentes representam apenas 10,1% da população. Os dois genótipos mais comuns (1 e 2) na nossa população estão presentes em frequências semelhantes nas Américas (do Norte, Central e do Sul – [www.allelefrequenciest.net](http://www.allelefrequenciest.net)).

ID Genótipo	KIR Inibidor								KIR Ativador					Pseudogenes		Haplótipo	Total		
	2DL					3DL			2DS					3DS	2DP		3DP	N	%
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1	1		1		
1																	AA	117	31
2																	Bx	58	15
3																	Bx	23	6
4																	Bx	28	7,4
5																	Bx	21	5,6
6																	Bx	9	2,4
7																	Bx	10	2,6
8																	Bx	6	1,6
9																	Bx	5	1,3
10																	Bx	1	0,3
11																	Bx	1	0,3
13																	Bx	1	0,3
14																	Bx	1	0,3
17																	Bx	1	0,3
18																	Bx	4	1,1
19																	Bx	6	1,6
20																	Bx	6	1,6
21																	Bx	3	0,8
24																	Bx	1	0,3
27																	Bx	2	0,5
30																	Bx	6	1,6
32																	Bx	4	1,1
46																	Bx	1	0,3
51																	Bx	1	0,3
58																	Bx	2	0,5
68																	Bx	7	1,8
69																	Bx	4	1,1
70																	Bx	3	0,8
71																	Bx	9	2,4
72																	Bx	1	0,3
73																	Bx	3	0,8
74																	Bx	4	1,1
75																	Bx	1	0,3
76																	Bx	3	0,8
78																	Bx	1	0,3
80																	Bx	1	0,3
81																	Bx	1	0,3
86																	Bx	1	0,3
87																	Bx	1	0,3
91																	Bx	4	1,1
94																	Bx	3	0,8
106																	Bx	8	2,1
112																	Bx	1	0,3
144																	Bx	1	0,3
293																	Bx	1	0,3
325																	Bx	1	0,3
N	359	176	337	377	222	354	377	377	163	157	86	354	162	153	360	377	Bx	377	100
%	95,2	46,7	89,4	100	58,9	93,9	100	100	43,2	41,6	22,8	93,9	42,9	40,6	95,6	100			

ID: Identificação do genótipo segundo o allelefrequencies.net; N: número de indivíduos positivos. Os retângulos cinzas indicam a presença do gene, os retângulos rachurados representam os genes estruturais e os retângulos brancos indicam ausência do gene.

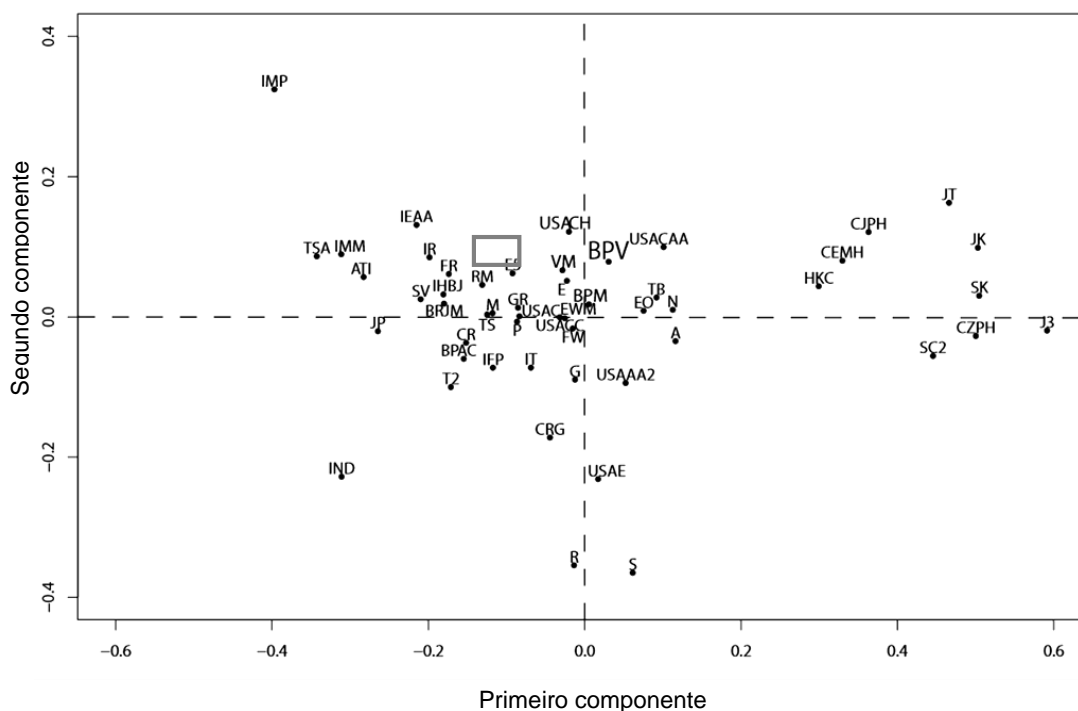
**Tabela 5.3:** Perfil genotípico do *KIR* na população de área endêmica de malária.

#### 5.4 Análise do componente principal (PCA)

A PCA multidimensional foi realizada para investigar a inter-relação da população de Porto Velho com outras 51 populações globais quanto às frequências dos genes *KIR*. Como demonstrado na figura 5.2, os resultados dessa análise mostram a população de Porto Velho (sigla: BPV - *Brazilian Porto Velho*) distante de algumas populações, como os asiáticos (siglas das populações: HKC - *Hong Kong Chinese*, JT - *Japan Tokyo*, CEMH



- *China Eastern Mainland Han*, CJPH - *China Jiangsu Province Han*, CZPH - *China Zhejiang Province Han*, JK - *Japan Kyoto*, SK - *South Korea*, J3 - *Japan pop3*, SC2 - *Singapore Chinese pop2*, IMP - *India Mumbai Parsi*), os africanos ocidentais (sigla da população: S - *Senegal*) e do Oriente Médio (siglas das populações: IEAA - *Iran East Azerbaijan Azerbaijani*, IND - *Israel North Druze*), e relativamente próximo dos mestiços da Venezuela (sigla da população: VM - *Venezuela Mestizo*), dos hispânicos americanos (sigla da população: USACH - *USA California Hispanic*), dos asiáticos americanos (sigla da população: USACAA - *USA California Asian American*) e de uma população do Sul do Brasil (sigla da população: BPM - *Brazil Parana Mixed*) com base nas frequências dos genes *KIR*. Os dois componentes principais foram responsáveis por 72,3% da variabilidade dos dados.



**Figura 5.2:** Representação gráfica em Biplot da Análise do Componente Principal. A proporção cumulativa da variabilidade explicada pelo primeiro componente foi de 58,34% e do segundo componente foi de 13,96% totalizando 72,3%.

### 5.5 Frequências dos ligantes de KIR (genes HLA de classe I) na população estudada

A distribuição dos genes codificantes para os receptores HLA de classe I que são ligantes dos receptores KIR está mostrada na Tabela 5.4. Dentre os cinco HLA-I analisados na população investigada, os que apresentavam maior frequência foram o HLA-C1 (79,6%), seguido de HLA-Bw4 (70,8%) e HLA-C2 (66,8%). As frequências genotípicas do HLA-C estavam de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 1,19$ ;  $P = 0,274$ ) (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4:** Distribuição das frequências dos ligantes de KIR (genes HLA-A, -B e -C) na população de área endêmica brasileira de malária (N=377).

Genes HLA-I (Ligantes de KIR)	(Np)	%
HLA-C1	300	79,6
HLA-C2	252	66,8
HLA-C1/C1	125	33,2
HLA-C2/C2	77	20,4
HLA-C1/C2	175	46,4
HLA-Bw4	267	70,8
HLA-A3/A11	88	23,3

Np: número de indivíduos positivos

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

Ao avaliarmos a coexistência do *loci* KIR e HLA-I no mesmo indivíduo, pudemos observar que os pares com um perfil inibidor *KIR2DL2/3\_HLA-C1*, *KIR3DL1\_HLA-Bw4* e *KIR2DL1\_HLA-C2* foram os mais comuns, com frequências de 79,6%, 66,3% e 64,4%, respectivamente (Tabela 5.5).

**Tabela 5.5:** Distribuição das frequências dos genes *KIR* na presença do seu ligante *HLA-I* (pares *KIR-HLA*) na população de área endêmica brasileira de malária (N=377).

<i>KIR-HLA</i>	(Np)	%
<b>Pares Inibidores</b>		
<i>KIR2DL1_C2</i>	243	64,4
<i>KIR2DL1_C2/C2</i>	74	30,4
<i>KIR2DL1_C1/C2</i>	169	69,6
<i>KIR2DL2/3_C1</i>	300	79,6
<i>KIR2DL2/3_C1/C1</i>	124	41,3
<i>KIR2DL2/3_C1/C2</i>	176	58,7
<i>KIR3DL1_Bw4</i>	250	66,3
<i>KIR3DL2_A3/A11</i>	88	23,3
<b>Pares Ativadores</b>		
<i>KIR2DS1_C2</i>	112	29,7
<i>KIR2DS1_C2/C2</i>	46	41,1
<i>KIR2DS1_C1/C2</i>	66	58,9
<i>KIR2DS2_C1</i>	125	33,1
<i>KIR2DS2_C1/C1</i>	48	38,4
<i>KIR2DS2_C1/C2</i>	77	61,6
<i>KIR3DS1_Bw4</i>	114	30,2

Np: número de indivíduos positivos

A fim de investigarmos a possibilidade de alguma combinação *KIR-HLA* estar associada à diminuição (proteção) ou ao aumento (susceptibilidade) da taxa de incidência de malária na região endêmica de Porto Velho, realizamos a análise multivariada de regressão de Poisson com base no número de episódios prévios de malárias (NEPM) e tempo de residência em área endêmica (TREA), ambos relatados pelos indivíduos. Os pares *KIR-HLA* que foram significativos estão demonstrados na tabela 5.6.

Encontramos como marcadores de proteção os pares ativadores *KIR2DS1\_C2/C2* e *KIR3DS1\_Bw4* e o par inibidor *KIR3DL1\_Bw4*, visto que os indivíduos que possuíam os pares supracitados tiveram uma taxa de incidência de malária menor quando comparado aos indivíduos que não possuíam tais pares (Tabela 5.6). Além disso, observamos como marcadores de susceptibilidade à malária o par inibidor *KIR3DL2\_A3/A11* e os pares ativadores *KIR2DS1\_C1/C2* e *KIR2DS2\_C1/C2*, visto que os indivíduos que possuíam tais pares tiveram uma taxa de incidência de malária maior quando comparado aos indivíduos que não os possuíam (Tabela 5.6).

Com relação aos haplótipos, observamos como marcador de susceptibilidade à malária o haplótipo Bx, visto que os indivíduos que apresentavam esse haplótipo tiveram uma taxa de incidência de malária maior quando comparada aos indivíduos portadores do haplótipo AA (Tabela 5.6).

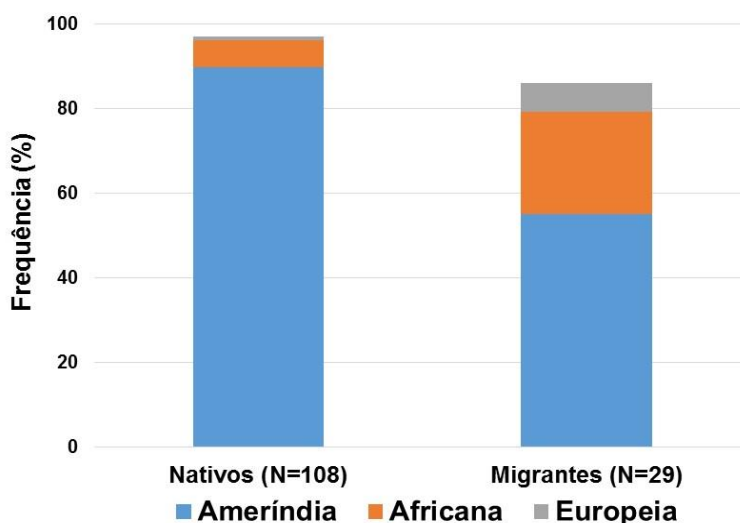
**Tabela 5.6:** Modelos de regressão de Poisson para associação entres os pares KIR-HLA, haplótipos e incidência de malária.

KIR-HLA e Haplótipos	Ausência=0 Presença=1	NEPM	Pessoas-ano*	Incidência de malária/100 pessoas-ano (IC)	Risco Relativo** (IC)	P-valor
<b>Pares Inibidores</b>						
<i>KIR3DL1_Bw4</i>	0	976	3613	<b>27,01 (25,35 - 28,76)</b>	Ref	<0,001
	1	1614	6819	23,67 (22,53 - 24,85)	0,874 (0,807 - 0,946)	
<i>KIR3DL2_A3/A11</i>	0	1816	8369	21,7 (20,71 - 22,72)	Ref	<0,001
	1	775	2125	<b>36,47 (33,95 - 39,13)</b>	1,678 (1,543 - 1,826)	
<b>Pares Ativadores</b>						
<i>KIR2DS1_C2/C2</i>	0	2413	9493	<b>25,42 (24,41 - 26,45)</b>	Ref	<0,001
	1	178	1001	17,78 (15,27 - 20,6)	0,73 (0,627 - 0,85)	
<i>KIR3DS1_Bw4</i>	0	1843	7082	<b>26,02 (24,85 - 27,74)</b>	Ref	0,001
	1	748	3412	21,92 (20,38 - 23,55)	0,862 (0,791 - 0,938)	
<i>KIR2DS1_C1/C2</i>	0	1908	8170	23,35 (22,32 - 24,43)	Ref	<0,001
	1	683	2324	<b>29,39 (27,23 - 31,68)</b>	1,266 (1,16 - 1,382)	
<i>KIR2DS2_C1/C2</i>	0	1865	8286	22,51 (21,5 - 23,55)	Ref	<0,001
	1	726	2208	<b>32,88 (30,53 - 35,36)</b>	1,439 (1,321 - 1,568)	
<b>Haplótipos</b>						
AA	1	727	3265	22,27 (20,68 - 23,95)	Ref	<0,001
Bx	1	1864	7229	<b>25,79 (24,63 - 26,98)</b>	1,203 (1,104 - 1,311)	

NEPM: Número de Episódios Prévios de Malária; \* A contribuição por pessoa-ano foi dada pelo relato do tempo de residência em área endêmica; \*\* Quando apropriado esse modelo foi corrigido por gênero.

## 5.7 Comparação dos dados obtidos entre nativos e migrantes

Para verificarmos se há diferença entre a ancestralidade dos indivíduos oriundos de área endêmica (grupo de nativos, N=298) e os oriundos de área não endêmica (grupo de migrantes, N=79), realizamos a análise dos marcadores de ancestralidade (*AIMs*). Observamos que no grupo dos migrantes que tiveram os *AIMs* genotipados (N=29), a maioria dos indivíduos (55,2%; 16/29) possuem uma maior contribuição de ancestralidade ameríndia, seguida de 24,1% (7/29) e 6,9% (2/29) de indivíduos que tiveram predominantemente contribuição africana e europeia, respectivamente (Figura 5.3). Nesse grupo, 13,8% dos indivíduos (4/29) não tiveram contribuição ancestral definida por uma população, visto que em 3 indivíduos houve proporcionalidade na contribuição tanto dos ameríndios quanto dos europeus e em 1 indivíduo houve contribuição tanto dos europeus quanto dos africanos em proporção semelhante. No grupo dos nativos, a contribuição ameríndia foi mais marcante ( $P < 0,0001$ ). Dos 108 indivíduos que tiveram os *AIMs* genotipados, 89,8% (97/108) tiveram maior contribuição ancestral ameríndia (Figura 5.3). Nesse grupo, 3 indivíduos não tiveram contribuição ancestral definida por apenas uma população, visto que em 2 indivíduos a contribuição tanto dos africanos quanto dos ameríndios foi de maneira proporcional e em 1 indivíduo houve semelhança na contribuição ancestral tanto dos ameríndios quanto dos africanos.



**Figura 5.3:** Ancestralidade dos indivíduos oriundos de área endêmica (nativos) e dos oriundos de área não endêmica (migrantes).

Quando verificamos se há diferença entre as características epidemiológicas do grupo dos nativos (N=298) e dos migrantes (N=79), observamos uma diferença, já esperada, quanto ao tempo de residência em área endêmica (Nativos-TREA (mediana): 28, IC: 28,8-32,3 *versus* Migrantes-TREA (mediana): 18, IC: 15,1-20,4; P<0,0001 e MW: 5706). No entanto, apesar do grupo dos migrantes residir em área endêmica há menos tempo que o grupo dos nativos, eles apresentaram mais número de episódios prévios de malária (Nativos-NEPM (mediana): 4, IC: 4,7-6 *versus* Migrantes-NEPM (mediana): 6, IC: 6,5-11,4; P=0,001 e MW: 8117). Sendo assim, verificamos que, dentre os marcadores de susceptibilidade à malária observados (Tabela 5.6), somente o par KIR3DL2\_A3/A11 estava em frequência significativamente maior no grupo dos migrantes quando comparado ao grupo dos nativos (Migrantes com o par *KIR3DL2\_A3/A11*: 40,5% (33/79) *versus* Nativos com o par *KIR3DL2\_A3/A11*: 18,4% (55/298); P<0,0001) (Tabela 5.7). Para os outros marcadores de susceptibilidade não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5.7). Da mesma maneira, não houve diferença na frequência dos marcadores de proteção à malária quando comparamos o grupo dos nativos com o dos migrantes (Tabela 5.7).

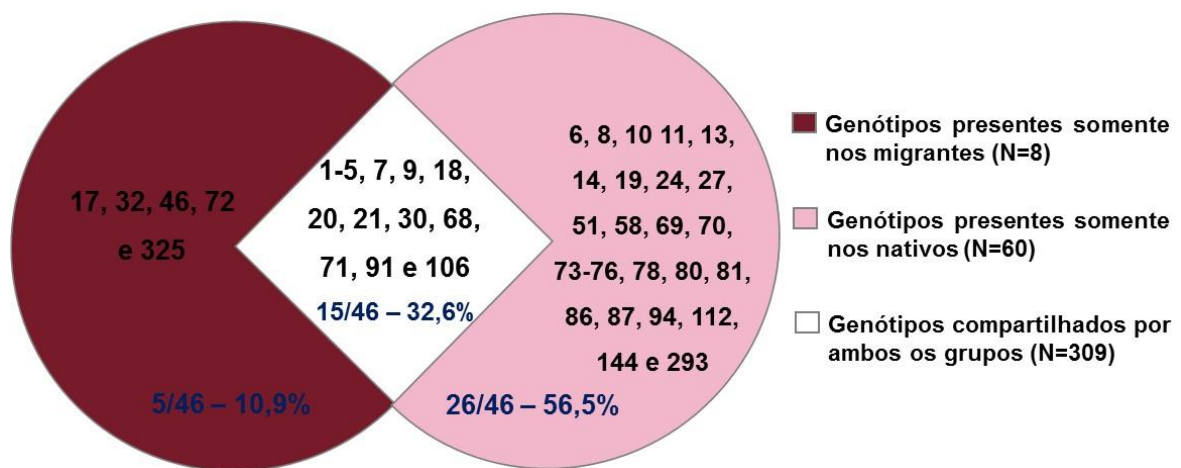
**Tabela 5.7:** Distribuição das frequências dos marcadores de susceptibilidade e proteção a malária nos grupos dos migrantes e nativos.

KIR-HLA	Migrantes (N=79)	Nativos (N=298)	P-valor
	Np(%)	Np(%)	
<b>Marcadores de Susceptibilidade</b>			
<i>KIR2DS1_C1/C2</i> (N=66)	13(16,5)	53(17,8)	0,8
<i>KIR2DS2_C1/C2</i> (N=77)	16(20,2)	61(20,5)	1
<i>KIR3DL2_A3/A11</i> (N=88)	<b>33(40,5)</b>	<b>55(18,4)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Marcadores de Proteção</b>			
<i>KIR2DS1_C2/C2</i> (N=46)	11(13,9)	35(11,7)	0,5
<i>KIR3DS1_Bw4</i> (N=114)	18(22,7)	96(32,2)	0,1
<i>KIR3DL1_Bw4</i> (N=250)	55(69,6)	198(66,4)	0,6

N: total dos indivíduos do grupo; Np: número de indivíduos positivos para o respectivo marcador; %: frequência dos positivos

Ao analisarmos os parâmetros epidemiológicos sugestivos de susceptibilidade ou proteção à malária (número de episódios prévios de malária e tempo desde a última malária), observamos que entre os indivíduos migrantes que possuem os marcadores de susceptibilidade (*KIR3DL2\_A3/A11*, *KIR2DS1\_C1/C2* e *KIR2DS2\_C1/C2*) comparados aos migrantes que não possuem estes marcadores, não foi observado diferença estatisticamente significativa. O mesmo resultado foi encontrado entre os indivíduos nativos que possuem os marcadores de proteção (*KIR3DL1\_Bw4*, *KIR2DS1\_C2/C2* e *KIR3DS1\_Bw4*) comparado aos nativos que não possuem tais marcadores.

Na tentativa de buscar possíveis particularidades na distribuição genotípica dos grupos dos nativos e dos migrantes, avaliamos o perfil genotípico do *KIR* em ambos os grupos. Observamos que, dentre os 46 genótipos encontrados na nossa população, 26 genótipos (56,5%) estavam presentes apenas no grupo dos nativos, 5 genótipos (10,9%) apenas no grupo dos migrantes e 15 genótipos (32,6%) eram compartilhados por ambos os grupos (nativos e migrantes) (Figura 5.4). Entretanto, quando analisamos os dados epidemiológicos dos indivíduos do grupo dos nativos que não compartilhavam genótipos (N=60) e comparamos aos dados dos indivíduos que compartilhavam genótipos (N=309) observamos que não houve diferença estatística tanto no número de episódios prévios de malária (mediana (IC): 3 (3,6 - 6) *versus* 4 (5,5 - 7,3); P= 0,3) quanto no tempo (em meses) desde a última malária (mediana (IC): 12 (19,6 - 48,2) *versus* 6 (25,1 – 37,9); P= 0,5).



**Figura 5.4:** Distribuição dos genótipos do *KIR*.



### **5.8 Perfil do grupo dos indivíduos infectados com malária**

Como demonstrado na Tabela 5.8, dos 108 indivíduos com malária, 74 (68,5%) estavam infectados com *P. vivax*, 33 (30,5%), com *P. falciparum* e 1 (1%) com ambas as espécies. A maioria dos indivíduos com malária era do sexo masculino (65,7%) e a média de idade era de 30 anos. Segundo relatos dos indivíduos, eles residiam em área endêmica de malária em média há 26 anos, não diferindo estatisticamente da média de residência dos indivíduos sem malária (28 anos). Quanto à história pregressa de malária, foram relatados em média 5 episódios, também não diferindo estatisticamente da média relatada pelos indivíduos sem malária (6 episódios).

Em alguns indivíduos com malária foram realizadas coletas de sangue em dois momentos diferentes da infecção: no dia do diagnóstico (D0, N=71), antes do início do tratamento, fase aguda da infecção, e cerca de 15 dias após o início do tratamento (D15, N=55), quando o paciente já se encontrava curado e retornava ao posto para a realização de lâmina de verificação de cura (LVC) e constatar a ausência de parasitas circulantes no sangue. A média de parasitemia dos indivíduos em D0 foi de 815,2 parasitas/ $\mu$ l de sangue e todos os indivíduos apresentavam sintomatologia há cerca de três dias. Os sintomas mais frequentes eram aqueles pertencentes à tríade malárica: febre, cefaleia e calafrio. Embora a média da parasitemia dos indivíduos infectados por *P. vivax* estivesse maior que a dos indivíduos infectados com *P. falciparum*, esta não apresentou diferença estatística (Tabela 5.8). Em D15, nenhum dos indivíduos apresentava parasitas circulantes e sintomatologia, confirmados tanto pelo diagnóstico parasitológico quanto pelo diagnóstico molecular.

**Tabela 5.8:** Principais características epidemiológicas dos indivíduos do grupo com malária

Gênero		
	Masculino (N/%)	71/65,7
	Feminino (N/%)	37/34,3
	Total (N)	108
Idade ( $\bar{x} \pm DP$ )		30 $\pm$ 12
Espécie plasmodial infectante		
<i>P. vivax</i> (N/%)		74/68,5
<i>P. falciparum</i> (N/%)		33/30,5
Mista: <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (N/%)		1/1
Início da sintomatologia ( $\bar{x} \pm DP$ )		3 $\pm$ 2
Número de episódios prévios de malária ( $\bar{x} \pm DP$ )		5 $\pm$ 5
Tempo (em anos) de residência em área endêmica ( $\bar{x} \pm DP$ )		26 $\pm$ 12
Parasitemia (parasitas/ $\mu$ l de sangue)*		815,2 (569,7 - 1166)
<i>P. vivax</i> (parasitas/ $\mu$ l de sangue)*		892,1 (585 - 1380)
<i>P. falciparum</i> (parasitas/ $\mu$ l de sangue)*		612,7 (304,5 - 1233)

$\bar{x}$  : média; DP: desvio padrão; N: número de indivíduos; \* média geométrica (IC)

### **5.9 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas dos indivíduos com malária**

Comparando os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas no momento da infecção (D0 - fase aguda), 15 dias após o diagnóstico (D15 - fase de convalescência) e nos controles, observamos alterações interessantes nos níveis plasmáticos (Tabela 5.9). Somente nos níveis de duas citocinas, a IL-1 e a IL-5, não foram observadas diferenças entre os controles e os indivíduos infectados. Foram considerados positivos os indivíduos com valores superiores à média da concentração somada ao dobro do desvio padrão do grupo controle.

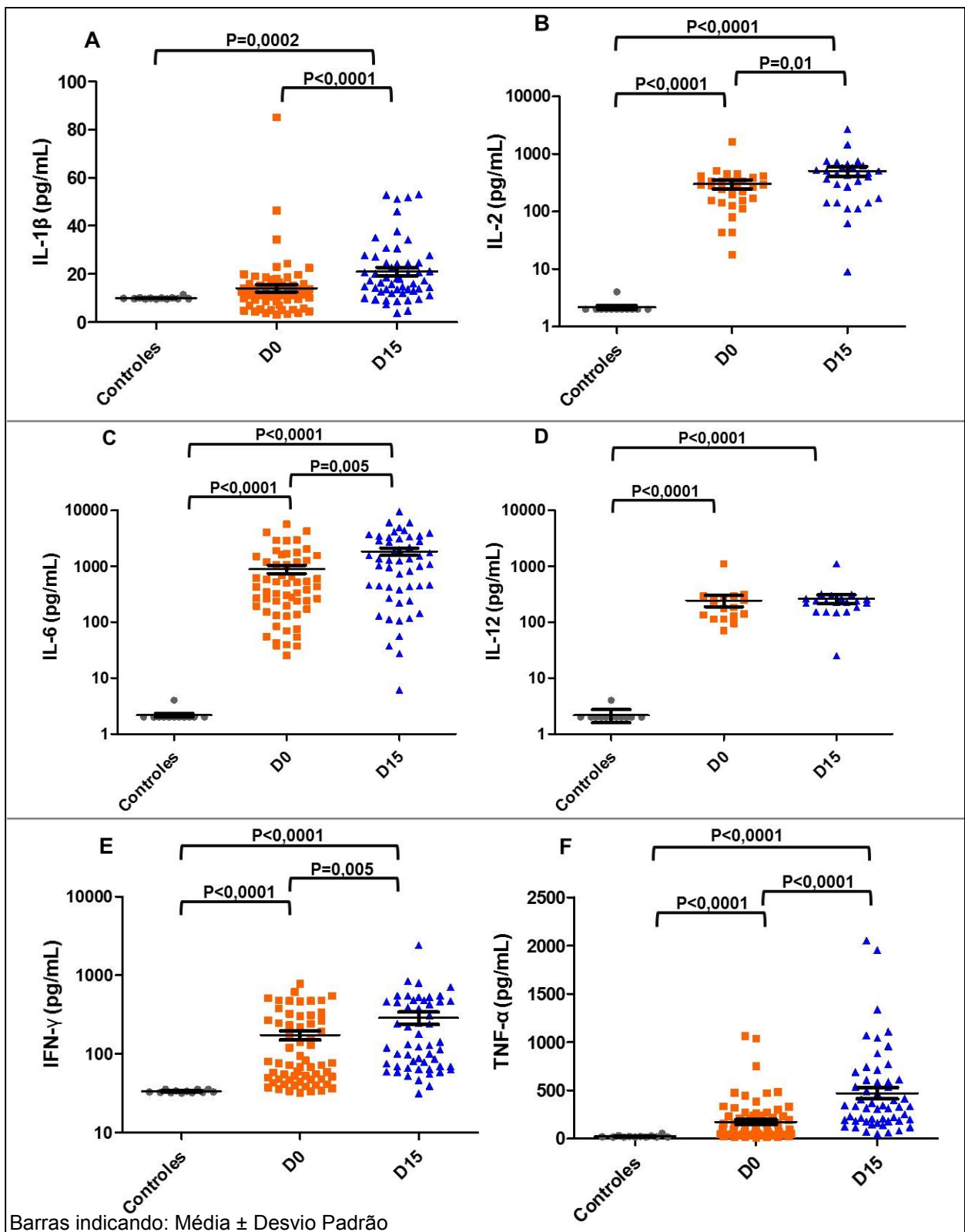
Os níveis plasmáticos de todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas foram mais elevados na fase de convalescência comparados à fase aguda, exceto a IL-12, na qual não foi observada diferença. (Tabela 5.9) (Figura 5.5). Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-4 estava mais elevada na fase de convalescência, enquanto que para a IL-10 houve uma diminuição dos níveis plasmáticos nesta fase. Verificou-se também

que a drástica redução do nível médio de IL-10 foi acompanhada pela redução de 93% de positivos para esta citocina na fase aguda, para 21,8% na fase de convalescência (P<0,0001) (Tabela 5.9) (Figura 5.6). Já entre as quimiocinas estudadas observamos que aumentaram os níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$  da fase aguda para a fase de convalescência, diferentemente do nível médio de MCP-1, no qual foi observada uma redução (Tabela 5.9) (Figura 5.6).

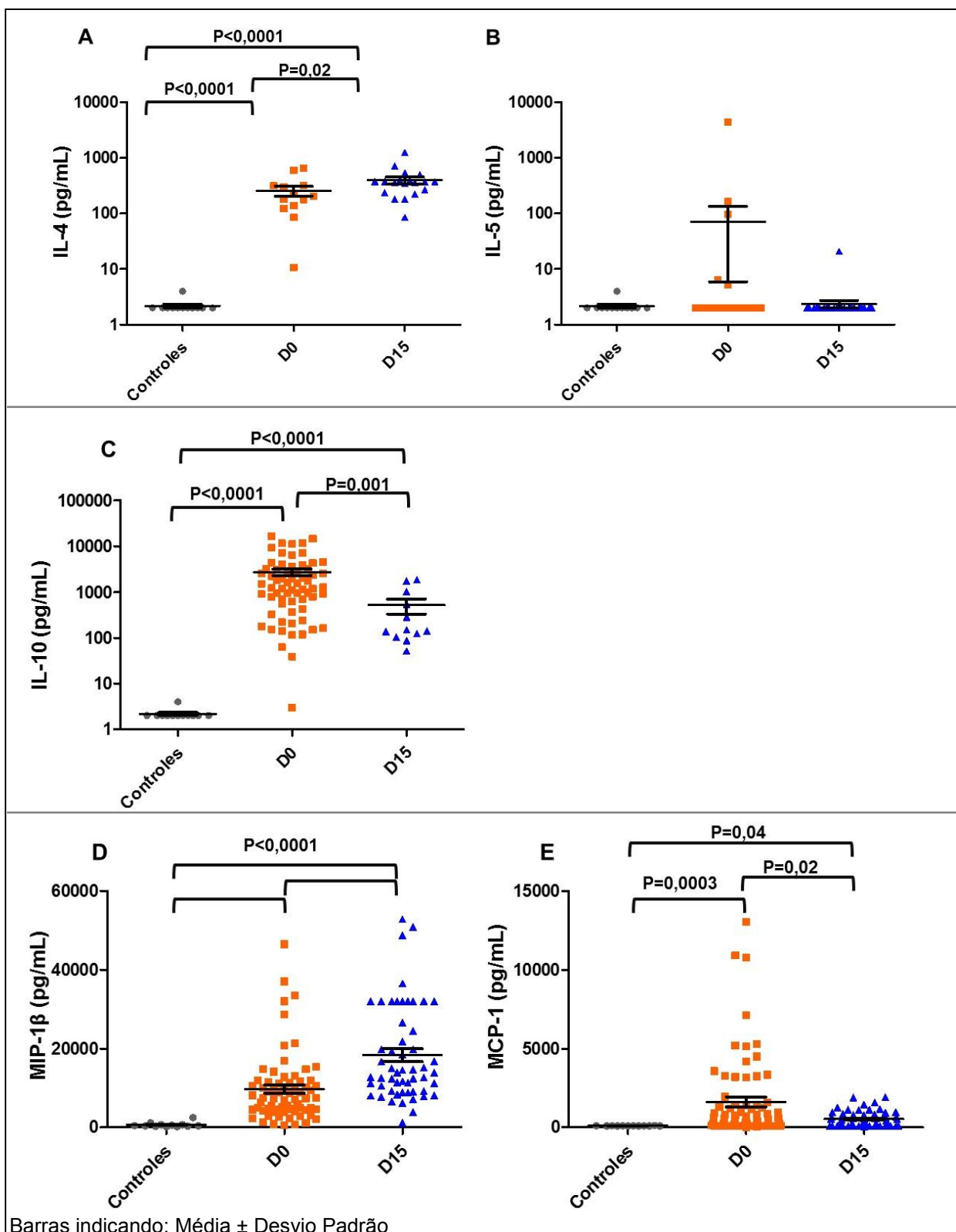
**Tabela 5.9:** Comparação dos níveis plasmáticos das citocinas e quimiocinas entre os controles, indivíduos na fase aguda e de convalescência e frequência de positivos.

Citocinas		Controles (N=12)	Fase aguda (N=71)	Fase de convalescência (N=55)	P-valor <sup>a</sup>
<b>Pró-inflamatórias</b>					
IL-1 $\beta$	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	10,03 $\pm$ 0,5	<b>14,08 <math>\pm</math> 11,83</b>	<b>21,03 <math>\pm</math> 12,43</b>	<0,0001
	Positivos (%)		61 (85,9)	53 (96,4)	
IL-2	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	2 $\pm$ 0,04	<b>298,9 <math>\pm</math> 283,6</b>	<b>504,2 <math>\pm</math> 507,1</b>	0,01
	Positivos (%)		29 (40,8)	29 (52,7)	
IL-6	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	2 $\pm$ 0,04	<b>889,3 <math>\pm</math> 1164</b>	<b>1842 <math>\pm</math> 1964</b>	0,005
	Positivos (%)		58 (81,7)	51 (92,7)	
IL-12p70	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	2 $\pm$ 0,04	244,7 $\pm$ 234,2	262,1 $\pm$ 211,7	0,3
	Positivos (%)		17 (23,9)	20 (36,4)	
IFN- $\gamma$	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	33,5 $\pm$ 1,4	<b>173,9 <math>\pm</math> 179,9</b>	<b>288,1 <math>\pm</math> 369,8</b>	0,005
	Positivos (%)		62 (87,3)	53 (96,4)	
TNF- $\alpha$	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	21,8 $\pm$ 11,1	<b>172,5 <math>\pm</math> 209,1</b>	<b>470,5 <math>\pm</math> 427,8</b>	<0,0001
	Positivos (%)		70 (98,6)	54 (98,2)	
<b>Anti-inflamatórias</b>					
IL-4	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	2 $\pm$ 0,04	<b>256,5 <math>\pm</math> 187,7</b>	<b>396,1 <math>\pm</math> 249,6</b>	0,02
	Positivos (%)		13 (18,3)	19 (34,5)	
IL-5	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	2 $\pm$ 0,04	70,28 $\pm$ 530,7	2,3 $\pm$ 2,6	0,1
	Positivos (%)		5 (7)	1(1,8)	
IL-10	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	2 $\pm$ 0,04	<b>2730 <math>\pm</math> 3633</b>	<b>523,4 <math>\pm</math> 662,4</b>	0,001
	Positivos (%)		66(93)	12(21,8)	
<b>Quimiocinas</b>					
MIP-1 $\beta$	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	621,7 $\pm$ 639	<b>9672 <math>\pm</math> 8741</b>	<b>18303 <math>\pm</math> 12099</b>	<0,0001
	Positivos (%)		69(97,2)	54(98,2)	
MCP-1	$\bar{X} \pm DP$ (pg/mL)	88,9 $\pm$ 11,6	<b>1612 <math>\pm</math> 2649</b>	<b>524,2 <math>\pm</math> 503,8</b>	0,0237
	Positivos (%)		70(98,6)	54(98,2)	

$\bar{X}$  : média; DP: desvio padrão; N: número de indivíduos; <sup>a</sup> Fase aguda *versus* Fase de convalescência



**Figura 5.5:** Alterações dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (A a F). Comparação entre grupo Controle (cinza) e o grupo dos infectados no D0 (Fase aguda - laranja) e no D15 (Fase de convalescência - azul).



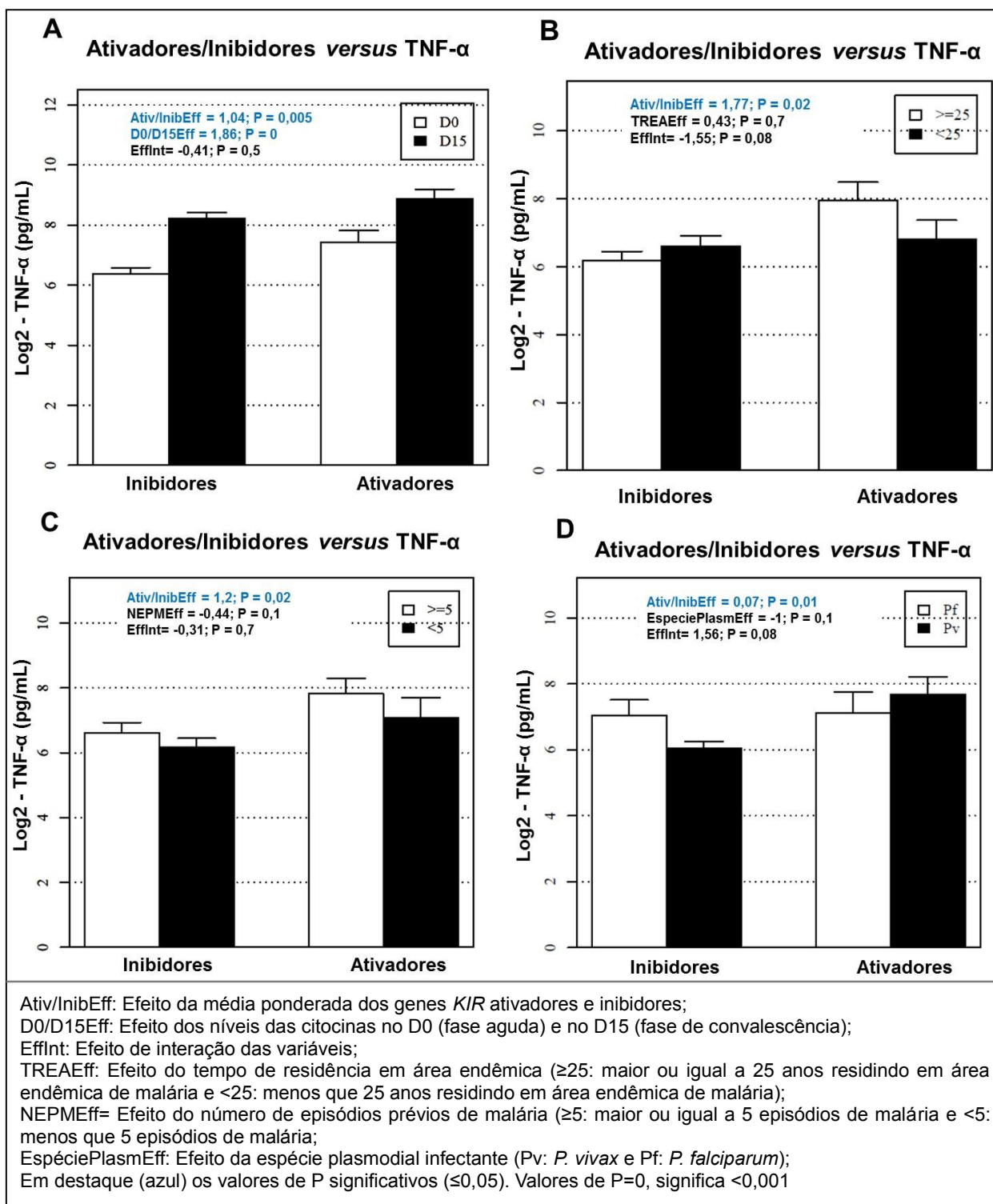
**Figura 5.6:** Alterações dos níveis plasmáticos de citocinas anti-inflamatórias (A a C) e quimiocinas (D e E). Comparação entre grupo Controle (cinza) e o grupo dos infectados no D0 (Fase aguda - laranja) e no D15 (Fase de convalescência - azul).

### **5.10 Relação entre os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas, os pares KIR-HLA, média ponderada de genes ativadores e inibidores e os parâmetros epidemiológicos**

Realizamos o teste two-way ANOVA para verificar uma possível influência entre a combinação dos pares KIR-HLA, a média ponderada de genes ativadores e inibidores e os parâmetros epidemiológicos (que são: tempo de residência em área endêmica - TREA:  $\geq 25$ , maior ou igual a 25 anos residindo em área endêmica de malária e  $< 25$ , menos que 25 anos residindo em área endêmica de malária; número de episódios prévios de malária - NEPM:  $\geq 5$ , maior ou igual a 5 episódios de malária e  $< 5$ , menos que 5 episódios de malária; e espécie plasmodial infectante, *P. vivax* e *P. falciparum*) e sua interação com os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas. Os resultados significativos estão descritos abaixo.

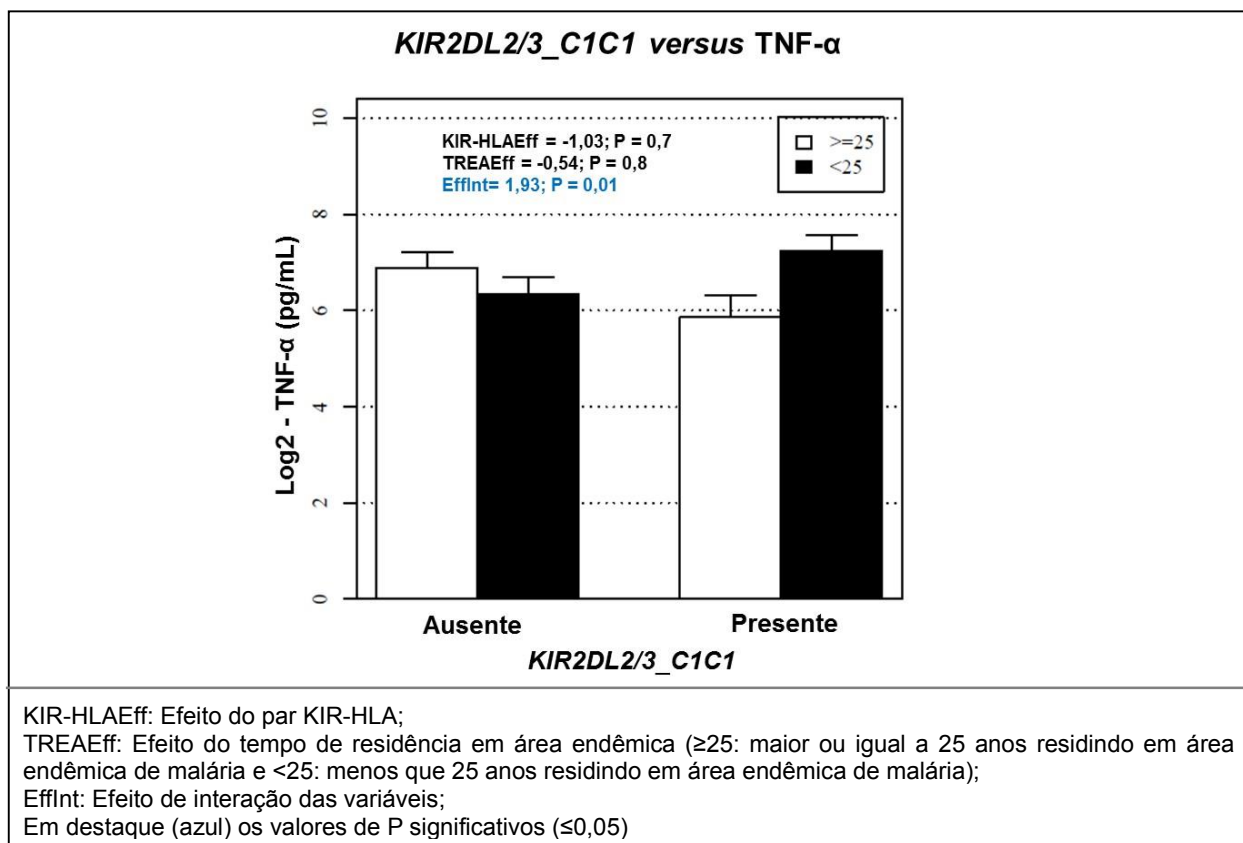
Consistente com a análise mostrada na Tabela 5.9 e Figura 5.5 (A a F), esta análise também demonstrou que as citocinas e quimiocinas avaliadas estavam mais elevadas na fase de convalescência (D15) comparados a fase aguda (D0), no entanto observamos associações interessantes com as variáveis genéticas (pares KIR-HLA e média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores) e epidemiológicas (TREA, NEPM e espécie plasmodial infectante).

Conforme demonstrado na Figura 5.7A foram observadas associações quanto aos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , e a média ponderada dos genes *KIR* ativadores e inibidores. Verificamos que os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  estão aumentados na fase de convalescência (D15) quando comparada à fase aguda (D0) (D0/D15Eff= 1,86  $P < 0,001$ ), e esse aumento está presente nos indivíduos que apresentaram uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores (Ativ/InibEff: A=1,04;  $P = 0,005$ ). No entanto, esse aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  nos indivíduos que apresentaram uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores parece não ter qualquer influência dos parâmetros epidemiológicos avaliados, visto que os resultados observados com estas variáveis não foram estatisticamente significativos (TREAEff=0.43; NEPMEff=-0,44; EspéciePlasmEff=-1;  $P > 0,05$  em todos) (Figura 5.7B a D).



**Figura 5.7:** (A) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  no D0 e D15 e a média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores. (B a D) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , a média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores e as variáveis epidemiológicas (TREA, NEPM e espécie plasmodial).

Além disso, também observamos associações quando incluímos os pares KIR-HLA. Na Figura 5.8 observamos um efeito de interação positiva entre a presença do par inibidor *KIR2DL2/3\_C1C1*, os níveis de TNF- $\alpha$  e o TREA. Com isso, verificamos que o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  está presente nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL2/3\_C1C1* e que vivem em área endêmica há menos de 25 anos (EffInt=1,93; P=0,01).

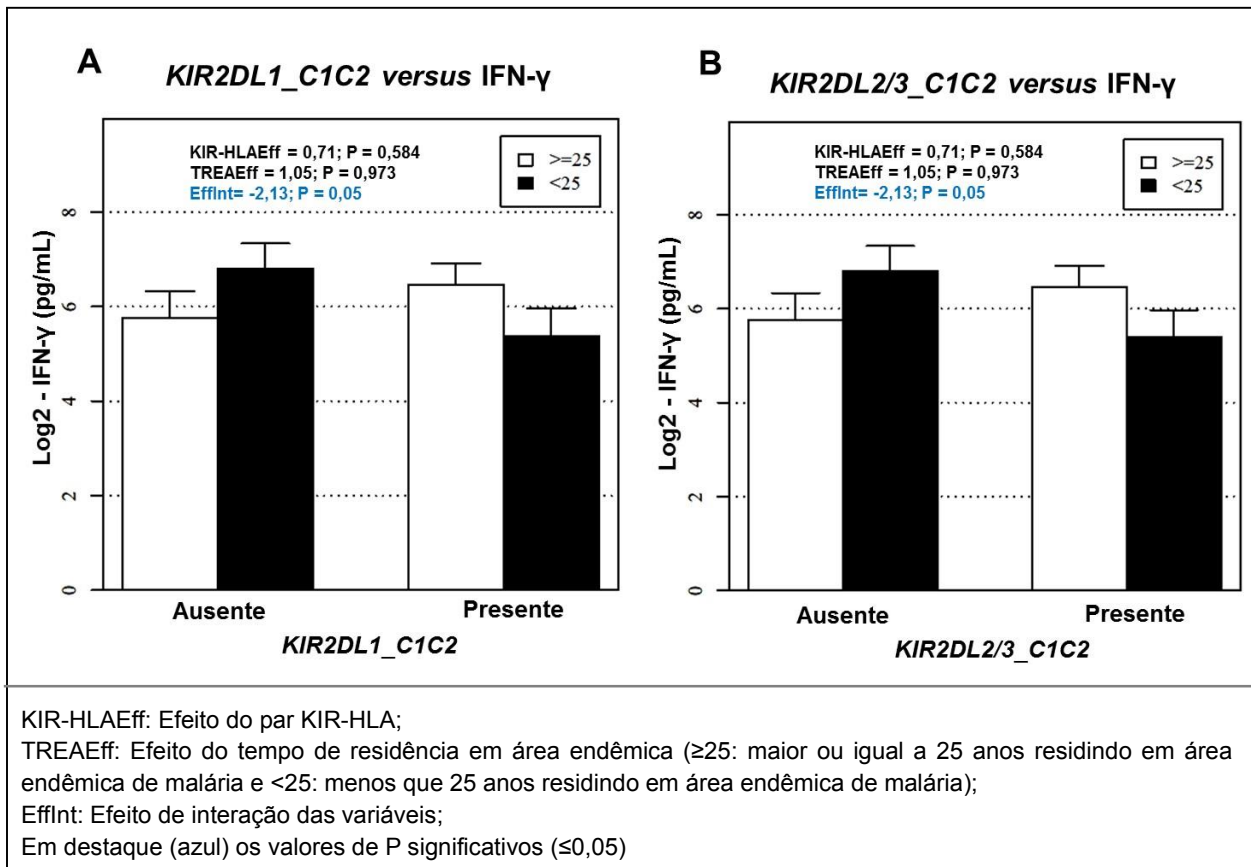


**Figura 5.8:** Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , o par *KIR2DL2/3\_C1C1* e o tempo de residência em área endêmica.

Entre as citocinas pró-inflamatórias, verificamos um efeito de interação negativa entre a presença do par inibidor *KIR2DL1\_C1C2*, os níveis de IFN- $\gamma$  e o TREA. Portanto, observamos que a diminuição dos níveis plasmáticos do IFN- $\gamma$  está presente nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL1\_C1C2* e que vivem em área endêmica há menos de 25 anos (EffInt= -2,13; P=0,05) (Figura 5.9A). Além disso, também foi possível verificar



uma interação negativa entre os níveis de IFN- $\gamma$ , mas em relação a outro par inibidor, o par *KIR2DL2/3\_C1C2*. Conforme mostrado na Figura 5.9B, notamos que a diminuição dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  ocorre nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL2/3\_C1C2* e que vivem em área endêmica há menos de 25 anos (EffInt= -2,13; P=0,05).

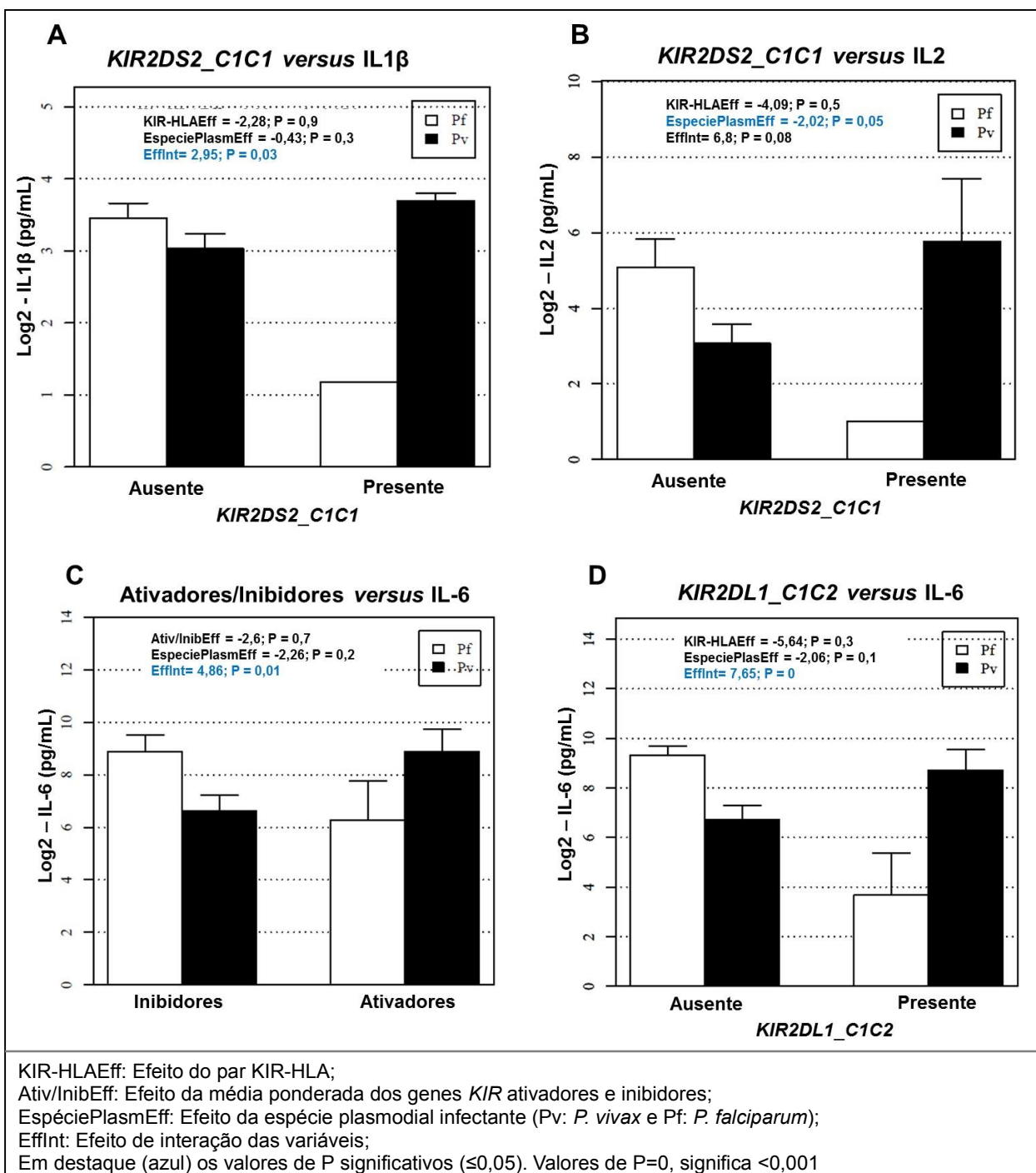


**Figura 5.9:** (A) Relação entre os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , o par *KIR2DL1\_C1C2* e o tempo de residência em área endêmica. (B) Relação entre os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , o par *KIR2DL2/3\_C1C2* e o tempo de residência em área endêmica.

Para outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL1 $\beta$ , IL-2 e IL-6, também foram encontrados resultados significativos. Conforme mostrado na Figura 5.10A, observamos um efeito de interação positiva entre a presença do par ativador *KIR2DS2\_C1C1*, os níveis de IL1 $\beta$  e a espécie plasmodial. Com isso, verificamos que existe uma relação

entre o aumento dos níveis de IL1 $\beta$  nos indivíduos que possuem o par *KIR2DS2\_C1C1* e que estavam infectados com *P. vivax* no momento da coleta (EffInt= 2,95; P= 0,03). Observamos uma relação entre esse mesmo par ativador *KIR2DS2\_C1C1*, os níveis de IL2 e a espécie plasmoidal. Notamos que, dentre os indivíduos que possuíam o par *KIR2DS2\_C1C1*, os que estavam infectados com *P. vivax* tiveram maiores níveis plasmáticos de IL2 quando comparado aos indivíduos que possuíam o par *KIR2DS2\_C1C1*, mas que estavam infectados com *P. falciparum* (EspeciePlasmEff=-2,02; P=0,05) (Figura 5.10B).

Encontramos um efeito de interação positiva entre a média ponderada de genes ativadores e inibidores, os níveis de IL-6 e a espécie plasmoidal. Na Figura 5.10C podemos verificar que existe uma relação entre o aumento dos níveis de IL-6 nos indivíduos que estavam infectados com *P. vivax* no momento da coleta e que possuem uma maior média ponderada de genes ativadores (EffInt=4,86; P=0,01). Interessantemente, ao avaliarmos os pares *KIR-HLA*, observamos que existe uma relação entre o par *KIR2DL1\_C1C2* e o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 nos indivíduos que estavam infectados com *P. vivax* no momento da coleta (EffInt=7,65; P<0,001) (Figura 5.10D).

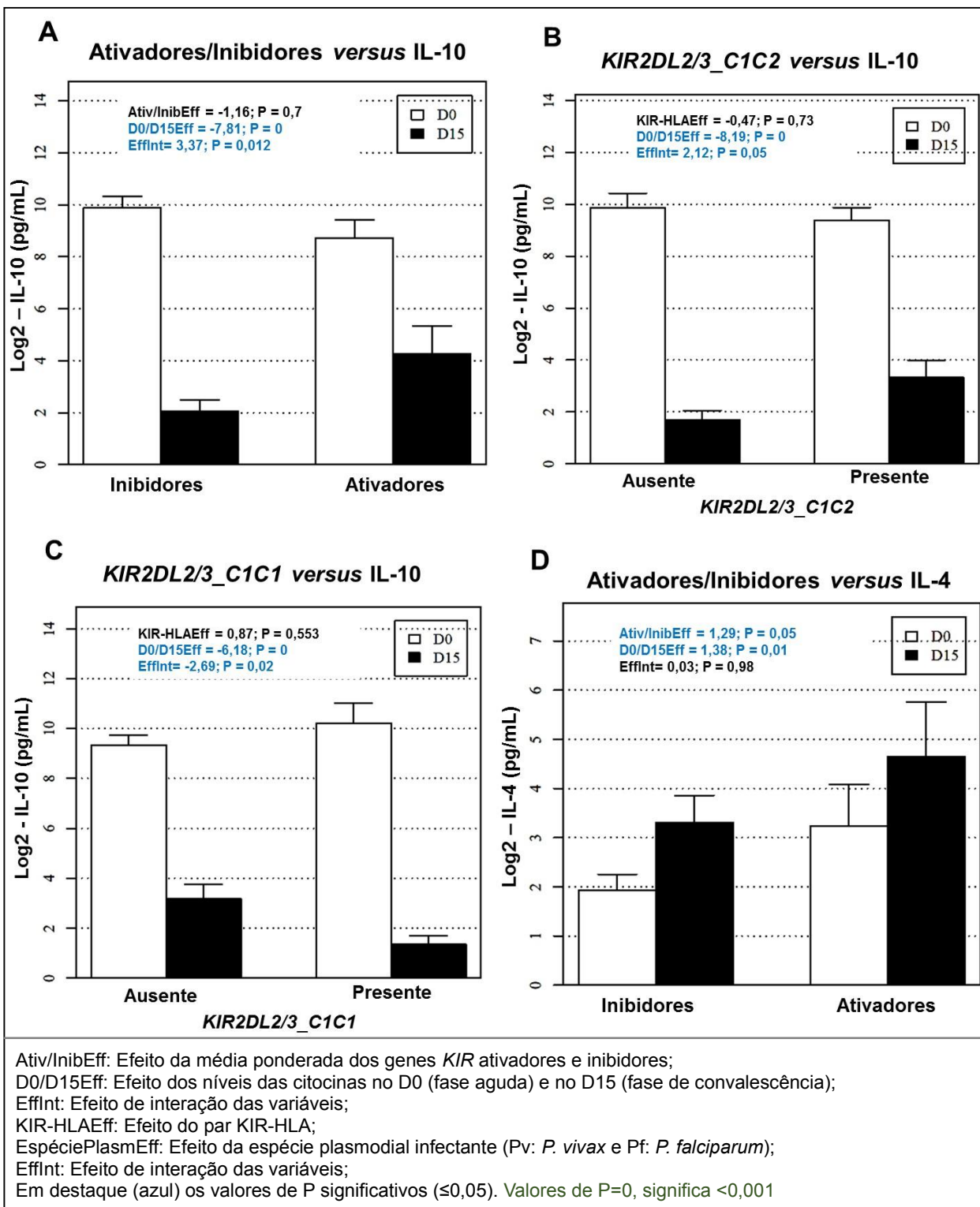


**Figura 5.10:** (A) e (B) Relação entre os níveis plasmáticos de IL1 $\beta$  e IL-2, o par *KIR2DS2\_C1C1* e a espécie plasmodial infectante. (C) e (D) Relação entre os níveis plasmáticos de IL6, a média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores e o par *KIR2DL1\_C1C2* e a espécie plasmodial infectante.

Entre as citocinas anti-inflamatórias, observamos que os níveis plasmáticos de IL-10 estão aumentados na fase aguda (D0) quando comparada a fase de convalescência (D15) (Figuras 5.11A a C e Figura 5.6C). Além disso, observamos associações interessantes entre os níveis de IL-10 e a média ponderada de genes ativadores/inibidores (Figura 5.11). Curiosamente, ao avaliarmos os pares *KIR-HLA* separadamente, somente dois pares inibidores, *KIR2DL2/3\_C1C2* e *KIR2DL2/3\_C1C1*, e um par ativador *KIR2DS1\_C1C2* apresentaram efeito de interação significativa com os níveis de IL-10 (Figuras 5.11B e C e Figura 5.18A).

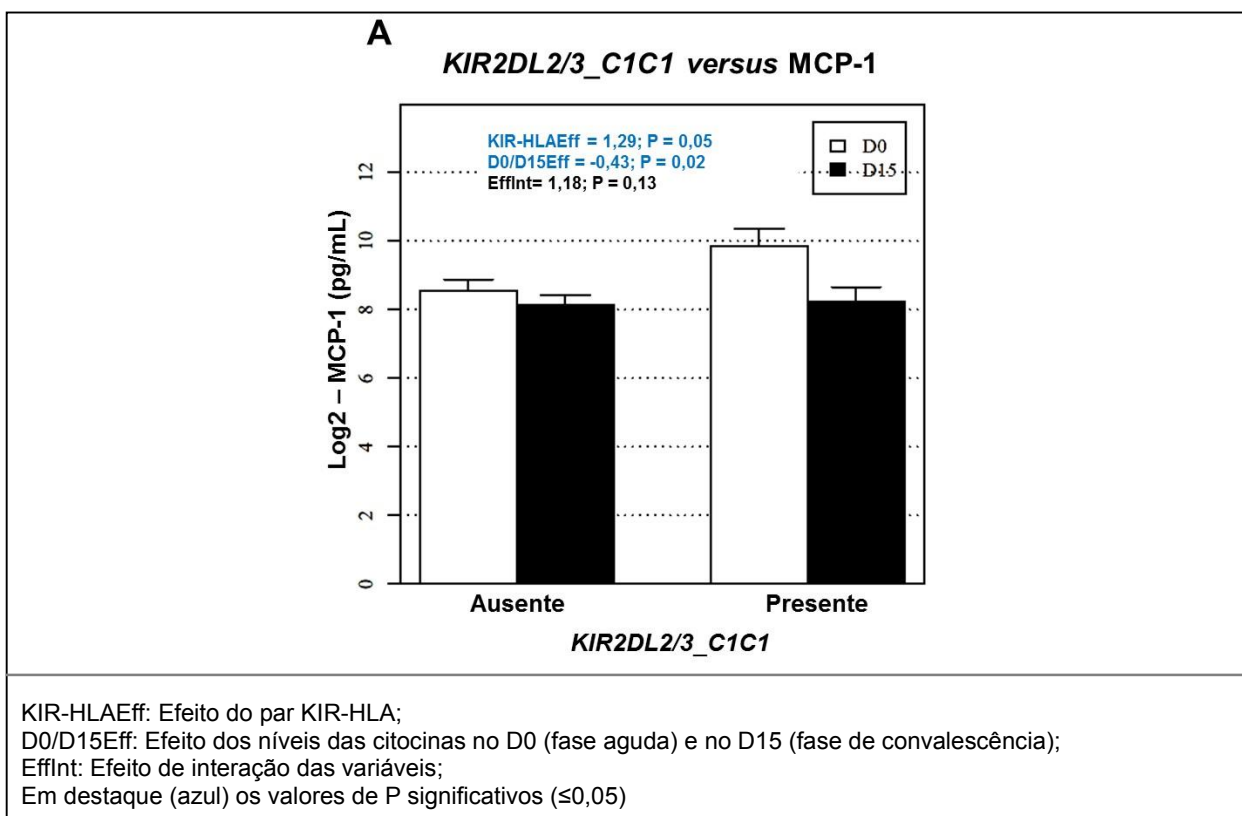
Na Figura 5.11A podemos observar um efeito de interação positiva entre a proporção de genes ativadores e inibidores e os níveis plasmáticos de IL-10. Com isso, verificamos que o aumento dos níveis plasmáticos dessa citocina está presente nos indivíduos que apresentaram uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores (EffInt=3,37; P=0,01). O efeito de interação positiva também foi encontrado na presença do par inibidor *KIR2DL2/3\_C1C2*. Logo, notamos que o aumento dos níveis plasmáticos de IL-10 ocorre nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL2/3\_C1C2* (EffInt=2,12; P=0,05) na fase de convalescência (D15) (Figura 5.11B), ao passo que nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL2/3\_C1C1* observamos o efeito de interação inverso (negativo) entre a presença deste par *KIR-HLA* e os níveis de IL-10. Com isso, verificamos que a diminuição dos níveis plasmáticos de IL-10 ocorre nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL2/3\_C1C1* (EffInt=-2,69; P=0,02) na fase de convalescência (D15) (Figura 5.11C).

Ainda no grupo das citocinas anti-inflamatórias, conforme mostra a Figura 5.11D, verificamos que os níveis plasmáticos de IL-4 estão aumentados na fase de convalescência (D15) quando comparada a fase aguda (D0) (D0/D15Eff=1,38; P=0,01) e que esse aumento está presente nos indivíduos que apresentaram uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores (Ativ/InibEff= 1,29; P=0,05).

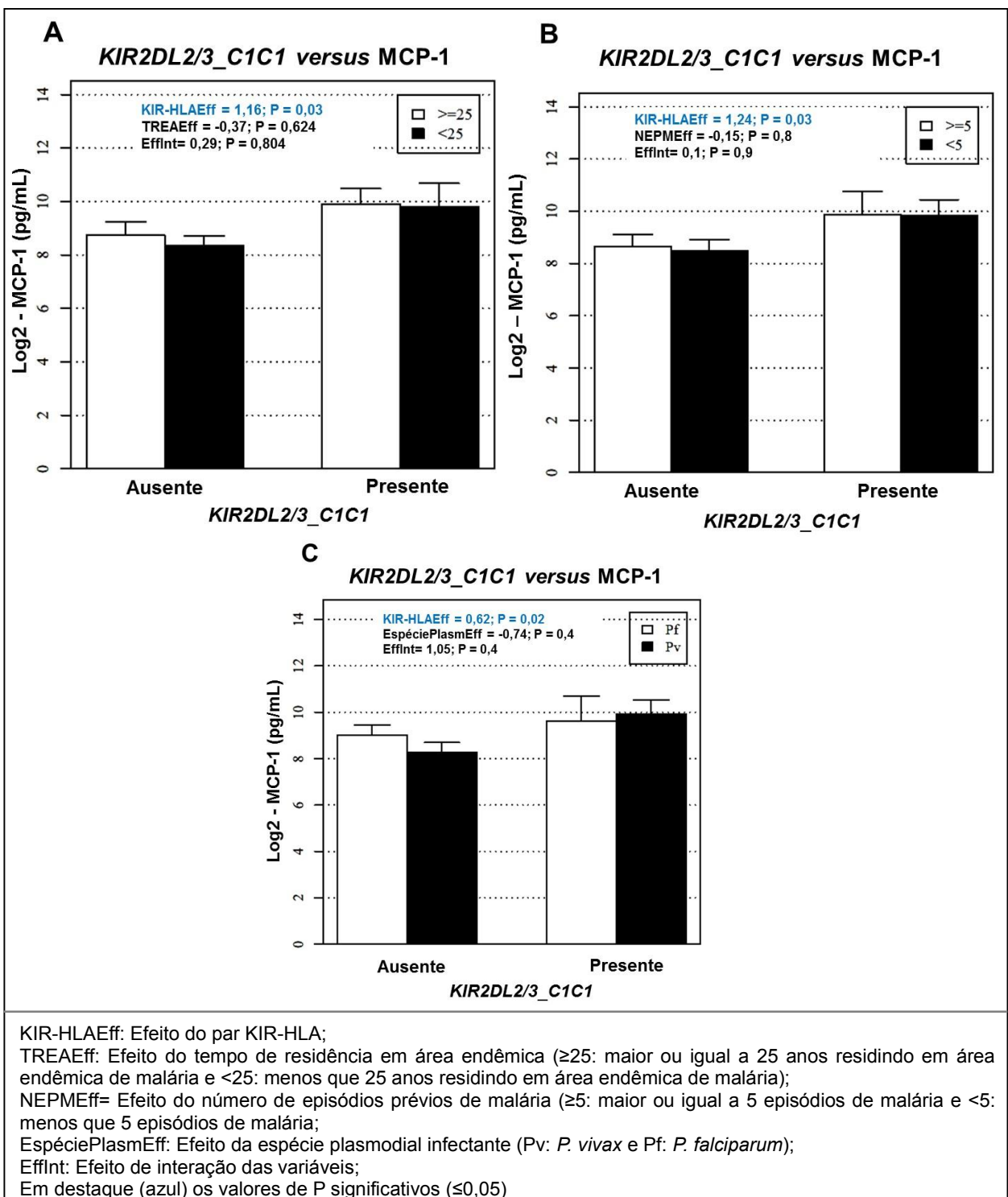


**Figura 5.11:** (A), (B) e (C) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-10 (D0 e D15) e a média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores e os pares inibidores KIR2DL2/3\_C1C2 e KIR2DL2/3\_C1C1. (D) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-4 (D0 e D15) e a média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores.

Entre as quimiocinas avaliadas, observamos associações quanto aos níveis plasmáticos de MCP-1 e MIP-1 $\beta$ , a média ponderada dos genes *KIR* ativadores e inibidores, os pares *KIR-HLA* e os parâmetros epidemiológicos. Conforme demonstrado na Figura 5.12, verificamos que os níveis plasmáticos de MCP-1 estão aumentados na fase aguda (D0) quando comparada a fase de convalescência (D15) (D0/D15Eff= -0,43; P=0,02), e esse aumento está presente nos indivíduos que possuem o par inibidor *KIR2DL2/3\_C1C1* (*KIR-HLAEff*=1,29; P=0,05). No entanto, o aumento dos níveis de MCP-1 nos indivíduos que possuem o par inibidor *KIR2DL2/3\_C1C1* parece não ter qualquer influência dos parâmetros epidemiológicos avaliados, visto que os resultados observados com estas variáveis não foram estatisticamente significativos (*TREAEff*=-0,37; *NEPMEff*=-0,15; *EspéciePlasmEff*=-0,74; P>0,05 em todos) (Figura 5.13A a C).



**Figura 5.12:** Relação entre os níveis plasmáticos de MCP-1 (D0 e D15) e o par *KIR2DL2/3\_C1C1*.

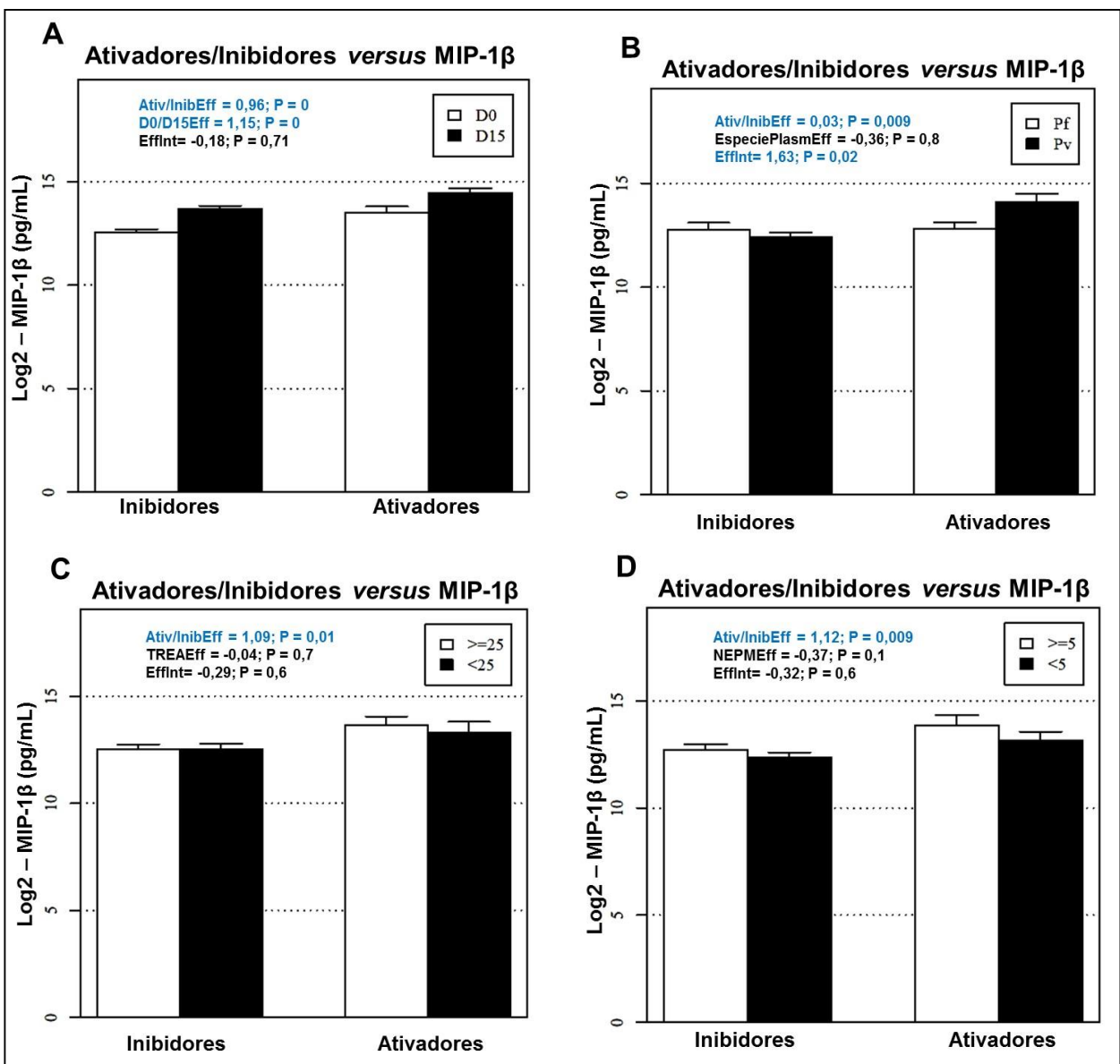


**Figura 5.13:** (A), (B) e (C) Relação entre os níveis plasmáticos de MCP-1, o par inibidor KIR2DL2/3\_C1C1 e parâmetros epidemiológicos.

A respeito dos níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$  observamos que essa quimiocina está aumentada na fase de convalescência (D15) quando comparada a fase aguda (D0) (D0/D15Eff=1,15; P<0,001), porém esse aumento está presente nos indivíduos que apresentam uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores (Ativ/InibEff=0,96; P<0,001) (Figura 5.14A). Além disso, observamos um efeito de interação positiva mostrando que existe uma relação entre o aumento dos níveis de MIP-1 $\beta$  nos indivíduos que possuem uma maior média ponderada de genes ativadores e que estavam infectados com *P. vivax* no momento da coleta (EffInt= 1,63; P= 0,02) (Figura 5.14B). Entretanto, o aumento dos níveis de MIP-1 $\beta$  nos indivíduos que apresentaram uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores parece não ter qualquer influência dos parâmetros epidemiológicos avaliados, visto que os resultados observados com estas variáveis não foram estatisticamente significativos (TREAEff=-0,04; NEPMEff=-0,37; P>0,05 em todos) (Figura 5.14C e D).

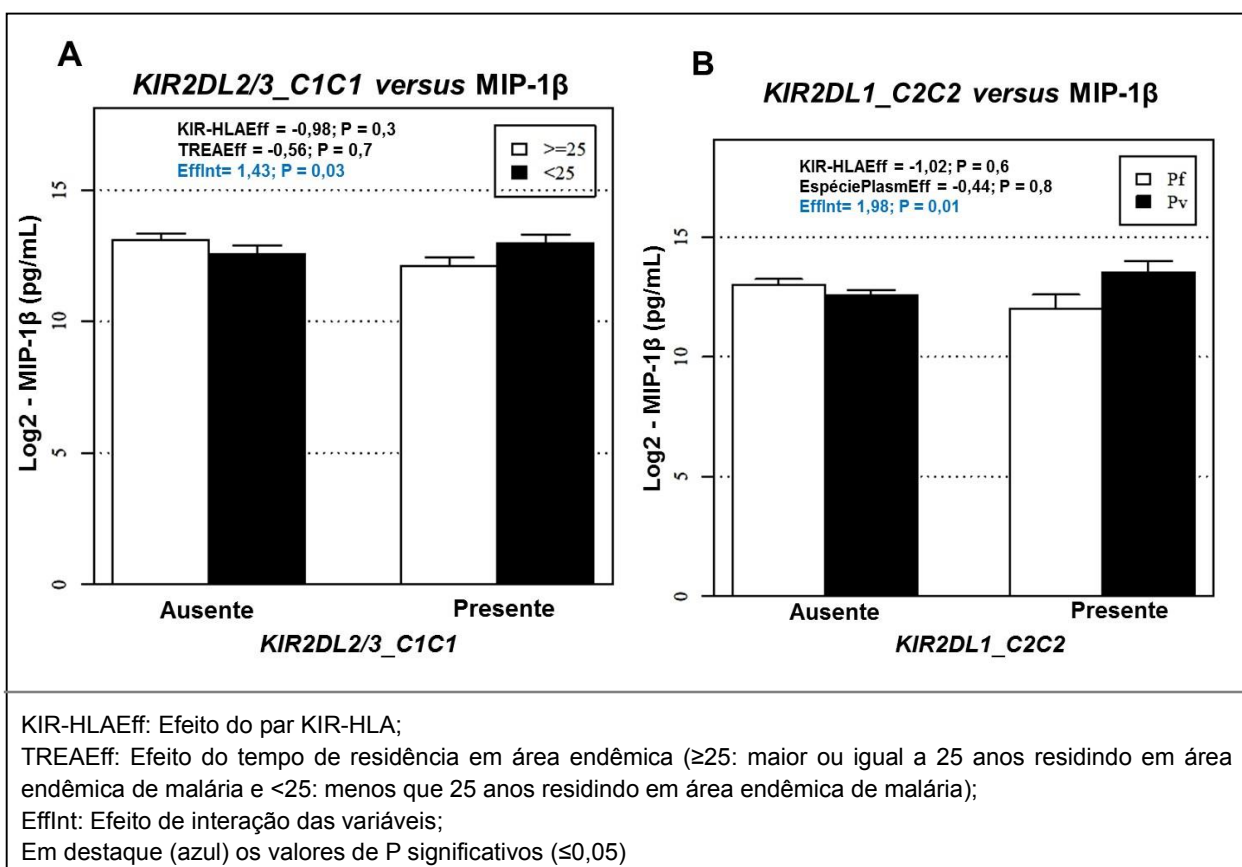
Na Figura 5.15A observamos um efeito de interação positiva entre a presença do par *KIR2DL2/3\_C1C1*, os níveis de MIP-1 $\beta$  e o TREA. Com isso, verificamos que o aumento dos níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$  ocorre nos indivíduos que possuem o par *KIR2DL2/3\_C1C1* no grupo dos indivíduos que vivem em área endêmica há menos de 25 anos (EffInt=1,43; P=0,03). Além disso, verificamos uma interação positiva entre a presença do par inibidor *KIR2DL1\_C2C2*, os níveis de MIP-1 $\beta$  e espécie plasmódio, logo, há um aumento dos níveis plasmáticos de MIP-1 $\beta$  em indivíduos que possuem o par *KIR2DL1\_C2C2* e que estavam infectados com *P. vivax* (IntEff= 1,98; P =0,01) (Figura 5.15B).





Ativ/InibEff: Efeito da média ponderada dos genes *KIR* ativadores e inibidores;  
 D0/D15Eff: Efeito dos níveis das citocinas no D0 (fase aguda) e no D15 (fase de convalescência);  
 EffInt: Efeito de interação das variáveis;  
 EspéciePlasmEff: Efeito da espécie plasmodial infectante (Pv: *P. vivax* e Pf: *P. falciparum*);  
 TREAEff: Efeito do tempo de residência em área endêmica (≥25: maior ou igual a 25 anos residindo em área endêmica de malária e <25: menos que 25 anos residindo em área endêmica de malária);  
 NEPMEff= Efeito do número de episódios prévios de malária (≥5: maior ou igual a 5 episódios de malária e <5: menos que 5 episódios de malária);  
 Em destaque (azul) os valores de P significativos (≤0,05). Valores de P=0, significa <0,001

**Figura 5.14:** (A) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1β (D0 e D15) e média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores. (B), (C) e (D) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1β, a média ponderada de genes *KIR* ativadores e inibidores e parâmetros epidemiológicos.



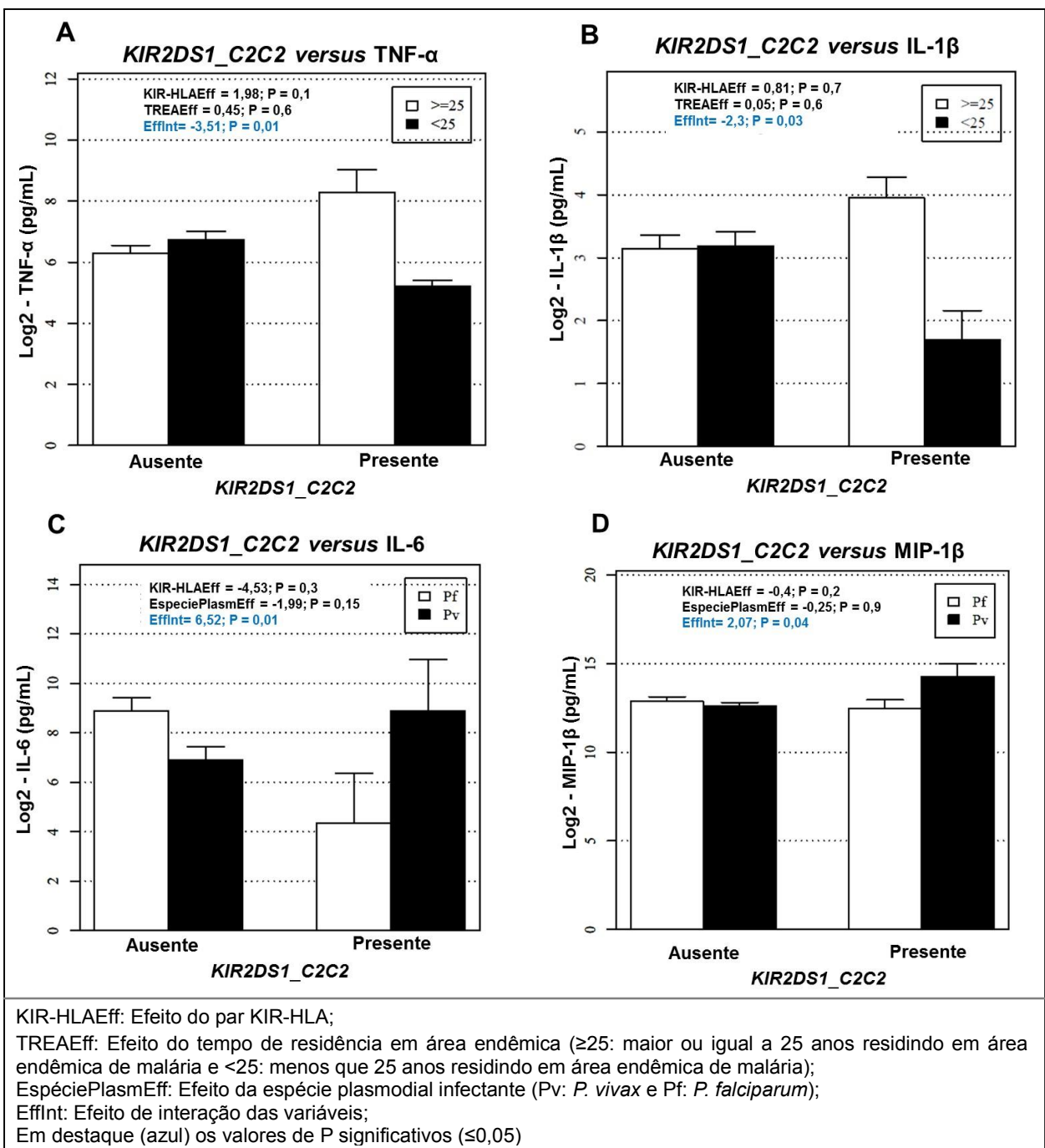
**Figura 5.15:** (A) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1β, o par inibidor KIR2DL2/3\_C1C1 e o tempo de residência em área endêmica. (B) Relação entre os níveis plasmáticos de MIP-1β, o par inibidor KIR2DL1\_C2C2 e a espécie plasmodial.

### 5.11 Relação entre os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas, parâmetros epidemiológicos e pares KIR-HLA com influência na proteção ou susceptibilidade à malária

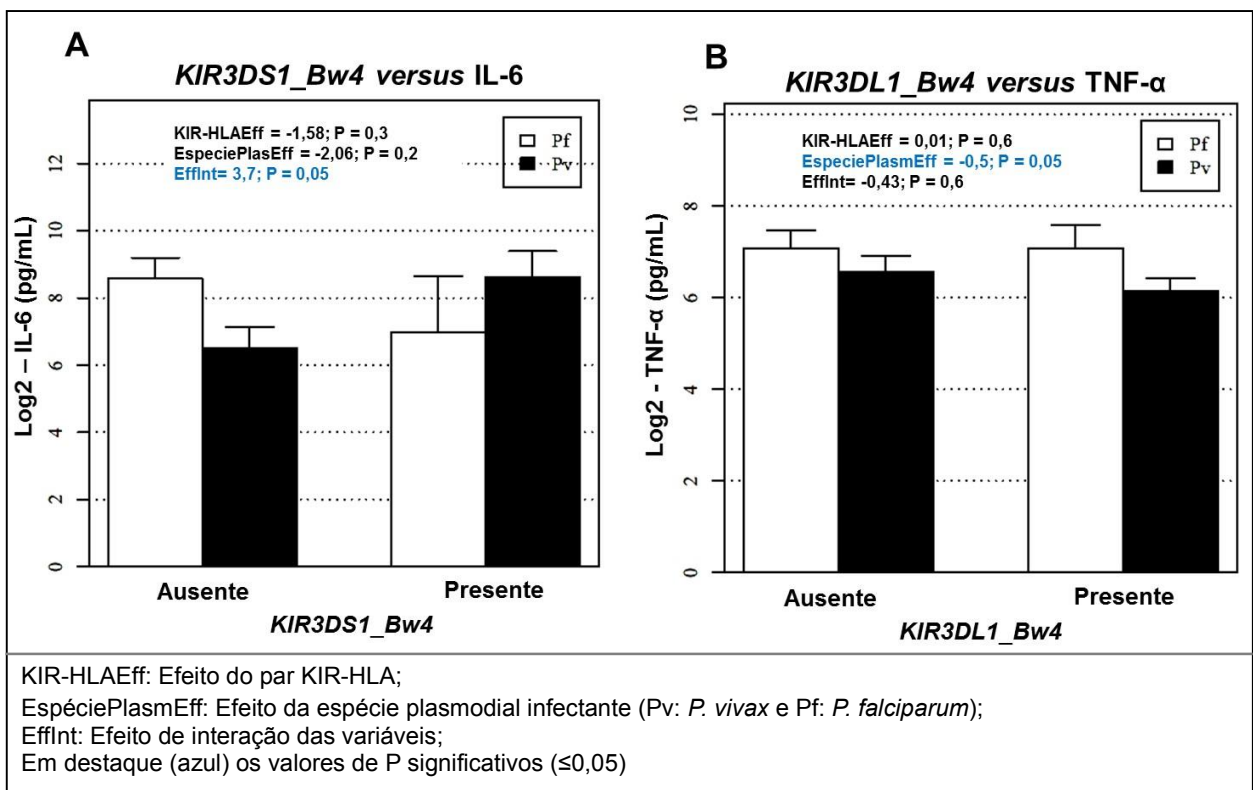
O teste two-way ANOVA também foi realizado para verificar uma possível influência entre a combinação dos pares KIR-HLA identificados como marcadores de proteção (*KIR3DL1\_Bw4*, *KIR2DS1\_C2C2* e *KIR3DS1\_Bw4*) e susceptibilidade (*KIR2DS1\_C1C2*, *KIR2DS2\_C1C2* e *KIR3DL2\_A3A11*) com os parâmetros epidemiológicos (TREA, NEPM e espécie plasmodial infectante) e sua interação com os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas. E os resultados significativos estão descritos abaixo.

Entre os marcadores de proteção, podemos observar um efeito de interação negativa entre a presença do par ativador *KIR2DS1\_C2C2*, os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 5.16A) e IL-1 $\beta$  (figura 5.16B), ambos em relação ao tempo de residência em área endêmica. Com isso, verificamos que a diminuição dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  ocorre nos indivíduos que possuem o par *KIR2DS1\_C2C2* e que vivem em área endêmica há menos de 25 anos (TNF- $\alpha$ : EffInt= -3,51; P=0,01 e IL-1 $\beta$ : EffInt= -2,3; P=0,03) (Figuras 5.16A e B). Por outro lado, foi possível verificar um efeito de interação positiva entre a presença do par ativador *KIR2DS1\_C2C2*, os níveis de IL-6 (Figura 5.16C) e MIP-1 $\beta$  (figura 5.16D), ambos em relação a espécie plasmodial. Com isso, nos indivíduos infectados com *P. vivax*, verificamos que existe uma relação entre o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 e MIP-1 $\beta$  e a presença do par *KIR2DS1\_C2C2* (IL-6: EffInt= 6,52; P= 0,001 e MIP-1 $\beta$ : EffInt= 2,07; P= 0,04) (Figuras 5.16C e 5.16D).

Também foi possível verificar um efeito de interação positiva entre a presença do par ativador *KIR3DS1\_Bw4*, os níveis de IL6 e a espécie plasmodial. Sendo assim, verificamos que existe uma relação entre o aumento dos níveis plasmáticos dessa citocina nos indivíduos que possuem o par *KIR3DS1\_Bw4* e que estavam infectados com *P. vivax* (EffInt= 3,7; P= 0,05) (Figura 5.17A). No único par inibidor encontrado como marcador de proteção, o *KIR3DL1\_Bw4*, foi possível observar uma relação entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a espécie plasmodial infectante. Portanto, os indivíduos infectados com *P. vivax* tiveram menores níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  quando comparados aos indivíduos infectados com *P. falciparum* (EspeciePlasmEff=-0,5; P=0,05). No entanto, esta diferença parece não ter qualquer influência do par inibidor *KIR3DL1\_Bw4* (KIR-HLAEff=0,01; P=0,6 e EffInt=-0,43; P=0,6) (Figura 5.17B).

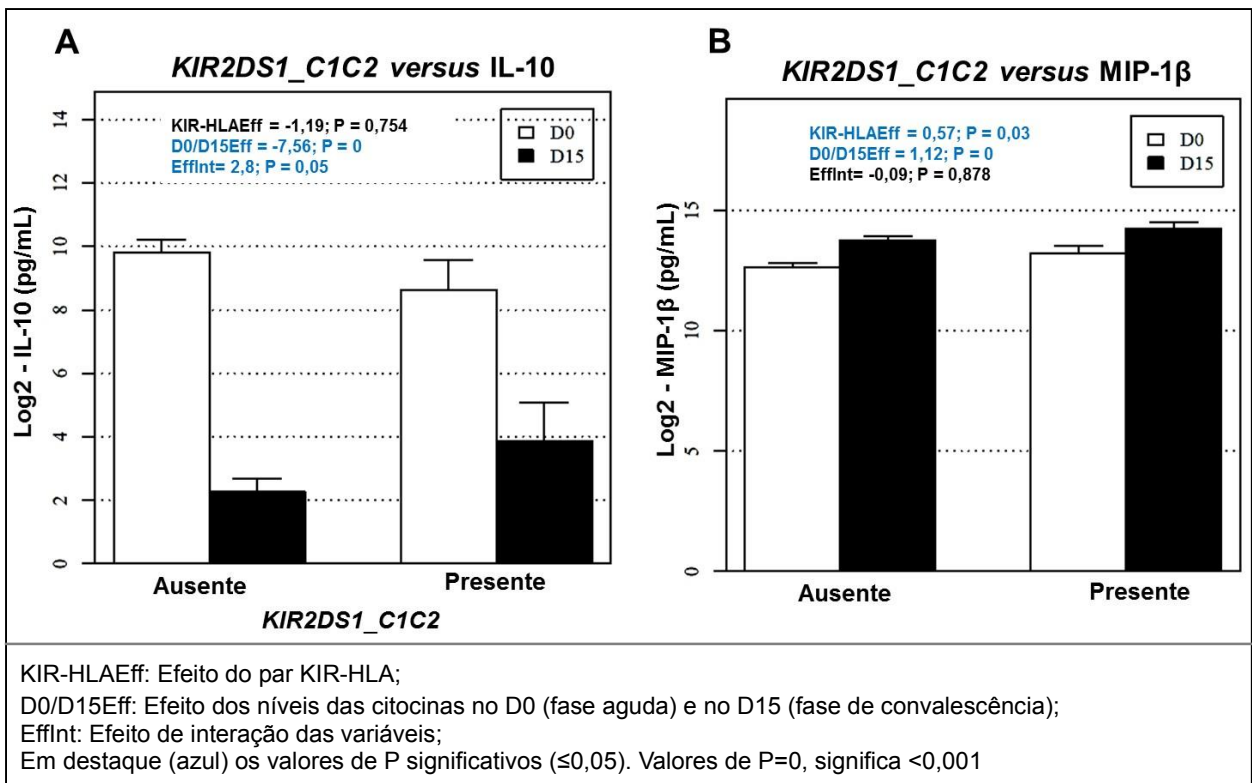


**Figura 5.16:** (A) e (B) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o par ativador *KIR2DS1\_C2C2* e o tempo de residência em área endêmica. (C) e (D) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-6 e MIP-1 $\beta$ , o par *KIR2DS1\_C2C2* e espécie plasmodial infectante.



**Figura 5.17:** (A) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-6, o par ativador *KIR3DS1\_Bw4* e espécie plasmodial infectante. (B) Relação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , o par inibidor *KIR3DL1\_Bw4* e espécie plasmodial infectante.

Entre os marcadores de susceptibilidade, podemos observar um efeito de interação positiva entre a presença do par ativador *KIR2DS1\_C1C2* e os níveis de IL-10 (D0 e D15). Logo, verificamos que existe uma relação entre o aumento dos níveis plasmáticos de IL-10 nos indivíduos que possuem o par *KIR2DS1\_C1C2* ( $P=0,05$ ) na fase de convalescência (D15) (Figura 5.18A). Ainda em relação a esse marcador é possível observar que os níveis plasmáticos da quimiocina MIP-1 $\beta$  estão aumentados na fase de convalescência (D15) ( $D0/D15\text{Eff}=1,12$ ;  $P<0,001$ ) e esse aumento foi observado nos indivíduos que possuem o par *KIR2DS1\_C1C2* ( $\text{KIR-HLA}\text{Eff}=0,57$ ;  $P=0,03$ ) (Figura 5.18B).



**Figura 5.18:** (A) e (B) Relação entre os níveis plasmáticos de IL-10 (D0 e D15) e MIP-1β (D0 e D15) e o par ativador *KIR2DS1\_C2C2*.

**Tabela 5.10:** Resumo das alterações detectadas entre as variáveis genéticas, epidemiológicas e o efeito observado nas citocinas e quimiocinas.

Variáveis genéticas		Influência das Variáveis epidemiológicas	Efeito	
Média ponderada de genes <i>KIR</i> ativadores		D15 / infectados com <i>P. vivax</i>	↑ MIP-1 $\beta$	
		Infectados com <i>P. vivax</i>	↑ IL-6	
		D15	↑ TNF- $\alpha$	
			↑ IL-4	
Pares ativadores	KIR2DS1_C1C2	ausente	↑ MIP-1 $\beta$	
		D15	↑ IL-10	
	KIR2DS1_C2C2	ausente	↑ MIP-1 $\beta$	
		Infectados com <i>P. vivax</i>	↑ IL-6	
		TREA <25 anos	↓IL-1 $\beta$ ↓TNF- $\alpha$	
	KIR2DS2_C1C1	Infectados com <i>P. vivax</i>	↑IL-1 $\beta$ ↑IL-2	
	KIR2DS2_C2C2	TREA <25 anos	↑ TNF- $\alpha$	
	KIR3DS1_Bw4	Infectados com <i>P. vivax</i>	↑ IL-6	
	Pares inibidores	KIR2DL1_C1C2	TREA <25 anos	↓IFN- $\gamma$
			Infectados com <i>P. vivax</i>	↑ IL-6
KIR2DL1_C2C2		ausente	↑ MIP-1 $\beta$	
KIR2DL2/3_C1C1		TREA <25 anos / infectados com <i>P. vivax</i>	↑ MIP-1 $\beta$	
		TREA <25 anos	↑ TNF- $\alpha$	
		D0	↑ MCP-1	
		D15	↓IL-10	
KIR2DL2/3_C1C2	D15	↑ IL-10		
	TREA <25 anos	↓IFN- $\gamma$		
KIR3DL1_Bw4	Infectados com <i>P. vivax</i>	↓TNF- $\alpha$		

TREA < 25 anos: Tempo de residência em área endêmica menor que 25 anos:

## 6. Discussão

---

No presente estudo nós caracterizamos o perfil das frequências gênicas dos 16 genes que codificam os receptores KIR, bem como os genes de seus respectivos ligantes, as moléculas HLA-I, em uma população brasileira de área endêmica de malária (Porto Velho – Rondônia). Além disso, buscamos identificar uma possível associação entre esses genes e a ocorrência/evolução da infecção malárica.

Inicialmente, na análise epidemiológica da nossa população, os dados demonstraram que a população é naturalmente exposta à malária em diferentes níveis. Dos 377 indivíduos que participaram do estudo, uma grande proporção dos indivíduos (86,5%) relatou ter tido pelo menos um episódio prévio de malária. Além disso, no momento da coleta, aproximadamente, 29% da população estava com malária, sendo que a grande maioria (68,5%) por *P. vivax*. Vale ressaltar que a maior prevalência de *P. vivax* quando comparado ao *P. falciparum* é consistente com o atual padrão endêmico da Amazônia brasileira (Sivep-Malária/SVS/MS). Em relação à procedência dos indivíduos, embora tenhamos encontrado uma expressiva prevalência de indivíduos nativos da região amazônica (79%), pudemos observar que 21% da nossa população era proveniente de estados não endêmicos de malária (migrantes), em especial das regiões sudeste e nordeste. Embora saibamos que a população brasileira é bem diversificada devido à miscigenação entre indivíduos europeus, africanos e ameríndios (Fridman *et al.* 2014), a análise de ancestralidade demonstrou que a população de Porto Velho tem uma maior contribuição ancestral por parte dos ameríndios (76% de 137 indivíduos), mesmo entre os indivíduos migrantes. Esse achado era esperado, visto que foram os ameríndios os habitantes originais da região (Ferreira *et al.* 2002).

O interesse em buscarmos uma inter-relação, com base nas frequências dos genes *KIR*, entre a população de Porto Velho e outras populações do globo fez com que realizássemos a análise do componente principal ou PCA. A população de Porto Velho (sigla BPV) se mostrou inter-relacionada com outras populações de colonização europeia, como os mestiços da Venezuela e também com populações que migraram de outros continentes para a América há alguns séculos, como os hispânicos americanos



(sigla USACH) e os asiáticos americanos (sigla USACAA). Adicionalmente, foi observado que a população de Porto Velho está distante de algumas populações, como por exemplo da Ásia, da África ocidental (Senegal) e do Oriente Médio. Esses dados aliados à análise de ancestralidade da população de Porto Velho através de 32 marcadores informativos de ancestralidade, na qual a contribuição ameríndia foi predominante, demonstra o perfil miscigenado desta população. Desde a colonização portuguesa (século XVIII), Porto Velho recebeu uma sucessão de ondas migratórias associados ao ciclo da borracha e à construção da ferrovia Madeira-Mamoré e, mais recentemente, nos anos 70 e 80, os programas de colonização no segmento da agricultura e de assentamentos humanos. Devido a essa última onda de migração, Porto Velho e as regiões próximas receberam trabalhadores, nativos da região sul, sudeste e nordeste, com antepassados predominantemente europeus (principalmente italianos, alemães e poloneses) provenientes das duas primeiras regiões e africanos da terceira região, refletindo no aumento da diversificação da composição étnica nesta área (Rivero e Covas 2013).

Na análise das frequências gênicas do *KIR* observamos que os genes *KIR2DL1*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR2DL3* foram os mais prevalentes (acima de 89%). Essas altas frequências são similares às encontradas em outras regiões brasileiras, como Rondônia, Mato Grosso do Sul, Curitiba, Pará, Belo Horizonte e Rio de Janeiro (Augusto *et al.* 2013; Augusto *et al.* 2012a e b; Pedroza *et al.* 2011; Jobim *et al.* 2010; Rudnick *et al.* 2008; Single *et al.* 2007).

As frequências dos genes que codificam os receptores ativadores (*KIR2DS* e *KIR3DS*) na nossa população permaneceram entre 22,5% a 43,2%. Essa baixa frequência está de acordo com a encontrada em várias partes do mundo (<http://www.allelefrequencies.net>), fato esse esperado devido ao fenótipo de ativação que esses genes ocasionam na célula NK (Watzl *et al.* 2014). Um quantitativo menor de genes *KIR* ativadores comparado ao de genes *KIR* inibidores é fundamental durante o desenvolvimento da célula NK para que a célula seja educada a tolerar os antígenos próprios (Davis e Rizzieri 2015). No banco de dados *Allele frequencies* é possível observar alguns genótipos que não possuem nenhum gene *KIR* ativador, enquanto que o contrário, ou seja, genótipo com nenhum gene *KIR* inibidor nunca foi evidenciado,

reforçando a importância evolutiva da manutenção de uma maior frequência de genes *KIR* inibidores (Augusto e Petzl-Erler 2015).

O único gene que codifica um receptor ativador que não segue esse padrão de baixa frequência é o *KIR2DS4* (<http://www.allelefrequencies.net/kir6006a.asp>). Na nossa população sua frequência foi bem alta (93,6%) e na maioria desses indivíduos (cerca de 31%) ele é o único gene ativador presente. A presença do *KIR2DS4* como o único gene ativador do repertório genético do indivíduo é característica do genótipo 1, o único genótipo representante do haplótipo AA na nossa população. Embora muitas das vezes esse gene *KIR* seja o único ativador no genótipo do indivíduo, há versões mutadas desse gene que não serão expressas na membrana, mas sim permanecerão solúveis, enquanto que a versão selvagem desse gene, será expressa na superfície das membranas celulares. Na nossa população observamos que as variantes que codificam a versão mutada foram as mais frequentes (66,5%). Tais achados corroboram os da literatura em diferentes populações, incluindo população brasileira (Vendelbosch *et al.* 2015; Marangon *et al.* 2014). O haplogrupo A é muito frequente na maioria das populações estudadas e devido à alta frequência da versão mutada do *KIR2DS4*, muitos indivíduos sequer apresentam genes ativadores funcionais em seu repertório KIR.

Nosso estudo permitiu a identificação de 46 perfis genotípicos de *KIR*, em meio aos 553 perfis atualmente descritos no banco de dados *Allele Frequencies* (<http://www.allelefrequencies.net>). Um detalhe importante é que a célula NK não necessariamente expressa todos os genes *KIR* ao mesmo tempo, nem em todos os clones. Além disso, a forma como ocorre a coexpressão de um subconjunto de genes codificantes de receptores parece ser inicialmente aleatório (Dunphy *et al.* 2015). Dessa maneira, nem todas as células NK do organismo apresentam os mesmos receptores, podendo cada clone ser específico para certos locais ou tecidos e cada um desses clones ser mais ou menos reativo a determinados patógenos ou doenças (Dunphy *et al.* 2015). Contudo, o repertório de expressão dos receptores KIR de um indivíduo depende diretamente dos genes *KIR* herdados. Dentro desse contexto, verificamos na nossa população que o número de genes *KIR* por perfil variou entre 7 a 14 genes e, como esperado, os genes *KIR* inibidores foram mais abundantes que os *KIR* ativadores em todos os perfis encontrados. Dos 46 perfis, apenas três (6, 73 e 87) possuíam todos os

genes *KIR* ativadores (6 genes: *KIR2DS1-5* e *KIR3DS1*) distribuídos em 3,5% da população (13 indivíduos). No entanto, esse perfil também é caracterizado por apresentar quase que as quantidades máximas de genes *KIR* inibidores (entre 7 a 8 genes: *KIR2DL1-5* e *KIR3DL1-3*). Isso sugere o envolvimento de mecanismos evolutivos, mantendo esses genes inibidores e ativadores em equilíbrio evitando assim estímulos ativadores exacerbados na célula NK (Davis e Rizzieri 2015). Dentre os perfis genotípicos caracterizados, o mais diversificado foi o 6. Esse perfil é definido por possuir todos os genes *KIR* descritos, incluindo os pseudogenes, permitindo que a célula NK tenha disponíveis genes para codificar todos os receptores *KIR*. Encontramos esse perfil em baixa frequência, representando 2,4% da população (9 indivíduos). É interessante ressaltar que esse perfil faz parte do grupo de perfis presentes somente nos indivíduos nativos. Segundo estudos anteriores, cujo os dados compõem o banco de dados *Allele frequencies*, a frequência do perfil 6 se mantém baixa em várias partes do mundo e apresenta distribuição cosmopolita.

Na nossa população, apenas 9 perfis genotípicos (Id 1 a 7, 71 e 106) representam cerca de 75% da diversidade encontrada. Observamos que quase metade dos perfis encontrados (19 perfis - 41,3%) possui apenas um indivíduo como representante. Desta maneira, assim como já foi observado em estudos anteriores com populações ameríndias, essa elevada diversidade quanto ao repertório dos genes *KIR* é aparente e isso pode ser resultado da heterogeneidade da amostra, visto que não é uma população geneticamente isolada (Augusto DG et al., 2015). Os perfis identificados como 1 e 2 foram os mais comuns na nossa população. Esses perfis foram os primeiros a serem descritos e são muito comuns em diferentes regiões geográficas (<http://www.allelefrequencies.net>). Comparando com os dados do *Allele frequencies*, as frequências dos perfis genotípicos 1 e 2 na nossa população foram semelhantes as observadas nas Américas (Norte, Central e Sul), corroborando os achados obtidos através de estudos utilizando marcadores clássicos, bem como DNA mitocondrial, que explicam a história demográfica humana do continente americano. A começar com o primeiro assentamento das Américas pelos asiáticos através do Estreito de Bering há aproximadamente 15-18.000 anos atrás, adicionado a migrações do período pós-descobrimto com mais de cinco séculos de miscigenação entre nativos americanos, europeus, africanos e asiáticos modernos (Marangoni et al. 2014; Ascunce et al. 2013).

Os perfis genotípicos também foram agrupados e avaliados segundo a classificação de nativos e migrantes. Observamos que o grupo dos nativos apresentava uma maior variabilidade de genótipos (41/46) e que um grande número desses genótipos (26/46) só ocorria nesse grupo. No grupo dos migrantes, além da menor variabilidade genotípica (20/46), apenas 5 genótipos só ocorriam nesse grupo. Nenhuma associação foi encontrada entre os parâmetros epidemiológicos (número de episódio prévio e tempo de residência em área endêmica) dos indivíduos do grupo dos nativos que não compartilhavam genótipos (N=60) comparado aos indivíduos que compartilhavam genótipos (N=309).

Na análise do perfil das frequências dos ligantes de KIR, as moléculas HLA-I, observamos uma alta prevalência dos genes que codificam as moléculas HLA-C1, HLA-Bw4 e HLA-C2 (todos acima de 66%). Essas frequências também foram similares às encontradas em uma população do Paraná, sul do Brasil (Beltrame *et al.* 2013). Numerosos estudos genéticos têm demonstrado a influência de pares de genes KIR-HLA no desenvolvimento de doenças como câncer, auto-imunes e infecciosas, visto que a existência do gene *KIR* sem a presença do seu respectivo ligante HLA-I torna a célula NK incapaz de gerar o seu fenótipo de ativação ou inibição (Hou *et al.* 2015; De Re *et al.* 2015; Giebel *et al.* 2014; Jarduli *et al.* 2014; Kulkarni *et al.* 2008). Sendo assim, avaliamos as combinações de pares KIR-HLA em nossa população. Em relação à coexistência do loci KIR e HLA-I no mesmo indivíduo, observamos que os pares com o perfil inibidor KIR2DL2/3\_C1, KIR3DL1\_Bw4 e KIR2DL1\_C2 foram os mais frequentes, acima de 64%. As altas frequências dos pares citados anteriormente podem ser explicadas pela elevada prevalência dos respectivos genes separadamente. Esses dados corroboram a ideia da co-evolução entre os genes KIR e HLA, sustentadas por diversos trabalhos (Augusto e Petzl-Erler 2015; Norman *et al.* 2013; Hirayasu *et al.* 2012).

Nossos resultados mostraram a presença de marcadores envolvidos tanto na susceptibilidade quanto na proteção à malária baseados em parâmetros epidemiológicos relatados pelos indivíduos, como número de episódios prévios de malária e tempo de residência em área endêmica. Observamos como marcadores de susceptibilidade à malária o par inibidor *KIR3DL2\_A3/A11* e os pares ativadores *KIR2DS1\_C1/C2* e

*KIR2DS2\_C1/C2*. E como marcadores de proteção os pares ativadores *KIR2DS1\_C2/C2* e *KIR3DS1\_Bw4* e o par inibidor *KIR3DL1\_Bw4*.

Um fato curioso é a presença de dois pares ativadores exercendo influência na susceptibilidade à infecção, visto que a presença desses pares poderia contribuir no fenótipo de ativação da célula NK, limitando a multiplicação do plasmódio. Os genes *KIR* de ativação possuem poucos ligantes *HLA-I* definidos. No entanto, para o par *KIR2DS1\_C2C2* ou *C1/C2* vários trabalhos vêm demonstrando que essa premissa não é verdadeira (Hou *et al.* 2015; David *et al.* 2013; Pittari *et al.* 2013). Na literatura ainda não há um consenso sobre a interação do gene *KIR2DS2* com o *HLA-C1* de tal maneira que, recentemente Liu J e colaboradores (2014) sugeriram a possibilidade deste gene ativador possuir o HLA-A\*11 como outra opção de ligante. Entretanto, foi demonstrado que células NK que apresentavam em sua superfície somente o receptor *KIR2DS2* sofreram ativação na presença do ligante *HLA-C1* (David *et al.* 2013). Os autores desse trabalho demonstraram que, quando houve a co-expressão do par ativador *KIR2DS2\_C1* e do par inibidor *KIR2DL2\_C1*, o efeito inibidor foi dominante sobre o efeito ativador. Logo, essa observação nos faz levantar a hipótese de que a coexistência, na nossa população, do par inibidor *KIR2DL2\_C1C1* ou *C1C2* em todos os indivíduos que possuem o par ativador *KIR2DS2\_C1C1* ou *C1C2* está inibindo a ação efetora dessas células, tornando esses indivíduos mais susceptíveis a infecção. Além disso, a relevância biológica dos genes *KIR2DS1* e *2DS2* e seus ligantes *HLA-C1* e/ou *-C2* já foi observada em estudos recentes com diferentes doenças como lúpus (Hou *et al.* 2015), doença de Chagas (Ayo *et al.* 2015) e hepatite C (Kuśnierczyk *et al.* 2015). As moléculas *HLA-A3* e *HLA-A11*, e mais recentemente o *HLA-B27*, são as moléculas descritas como ligantes do receptor *KIR3DL2* (Augusto *et al.* 2015; Hatano *et al.* 2015). Embora a interação *KIR3DL2\_A3/A11* pareça ser fraca e altamente peptídeo dependente (Augusto *et al.* 2015), um trabalho recente forneceu evidências *in vivo* desta interação (Augusto *et al.* 2012a). Ainda nesse trabalho foi demonstrada a presença do par inibidor *KIR3DL2\_A3/A11* fortemente associado com a doença autoimune pênfigo foliáceo.

A respeito dos marcadores de proteção, é interessante notar a presença de um par inibidor exercendo influência na proteção à malária. Isto não é esperado, já que a presença desse par poderia ocasionar um fenótipo de inibição da célula NK, permitindo

o desenvolvimento e multiplicação do plasmódio. O receptor inibidor KIR3DL1 reconhece moléculas de HLA-A e HLA-B que possuem o epítipo Bw4 (Hernández-Ramírez *et al.* 2015). O gene que codifica este receptor KIR apresenta um extenso polimorfismo adquirido por SNPs e por eventos de recombinação gênica. Esses polimorfismos podem acarretar heterogeneidade na resposta da célula NK, gerando redução tanto na expressão desses receptores, quanto na ligação com o HLA-Bw4 (Hernández-Ramírez *et al.* 2015; Mulrooney *et al.* 2015). Além disso, autores sugerem que as células NK com esse receptor são menos controladas por sinais inibidores do que outras células NK e, portanto, mais facilmente ativadas para sua atividade citotóxica e conseqüentemente produção de IFN- $\gamma$ , apoiando a nossa hipótese (Umemura *et al.* 2014).

Conforme dito anteriormente, a análise de ancestralidade mostrou que, tanto no grupo dos nativos quanto no grupo dos migrantes, a ascendência ameríndia foi predominante. No entanto, foram encontradas diferenças, já esperadas, nos parâmetros epidemiológicos avaliados entres esses dois grupos. Os indivíduos migrantes apesar de residirem em área endêmica há menos tempo que os nativos, apresentaram mais episódios prévios de malária (NEPM). Algumas hipóteses podem ser evocadas para explicar esse achado, dentre elas: i) menor grau de imunidade antimalárica associado ao menor tempo de exposição a infecção plasmodial; ii) *status* imunológico e iii) *background* genético. Nesse contexto, em nossas análises, observamos uma maior frequência do par KIR3DL2\_A3/A11 no grupo dos migrantes. Como identificado anteriormente, esse par está relacionado como marcador de susceptibilidade, segundo o modelo de incidência baseado nos seguintes parâmetros epidemiológicos: número de episódios prévios de malária e tempo de residência em área endêmica. Em contrapartida, nenhum marcador de proteção foi encontrado estatisticamente significativo no grupo dos nativos.

Sabe-se que as células NK estão entre as primeiras células a atuarem no controle da infecção malárica (Chen *et al.* 2014). A forma como essas células irão responder frente a um patógeno ou corpo estranho é modulada pelos estímulos provocados na interação dos receptores com seus ligantes, principalmente na dos receptores *KIR* e seus ligantes. Isso poderá refletir no perfil de resposta imunológica (anti ou pró-inflamatória), em geral caracterizado pelo perfil de citocinas, durante a resposta imune na fase eritrocítica (Liehl *et al.* 2015). Além disso, a produção de citocinas e quimiocinas é crítica

para o controle da parasitemia e sintomas da doença (Pattaradilokrat *et al.* 2014). Dentro desse contexto, avaliamos a existência de uma possível associação entre a combinação dos pares KIR-HLA, a média ponderada de genes ativadores/inibidores, os parâmetros epidemiológicos, e os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas presentes nos indivíduos infectados no momento da coleta.

Inicialmente, observamos que durante a fase aguda da infecção (dia 0), somente a citocina IL-1 não apresentou alteração quando comparada aos controles. Nos indivíduos infectados, a maioria das citocinas está elevada na fase de convalescência (D15) quando comparada a fase aguda (D0) (Tabela 5.10). Essa elevação dos níveis séricos de citocina durante a infecção já vem sendo relatada tanto na malária não complicada como na malária grave (Dalko *et al.* 2015; Rodrigues-da-Silva *et al.* 2014).

A partir da análise com o two-way ANOVA, observamos associação entre algumas citocinas e a média ponderada de genes KIR ativadores. Os níveis plasmáticos das citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10 estavam aumentados nos indivíduos que possuíam uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores. A atividade principal da IL-4 é determinar o perfil de resposta Th2 e inibir a resposta Th1, pela supressão da produção e da atividade do IFN- $\gamma$  (Sarangi *et al.* 2014). Essa citocina se destaca como um importante componente tanto na resposta humoral, quanto no desenvolvimento de uma resposta celular, mediada por linfócitos T CD8+, contra o estágio hepático da malária (Spangler *et al.* 2015; Carvalho *et al.* 2002). Em nosso estudo, observamos que os níveis de IL-10 estavam aumentados na fase aguda (D0), enquanto que na fase de convalescência (D15), os níveis plasmáticos elevados ficaram por conta das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) e da IL-4. O achado desses altos níveis de IL-10 foi acompanhado de uma interação positiva tanto com o par inibidor *KIR2DL2/3\_C1C2* quanto com o par ativador *KIR2DS1\_C1C2*, mostrando que os indivíduos portadores desses pares produziram maiores níveis plasmáticos de IL-10. O par ativador *KIR2DS1\_C1C2* foi identificado como um dos marcadores de susceptibilidade à malária através do modelo de incidência (modelo de regressão de Poisson) e, conforme discutido anteriormente, autores sugerem que o efeito inibidor predomina sobre o efeito ativador, hipótese essa demonstrada por David G e colaboradores (2013) com genes inibidores e ativadores que apresentam o mesmo

ligante HLA-I. No entanto, com base nos nossos resultados, acreditamos que o par ativador *KIR2DS1\_C1C2* quando associado em conjunto a outros genes *KIR* ativadores, poderá contribuir para uma resposta exacerbada das células NK durante a fase inicial da infecção, auxiliando no controle da doença, principalmente via IL-10. Embora o papel da IL-10 na malária seja controverso (Guiyedi *et al.* 2015), nossa hipótese poderá servir de apoio a diversos estudos que vêm sugerindo a atuação de IL-10 na redução da reação inflamatória mediada por citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Além disso, estudos em modelos humanos e murinos têm demonstrado consistentemente que a IL-10 parece ser uma citocina importante na diminuição da inflamação e consequentemente proteção clínica (Rodrigues-da-Silva *et al.* 2014; Abeles *et al.* 2013).

A associação entre a média ponderada de genes *KIR* ativadores também foi encontrada nos indivíduos cujos níveis da quimiocina MIP-1 $\beta$  estavam elevados. Além disso, esses indivíduos estavam infectados com *P. vivax* no momento da coleta. Nossos resultados sugerem que a presença de uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores seja um fator importante na ativação das células NK, contribuindo para produção de quimiocinas como o MIP-1 $\beta$ . Embora acreditamos que essas células NK estão sendo ativadas principalmente a nível tecidual e durante a fase pré-eritrocítica (fase hepática), sabemos que esta ativação será importante no delineamento da resposta na fase eritrocítica da infecção.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, os níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$  estavam aumentados nos indivíduos que possuíam uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores portadores do par inibidor *KIR2DL2/3\_C1C1*. Interessante observar que a diferença dos pares associados com as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias está relacionado ao epítipo do ligante HLA-I, confirmando a importância do epítipo do ligante HLA-I na qualidade da resposta imune (Augusto *et al.* 2015 e 2012b). O estado de homozigose ou heterozigose do ligante poderá delinear diferentes caminhos na infecção malárica. Em nosso estudo constatamos baixos níveis de IFN- $\gamma$  nos indivíduos portadores dos pares inibidores *KIR2DL1\_C1C2* e *KIR2DL2/3\_C1C2* e que residiam em área endêmica há menos de 25 anos. Sabendo que o IFN- $\gamma$  é o indutor chave dos mecanismos imunes efetores essenciais para o controle inicial da infecção tanto das formas pré-eritrocíticas quanto eritrocíticas (Miller *et al.* 2014), há evidências de que



níveis altos de IFN- $\gamma$  podem contribuir para o desenvolvimento da patologia (Perera MK *et al.*, 2013). Esses achados estão de acordo com o possível fenótipo inibidor apresentado pela célula NK. Embora essas citocinas estejam sendo observadas a níveis plasmáticos durante a fase eritrocítica da malária, sabemos que estas moléculas são frequentemente pleiotrópicas e redundantes (Spangler JB *et al.*, 2015). Além disso, precisamos levar em consideração o impacto sistêmico que a resposta imunológica irá desencadear (Wunderlich F *et al.*, 2014).

A associação entre o par *KIR2DL2/3\_C1C1* se estendeu também às quimiocinas avaliadas em nosso estudo, a MIP-1 $\beta$  e MCP-1. Observamos o aumento de ambas as quimiocinas na presença do par inibidor supracitado. A quimiocina MIP-1 $\beta$  também apresentou associação com outros pares KIR-HLA. Logo, observamos que os pares *KIR2DL1\_C2C2* (inibidor), *KIR2DS1\_C2C2* (ativador; marcador de proteção) e *KIR2DS1\_C1C2* (ativador; marcador de susceptibilidade) estavam presentes nos indivíduos com elevados níveis de MIP-1 $\beta$  infectados com *P. vivax*. Esses achados sugerem que esta quimiocina, por apresentar uma importante função no recrutamento de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ao sítio de infecção e órgão linfóides poderá contribuir tanto para a proteção quanto para a susceptibilidade a infecção.

Em nosso trabalho achamos associações entre algumas citocinas e alguns pares KIR-HLA somente na infecção pelo *P. vivax*. Portanto, além das associações citadas anteriormente com essa espécie plasmodial, foi observado também que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6, estavam em níveis elevados nos indivíduos parasitados com *P. vivax* e que esses indivíduos apresentavam o par ativador *KIR2DS2\_C1C1*, para as duas primeiras citocinas e o par inibidor *KIR2DL1\_C1C2* para a última citocina. É curioso observar o par inibidor *KIR2DL1\_C1C2* associado a elevados níveis de citocina pró-inflamatória, como a citocina IL-6. Além disso, no nosso trabalho observamos que elevados níveis plasmáticos de IL-6 estavam presentes nos indivíduos que possuíam uma maior média ponderada de genes *KIR* ativadores. Esse fato aparentemente contraditório nos faz sugerir que a avaliação da média ponderada dos genes *KIR* ativadores em relação aos níveis de citocinas parece ser mais fidedigna, visto que há trabalhos que sugerem que o repertório genético dos genes *KIR* ativadores irão expressar seus respectivos receptores de modo a atuarem em sinergia (Long *et al.* 2013)

visando, a indução do fenótipo de ativação das células NK e conseqüentemente elevada produção de citocinas pró-inflamatórias. Por isso, estudos que avaliem a expressão qualitativa e quantitativa dos receptores KIR, bem como seus ligantes HLA-I são necessários para esclarecer o papel funcional dessas interações observadas.

Desse modo, acreditamos que os dados obtidos sobre a ancestralidade, a distribuição das frequências gênicas dos receptores *KIR* e de seus ligantes *HLA-I* e os possíveis marcadores de susceptibilidade poderão contribuir para futuros estudos sobre o impacto funcional desses genes, o seu papel na regulação da resposta imune, na relação com a incidência e na evolução clínica não só da malária como de outras doenças, assim com sobre a história demográfica de nossa população de estudo.

## 7. Conclusão

---

A caracterização do perfil dos genes KIR aliada a análise de ancestralidade gerou dados valiosos que nos permitiu inferir a ascendência genética da nossa população de estudo. A diversidade dos genes KIR mostrou uma relação mais próxima da nossa população com a dos mestiços da Venezuela, dos hispânicos americanos e de uma população do sul do Paraná. Enquanto, a análise da ancestralidade revelou uma forte contribuição de ameríndios, confirmando assim o perfil multiétnico da população de Porto Velho. Foi interessante observar que tanto a população nativa (oriunda de área endêmica) quanto a população migrante (oriunda de área não endêmica) apresentou contribuição ancestral predominantemente ameríndia.

A diversidade genotípica de KIR da nossa população (46 perfis genotípicos) é semelhante a encontrada em outras regiões e nações, sendo considerada cosmopolita. Entretanto, há diferenças nas frequências desses genótipos entre as populações. Na nossa população, observamos que os genótipos 1 e 2 apresentam frequências semelhantes entre as Américas (Sul, Central e Norte) corroborando os achados que demonstram a história demográfica humana do continente americano.

Com base nos resultados da avaliação dos perfis da diversidade gênica receptores KIR e seus ligantes HLA-I como possíveis marcadores genéticos na susceptibilidade/proteção à malária podemos inferir que o haplótipo e alguns pares de genes KIR-HLA podem exercer influência ou serem marcadores tanto de susceptibilidade (*KIR3DL2\_A3/A11*, *KIR2DS1\_C1/C2* e *KIR2DS2\_C1/C2*) quanto de proteção (*KIR3DL1\_Bw4*, *KIR2DS1\_C2/C2*, *KIR3DS1\_Bw4* e o haplótipo Bx) à malária na nossa população de estudo.

De acordo com os resultados da avaliação da possível influência dos pares KIR-HLA e a média ponderada de genes KIR ativadores na dinâmica da regulação dos níveis plasmáticos de citocinas pró/anti-inflamatórias e quimiocinas dos pacientes infectados com malária podemos sugerir que esses parâmetros seriam bons marcadores de ativação dessas citocinas e conseqüentemente bons indicadores da qualidade da resposta imune e da evolução da doença na nossa população de estudo.

## 8. Referências

---

1. A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hardy-Weinberg [homepage on the Internet] 2008. Disponível em <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>.
2. Abeles SR, Chuquiyaui R, Tong C, Vinetz JM. Human host-derived cytokines associated with *Plasmodium vivax* transmission from acute malaria patients to *Anopheles darlingi* mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Jun;88(6):1130-7.
3. Abeyweera TP, Merino E, Huse M. Inhibitory signaling blocks activating receptor clustering and induces cytoskeletal retraction in natural killer cells. *J Cell Biol*. 2011 Feb 21;192(4):675-90.
4. Ackerman H, Usen S, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Kwiatkowski DP. A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Annals of human genetics*. 2005 Sep;69(Pt 5):559-65.
5. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*. 2002 Apr 13;359(9314):1311-2.
6. Albiti AH, Nsiah K. Comparative haematological parameters of HbAA and HbAS genotype children infected with *Plasmodium falciparum* malaria in Yemen. *Hematology*. 2014 Apr;19(3):169-74.
7. Alegana VA, Wright JA, Nahzat SM, Butt W, Sediqi AW, Habib N, Snow RW, Atkinson PM, Noor AM. Modelling the incidence of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in Afghanistan 2006-2009. *PLoS One*. 2014 Jul 17;9(7):e102304.
8. Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J*. 1954 Feb 6;1(4857):290-4.
9. Almeida Silva A, Bastos F, Bastos A, Gomes FB. Análise socioeconômica da área de concessão pública da Floresta Nacional do Jamari. Porto Velho: Centro de Estudos da Cultura e do Meio Ambiente da Amazônia - RIOTERRA, 2009. 214pp. Disponível em [http://www.rioterra.org.br/wp-content/uploads/2011/07/analise\\_socioeconomica\\_do\\_entorno\\_da\\_area\\_de\\_concessao\\_publica\\_parte\\_ii.pdf](http://www.rioterra.org.br/wp-content/uploads/2011/07/analise_socioeconomica_do_entorno_da_area_de_concessao_publica_parte_ii.pdf)
10. Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, Ménard R. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1705-12.
11. Amoako N, Asante KP, Adjei G, Awandare GA, Bimi L, Owusu-Agyei S. Associations between red cell polymorphisms and *Plasmodium falciparum* infection in the middle belt of Ghana. *PLoS One*. 2014 Dec 3;9(12):e112868.
12. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, Riley EM. Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):5396-405
13. Ascunce MS, Fane J, Kassu G, Toloza AC, Picollo MI, González-Oliver A, Reed DL. Mitochondrial diversity in human head louse populations across the Americas. *Am J Phys Anthropol*. 2013 Sep;152(1):118-29.

14. Augusto DG, Hollenbach JA, Petzl-Erler ML. A deep look at KIR-HLA in Amerindians: comprehensive meta-analysis reveals limited diversity of KIR haplotypes. *Hum Immunol*. 2015 Apr;76(4):272-80.
15. Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, Pereira NF, Petzl-Erler ML. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. *PLoS One*. 2012;7(7):e39991. (a)
16. Augusto DG, Petzl-Erler ML. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. *Hum Genet*. 2015 Jun 23.
17. Augusto DG, Piovezan BZ, Tsuneto LT, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML. KIR gene content in amerindians indicates influence of demographic factors. *PLoS One*. 2013;8(2):e56755. doi: 10.1371/journal.pone.0056755. Epub 2013 Feb 25. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(5):e98427.
18. Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati MR, Martin MP, Carrington M, Petzl-Erler ML. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics*. 2012 Feb;64(2):143-52. doi: 10.1007/s00251-011-0565-1. Epub 2011 Aug 18. (b)
19. Ayo CM, Reis PG, Dalalio MM, Visentainer JE, Oliveira Cde F, de Araújo SM, de Oliveira Marques DS, Sell AM. Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Their HLA Ligands are Related with the Immunopathology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 May 15;9(5):e0003753.
20. Baer K, Roosevelt M, Clarkson AB, Jr., van Rooijen N, Schnieder T, Frevert U. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cellular microbiology*. 2007 Feb;9(2):397-412.
21. Baratin M, Roetyncck S, Lépolard C, Falk C, Sawadogo S, Uematsu S, Akira S, Ryffel B, Tiraby JG, Alexopoulou L, Kirschning CJ, Gysin J, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14747-52. Epub 2005 Oct 3.
22. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos Mda S, Nicolete VC, Fontoura PS, Gonçalves RM, Viana SA, Menezes MJ, Scopel KK, Cavasini CE, Malafronte R dos S, da Silva-Nunes M, Vinetz JM, Castro MC, Ferreira MU. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Aug 28;8(8):e3109.
23. Battle KE, Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Sinka ME, Howes RE, Guerra CA, Price RN, Baird KJ, Hay SI. The global public health significance of *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2012;80:1-111.
24. Bejon P, Mwacharo J, Kai O, Todryk S, Keating S, Lowe B, et al. The induction and persistence of T cell IFN-gamma responses after vaccination or natural exposure is suppressed by *Plasmodium falciparum*. *Journal of immunology*. 2007 Sep 15;179(6):4193-201.
25. Beltrame LM, Sell AM, Moliterno RA, Clementino SL, Cardozo DM, Dalalio MM, Fonzar UJ, Visentainer JE. Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. *Tissue Antigens*. 2013 Dec;82(6):397-404.
26. Bongfen SE, Ntsama PM, Offner S, Smith T, Felger I, Tanner M, Alonso P, Nebie I, Romero JF, Silvie O, Torgler R, Corradin G. The N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein represents a target of protective immunity. *Vaccine*. 2009 Jan 7;27(2):328-35.
27. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on

their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1633-41.

**28.** Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 1995 Aug 1;182(2):409-18. Erratum in: *J Exp Med.* 2015 Jan 12;212(1):123.

**29.** Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:1-8.

**30.** Brooks AG, Boyington JC, Sun PD. Natural killer cell recognition of HLA class I molecules. *Rev Immunogenet.* 2000;2(3):433-48. Review.

**31.** Bruce-Chwatt L J. History of malaria from prehistory to eradication. 1988

**32.** Camargo EP. Malária, maleita, paludismo. *Cienc. Cult., São Paulo, v. 55, n. 1, Jan. 2003.* Available from [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000967252003000100021&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252003000100021&lng=en&nrm=iso). access on 29 May 2015.3.

**33.** Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One.* 2013 Apr 24;8(4):e62005.

**34.** Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol.* 2005 Oct 15;175(8):5222-9.

**35.** Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/> 2003. Acesso em junho 2015.

**36.** Carvalho LH, Sano G, Hafalla JC, Morrot A, Curotto de Lafaille MA, Zavala F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):166-70.

**37.** Carvalho TA, Queiroz MG, Cardoso GL, Diniz IG, Silva AN, Pinto AY, Guerreiro JF. *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malar J.* 2012 Dec 22;11:430. doi: 10.1186/1475-2875-11-430.

**38.** Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J.* 2007 Dec 19;6:167.

**39.** Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med.* 1994 Oct 1;180(4):1235-42.

**40.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Link: [http://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/impact.html](http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html)

**41.** Chagas, C. "Notas sobre a epidemiologia do Amazonas". *Brasil Médico*;42. 1913.

**42.** Chandran V, Bull SB, Pellett FJ, Ayearst R, Pollock RA, Gladman DD. Killer-cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2014 Feb;53(2):233-9.

**43.** Chen Q, Amaladoss A, Ye W, Liu M, Dummler S, Kong F, Wong LH, Loo HL, Loh E, Tan SQ, Tan TC, Chang KT, Dao M, Suresh S, Preiser PR, Chen J. Human naturalkiller cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 28;111(4):1479-84.

44. Chizzolini C, Trottein F, Bernard FX, Kaufmann MH. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991 Jul;45(1):57-64.
45. Cockburn IA, Chen YC, Overstreet MG, Lees JR, van Rooijen N, Farber DL, Zavala F. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. *PLoS Pathog*. 2010 May 6;6(5):e1000877.
46. Cockburn IA, Mackinnon MJ, O'Donnell A, Allen SJ, Moulds JM, Baisor M, Bockarie M, Reeder JC, Rowe JA. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):272-7.
47. Cockburn IA, Rowe JA. Erythrocyte complement receptor 1 (CR1) expression level is not associated with polymorphisms in the promoter or 3' untranslated regions of the CR1 gene. *International journal of immunogenetics*. 2006 Feb;33(1):17-20..
48. Cohen S, Mc GI, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961 Nov 25;192:733-7.
49. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
50. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:147-63. Review.
51. Cruz Marques A. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol Today*. 1987 Jun;3(6):166-70.
52. Cruz OG, Madeira-Mamoré Railway Company. Considerações gerais sobre as condições sanitárias do rio Madeira. Rio de Janeiro: Papelaria Americana. 1910.
53. Dalko E, Das B, Herbert F, Fesel C, Pathak S, Tripathy R, Cazenave PA, Ravindran B, Sharma S, Pied S. Multifaceted roles of heme during severe *Plasmodium falciparum* infections in India. *Infect Immun*. 2015 Jul 13.
54. Dalrymple U, Mappin B, Gething PW. Malaria mapping: understanding the global endemicity of *falciparum* and *vivax* malaria. *BMC Med*. 2015 Jun 12;13:140.
55. DATASUS - Departamento de Informática do SUS / Ministério da Saúde. Link: [http://fichas.ripsa.org.br/2012/d-4/?l=pt\\_BR](http://fichas.ripsa.org.br/2012/d-4/?l=pt_BR). Acesso em: fevereiro de 2015.
56. David G, Djaoud Z, Willem C, Legrand N, Rettman P, Gagne K, Cesbron A, Retière C. Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4778-88.
57. Davis CT, Rizzieri D. Immunotherapeutic applications of NK cells. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 May 25;8(2):250-6. doi: 10.3390/ph8020250. Review.
58. de Farias JD, Santos MG, de França AK, Delani D, Tada MS, Casseb AA, Simões AL, Engracia V. Distribution of the CCR5delta32 allele (gene variant CCR5) in Rondônia, Western Amazonian region, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2012 Jan;35(1):27-31. Epub 2012 Jan 6.
59. de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):618-33.
60. De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, Repetto O, Zignego AL, Izzo F, Tornesello ML, Buonaguro FM, Mangia A, Sansonno D, Racanelli V, De Vita S, Pioltelli P, Vaccher E, Beretta M, Mazzaro C, Libra M, Gini A, Zucchetto A, Cannizzaro R, De Paoli P. Genetic

diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus-related diseases. PLoS One. 2015 Feb 20;10(2):e0117420.doi:10.1371/journal.pone.0117420. eCollection 2015.

61. Dhorda M, Nyehangane D, Renia L, Piola P, Guerin PJ, Snounou G. Transmission of *Plasmodium vivax* in south-western Uganda: report of three cases in pregnant women. PLoS One. 2011;6(5):e19801.

62. Döhning C, Samaridis J, Colonna M. Alternatively spliced forms of human killerinhibitory receptors. Immunogenetics. 1996;44(3):227-30.

63. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. Clinical microbiology reviews. 2009 Jan;22(1):13-36, Table of Contents.

64. Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. Infect Immun. 1987 Apr;55(4):888-91.

65. Druilhe P, Perignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. Immunol Lett. 1994 Jul;41(2-3):115-20.

66. Dunphy SE, Guinan KJ, Chorcora CN, Jayaraman J, Traherne JA, Trowsdale J, Pende D, Middleton D, Gardiner CM. 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. Genes Immun. 2015 May 7.

67. Dups JN, Pepper M, Cockburn IA. Antibody and B cell responses to *Plasmodium* sporozoites. Front Microbiol. 2014 Nov 18;5:625. Review.

68. Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. Curr Opin Microbiol. 2009 Aug;12(4):401-7.

69. Erunkulu OA, Hill AV, Kwiatkowski DP, Todd JE, Iqbal J, Berzins K, Riley EM, Greenwood BM. Severe malaria in Gambian children is not due to lack of previous exposure to malaria. Clin Exp Immunol. 1992 Aug;89(2):296-300.

70. Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? Tissue Antigens. 2013 Dec;82(6):363-73. doi:10.1111/tan.12262. Review.

71. Fay MP, Feuer EJ. Confidence intervals for directly standardized rates: a method based on the gamma distribution. Stat Med. 1997 Apr 15;16(7):791-801.

72. Fearnside PM. Deforestation in Brazilian Amazonia: history, rates, and consequences. Conserv Biol 2005; 19: 680–8.

73. Ferreira RG, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LM, Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H. Ethnic admixture composition of two western Amazonian populations. Hum Biol. 2002 Aug;74(4):607-14.

74. Forattini, O. P. Culicidologia médica. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. v.2. 860p, 2002.

75. França, TCC; Santos, MG; Figueiroa-Villar, J. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. Quím. Nova [online]. 2008, vol.31, n.5, pp. 1271-1278.

76. Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. *Plasmodium* sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. Sub-cellular biochemistry. 2008;47:182-97.

77. Fridman C, Gonzalez RS, Pereira AC, Cardena MM. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. Int J Legal Med. 2014 Jul;128(4):589-93.

78. Friedman MJ. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. Proceedings of the NationalAcademy of Sciences of the United States of America. 1978 Apr;75(4):1994-7.



- 79.** Frome EL, Checkoway H. Epidemiologic programs for computers and calculators. Use of Poisson regression models in estimating incidence rates and ratios. *Am J Epidemiol.* 1985 Feb;121(2):309-23.
- 80.** Gardiner CM. Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int J Immunogenet.* 2008 Feb;35(1):1-8. Epub 2007 Dec 18. Review.
- 81.** Garraud O, Perraut R, Blanchard D, Chouteau P, Bourreau E, Le Scanf C, et al. Squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) B lymphocytes: secretion of IgG directed to *Plasmodium falciparum* antigens, by primed blood B lymphocytes restimulated in vitro with parasitized red blood cells. *Res Immunol.* 1993 Jul-Sep;144(6-7):407-18.
- 82.** Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Graef T, Moesta AK, Layrisse Z, Parham P. Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 3;106(44):18692-7.
- 83.** Gerszten E, Allison MJ, Maguire B. Paleopathology in South American mummies: a review and new findings. *Pathobiology.* 2012;79(5):247-56.
- 84.** Giebel S, Boratyn-Nowicka A, Karabon L, Jedynak A, Pamula-Pilat J, Tecza K, Kula D, Kowal M, Frydecka I, Grzybowska E. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with epithelial ovarian cancer. *Hum Immunol.* 2014 Jun;75(6):508-13.
- 85.** Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011;39: D913-9.
- 86.** Greenwood B, Marsh K, Snow R. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today.* 1991 Oct;7(10):277-81.
- 87.** Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 26;107(43):18640-5. Epub 2010 Oct 4.
- 88.** Guiyedi V, Bécavin C, Herbert F, Gray J, Cazenave PA, Kombila M, Crisanti A, Fesel C, Pied S. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children is associated with increased auto-antibody production, high IL-10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. *Malar J.* 2015 Apr 16;14:162.
- 89.** Guttery DS, Poulin B, Ramaprasad A, Wall RJ, Ferguson DJ, Brady D, Patzewitz EM, Whipple S, Straschil U, Wright MH, Mohamed AM, Radhakrishnan A, Arold ST, Tate EW, Holder AA, Wickstead B, Pain A, Tewari R. Genome-wide functional analysis of *Plasmodium* protein phosphatases reveals key regulators of parasite development and differentiation. *Cell Host Microbe.* 2014 Jul 9;16(1):128-40.
- 90.** Habegger de Sorrentino A, Pardo R, Marinic K, Duarte SC, Lotero C. KIR-HLA class I and pulmonary tuberculosis in the Amerindian population in Chaco, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014 Nov;32(9):565-9.
- 91.** Haldane JBS (1949). The rate of mutation of human genes. In: *Proceedings of the Eighth International Congress of Genetics, Hereditas, 35, 267–273*
- 92.** Hansen DS, D'Ombrain MC, Schofield L. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol.* 2007 Aug;19(4):416-23.
- 93.** Hatano H, Shaw J, Marquardt K, Zhang Z, Gauthier L, Chanteux S, Rossi B, Li D, Mitchell J, Kollnberger S. The D0 Ig-like domain plays a central role in the stronger binding of KIR3DL2 to B27 free H chain dimers. *J Immunol.* 2015 Feb 15;194(4):1591-601.

- 94.** Hay SI, Cox J, Rogers DJ, Randolph SE, Stern DI, Shanks GD, Myers MFdoi, Snow RW. Climate change and the resurgence of malaria in the East African highlands. *Nature*. 2002 Feb 21;415(6874):905-9. (a)
- 95.** Hay SI, Rogers DJ, Randolph SE, Stern DI, Cox J, Shanks GD, Snow RW. Hot topic or hot air? Climate change and malaria resurgence in East African highlands. *Trends Parasitol*. 2002 Dec;18(12):530-4. (b)
- 96.** Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, van Deuren M, van der Meer JW, van Mierlo GJ, Eling WM, Hack CE, Sauerwein RW. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jun;132(3):467-72.
- 97.** Hernández-Ramírez D, Esparza-Pérez MA, Ramirez-Garcialuna JL, Arguello JR, Mandeville PB, Noyola DE, García-Sepúlveda CA. Association of KIR3DL1/S1 and HLA-Bw4 with CD4 T cell counts in HIV-infected Mexican mestizos. *Immunogenetics*. 2015 Jun 3.
- 98.** Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Hananantachai H, Naka I, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Parham P, Arase H, Tokunaga K, Patarapotikul J, Yabe T. Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002565.
- 99.** Horras CJ, Lamb CL, Mitchell KA. 2011. Regulation of hepatocyte fate by interferon-gamma. *Cytokine Growth Factor Rev* 22:35–43.
- 100.** Hou Y, Zhang C, Xu D, Sun H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leucocyte antigen-Cw gene combinations with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2015 May;180(2):250-4.
- 101.** Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, Himeno K. Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur J Immunol*. 2010 Apr;40(4):1053-61.
- 102.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Disponível no link: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ro&tema=estimativa2014>
- 103.** International HapMap Project, 2011. Disponível em: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 06 de abril de 2015.
- 104.** Jahja NE, Huwae IR, B Nara M, Harley A, Widaningrum T, Fitri LE. Comparison of nested polymerase chain reaction and microscopy as diagnostic tools in congenital malaria: a study at tjark corneille hillers hospital maumere, indonesia. *Malays J Med Sci*. 2014 Sep-Oct;21(5):17-23.
- 105.** Jarduli LR, Alves HV, de Souza-Santana FC, Marcos EV, Pereira AC, Dias-Baptista IM, Fava VM, Mira MT, Moraes MO, Virmond Mda C, Visentainer JE. Influence of KIR genes and their HLA ligands in the pathogenesis of leprosy in a hyperendemic population of Rondonópolis, Southern Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014 Aug 12;14:438. doi: 10.1186/1471-2334-14-438
- 106.** Jobim M, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Fraportti J, Baronio D, Gil B, Penna LS, Roesler R, Jobim LF, Schwartzmann G. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil. *Int J Immunogenet*. 2010 Apr;37(2):83-9.
- 107.** Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, de Almeida e Silva A, Costa JD, Araújo Mda S, Escobar AL, da Silva LH. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One*. 2010 Feb 16;5(2):e9245.

- 108.** Kibar F, Goruroglu Ozturk O, Ulu A, Erken E, Inal S, Dinkci S, Kurtaran B, Tasova Y, Aksu HS, Yaman A. Role of KIR genes and genotypes in susceptibility to or protection against hepatitis B virus infection in a Turkish cohort. *Med Sci Monit.* 2014 Jan 10;20:28-34.
- 109.** Killeen GF. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malar J.* 2014 Aug 23;13:330.
- 110.** Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song YJ, French AR, Vlahiotis A, Piccirillo JF, Cella M, Colonna M, Mohanakumar T, Hsu KC, Dupont B, Yokoyama WM. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):3053-8. Epub 2008 Feb 19.
- 111.** Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM. Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2005 Dec 1;175(11):7466-73.
- 112.** Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW, De La Vega FM, Seldin MF. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat.* 2009 Jan;30(1):69-78.
- 113.** Kuśnierczyk P, Mozer-Lisewska I, Zwolińska K, Kowala-Piaskowska AE, Bura M, Bereszyńska I, Pauli A, Żeromski J. Contribution of genes for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) to the susceptibility to chronic hepatitis C virus infection and to viremia. *Hum Immunol.* 2015 Mar;76(2-3):102-8.
- 114.** Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rungsihirunrat K, Pongjantharasatien K, Na-Bangchang K. Coexistence of Malaria and Thalassemia in Malaria Endemic Areas of Thailand. *Korean J Parasitol.* 2015 Jun;53(3):265-70.
- 115.** Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* 2008 Dec;20(6):343-52. doi: 10.1016/j.smim.2008.06.003. Epub 2008 Jul 16. Review.
- 116.** Lan Y, Wei CD, Chen WC, Wang JL, Wang CF, Pan GG, Wei YS, Nong LG. Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the complement receptor 1 gene with malaria. *Yonsei Med J.* 2015 Mar;56(2):332-9.
- 117.** Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):725-32.
- 118.** Le Page ME, Goodridge JP, John E, Christiansen FT, Witt CS. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- $\gamma$  responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol.* 2014 Jan 15;192(2):732-40.
- 119.** Lelliott PM, McMorran BJ, Foote SJ, Burgio G. The influence of host genetics on erythrocytes and malaria infection: is there therapeutic potential? *Malar J.* 2015 Jul 29;14:289. doi: 10.1186/s12936-015-0809-x.
- 120.** Li C, Jia J, Wei Y, Wan L, Hu L, Ye J. The selection of 30 ancestry informative markers and its application in ancestry inference. *Yi Chuan.* 2014 Aug;36(8):779-85.
- 121.** Liehl P, Meireles P, Albuquerque IS, Pinkevych M, Baptista F, Mota MM, Davenport MP, Prudêncio M. Innate immunity induced by *Plasmodium* liver infection inhibits malaria reinfections. *Infect Immun.* 2015 Mar;83(3):1172-80.
- 122.** Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol.* 2010 Mar-Apr;22(2):187-92.

- 123.** Liu J, Xiao Z, Ko HL, Shen M, Ren EC. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A\*11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 18;111(7):2662-7. doi: 10.1073/pnas.1322052111. Epub 2014 Feb 3.
- 124.** Ljunggren HG, Karre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990; 11:237-44.
- 125.** Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:227-58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005. Review.
- 126.** Lopera-Mesa TM, Doumbia S, Konaté D, Anderson JM, Doumbouya M, Keita AS, Diakité SA, Traoré K, Krause MA, Diouf A, Moretz SE, STullo G, Miura K, Gu W, Fay MP, Taylor SM, Long CA, Diakité M, Fairhurst RM. Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2015 Apr 1;2(4):e140-e149.
- 127.** Lopez C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene*. 2010 Nov 1;467(1-2):1-12.
- 128.** Lourembam SD, Sawian CE, Baruah S. Differential association of KIR gene loci to risk of malaria in ethnic groups of Assam, Northeast India. *Infect Genet Evol*. 2011 Dec;11(8):1921-8.
- 129.** Lunel F, Druilhe P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun*. 1989 Jul;57(7):2043-9.
- 130.** Łuszczek W, Mańczak M, Cisło M, Nockowski P, Wiśniewski A, Jasek M, Kuśnierczyk P. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol*. 2004 Jul;65(7):758-66
- 131.** Lyke KE, Fernández-Viña MA, Cao K, Hollenbach J, Coulibaly D, Kone AK, Guindo A, Burdett LA, Hartzman RJ, Wahl AR, Hildebrand WH, Doumbo OK, Plowe CV, Sztein MB. Association of HLA alleles with *Plasmodium falciparum* severity in Malian children. *Tissue Antigens*. 2011 Mar 30.
- 132.** Lysakova-Devine T, O'Farrelly C. Tissue-specific NK cell populations and their origin. *J Leukoc Biol*. 2014 Dec;96(6):981-90.
- 133.** Machado P, Mendes C, Rosário VE, Arez AP. The contribution of human erythrocyte polymorphisms in the protection against malaria. *Rev Pan-Amaz Saude [serial on the Internet]*. 2010 Dec [cited 2015 June 04];1(4):85-96.
- 134.** Manser AR, Weinhold S, Uhrberg M. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev*. 2015 Sep;267(1):178-96.
- 135.** Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, de Vargas Wolfgramm E, da Mota Pontes I, Ivan Aguiar J, Ozório Moraes M, Fagundes de Carvalho E, Gusmão L. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e75145.
- 136.** Marangon AV, Visentainer JE, Guelsin GA, Clementino SL, Rudnick CC, de Melo FC, Braga MA, Sell AM. Investigation of deletion of 22pb in KIR2DS4 gene in a population of southern Brazil. *J Clin Lab Anal*. 2014 Nov;28(6):440-5.
- 137.** Marangoni A, Caramelli D, Manzi G. Homo sapiens in the Americas. Overview of the earliest human expansion in the New World. *J Anthropol Sci*. 2014;92:79-97. doi: 10.4436/jass.91002. Epub 2013 Apr 8. Review.
- 138.** Markus MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol*. 2015 Jun;31(6):239-45. doi: 10.1016/j.pt.2015.02.003. Epub 2015 Mar 26. Review.

- 139.** Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol.* 2003 Jun;64(6):648-54.
- 140.** Mason LH, Willette-Brown J, Mason AT, McVicar D, Ortaldo JR. Interaction of Ly-49D+ NK cells with H-2Dd target cells leads to Dap-12 phosphorylation and IFN-gamma secretion. *J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):603-11.
- 141.** Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens.* 2002 Sep;60(3):254-8.
- 142.** McCall MB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, Dolo A, Doumbo OK, Luty A, van der Ven AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW. Memory-like IFN- $\gamma$  response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *Eur J Immunol.* 2010 Dec;40(12):3472-7.
- 143.** McCall MB, Sauerwein RW. Interferon- $\gamma$ -central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol.* 2010 Dec;88(6):1131-43. Review.
- 144.** McGregor IA. The Passive Transfer of Human Malarial Immunity. *Am J Trop Med Hyg.* 1964 Jan;13:SUPPL 237-9.
- 145.** 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 Oct;11(10):701-12. Review.
- 146.** Michon P, Woolley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS letters.* 2001 Apr 20;495(1-2):111-4. PubMed PMID: 11322957.
- 147.** Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM. Studies on the expression of the deleted KIR2DS4\*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations. *Hum Immunol* 2007; 68: 128–34.
- 148.** Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net). *Tissue Antigens* 2003;61: 403-7.
- 149.** Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes. *Transpl Immunol* 2005; 14: 135–42.
- 150.** Millar SB, Cox-Singh J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*-zoonotic malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Jul;21(7):640-648. doi: 10.1016/j.cmi.2015.03.017. Epub 2015 Apr 2. Review.
- 151.** Miller JL, Sack BK, Baldwin M, Vaughan AM, Kappe SH. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Rep.* 2014 Apr 24;7(2):436-47.
- 152.** Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):673-9.
- 153.** Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):3969-79.
- 154.** Moffett A, Colucci F. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunol Rev.* 2015 Sep;267(1):283-97.
- 155.** Moradi S, Berry R, Pymm P, Hitchen C, Beckham SA, Wilce MC, Walpole NG, Clements CS, Reid HH, Perugini MA, Brooks AG, Rossjohn J, Vivian JP. The structure of

the atypical killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR2DL4. *J Biol Chem*. 2015 Apr 17;290(16):10460-71

**156.** Müller M, Schlagenhauf P. *Plasmodium knowlesi* in travellers, update 2014. *Int J Infect Dis*. 2014 May;22:55-64.

**157.** Mulrooney TJ, Zhang AC, Goldgur Y, Boudreau JE, Hsu KC. KIR3DS1-Specific D0 Domain Polymorphisms Disrupt KIR3DL1 Surface Expression and HLA Binding. *J Immunol*. 2015 Aug 1;195(3):1242-50. doi: 10.4049/jimmunol.1500243. Epub 2015 Jun 24.

**158.** Murphy, K. *Imunobiologia de Janeway*. 8<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

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

**160.** Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*. 2009 Sep;31(3):333-43. Review.

**161.** Nievergelt CM, Maihofer AX, Shekhtman T, Libiger O, Wang X, Kidd KK, Kidd JR. Inference of human continental origin and admixture proportions using a highly discriminative ancestry informative 41-SNP panel. *Investig Genet*. 2013 Jul 1;4(1):13.

**162.** Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, Guethlein LA, Hilton HG, Pando MJ, Koram KA, Riley EM, Abi-Rached L, Parham P. Co-evolution of human leukocyte antigen (HLA) class I ligands with killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in a genetically diverse population of sub-Saharan Africans. *PLoS Genet*. 2013 Oct;9(10):e1003938.

**163.** Offeddu V, Thathy V, Marsh K, Matuschewski K. Naturally acquired immune responses against *Plasmodium falciparum* sporozoites and liver infection. *International journal for parasitology*. 2012 May 15;42(6):535-48. PubMed PMID: 22561398.

**164.** Olaniyan SA, Amodu OK, Yindom LM, Conway DJ, Aka P, Bakare AA, Omotade OO. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and *falciparum* malaria in southwest Nigeria. *Hum Immunol*. 2014 Aug;75(8):816-21. doi: 10.1016/j.humimm.2014.06.002. Epub 2014 Jun 11.

**165.** Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010 Apr 30;9:115.

**166.** Omosun YO, Blackstock AJ, Gatei W, Hightower A, van Eijk AM, Ayisi J, Otieno J, Lal RB, Steketee R, Nahlen B, ter Kuile FO, Slutsker L, Shi YP. Differential association of gene content polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors with placental malaria in HIV- and HIV+ mothers. *PLoS One*. 2012;7(6):e38617.

**167.** Opi DH, Ochola LB, Tendwa M, Siddondo BR, Ocholla H, Fanjo H, Ghumra A, Ferguson DJ, Rowe JA, Williams TN. Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and  $\alpha$ (+)thalassemia. *EBioMedicine*. 2014 Nov 1;1(1):29-36.

**168.** Overstreet MG, Chen YC, Cockburn IA, Tse SW, Zavala F. CD4+ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8+ T cells induced by malaria sporozoites. *PLoS One*. 2011;6(1):e15948.

**169.** Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, Santoni A. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Apr;26(2):113-20.

**170.** Parham P. Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:47-50. Review.

**171.** Parmakelis A, Russello MA, Caccone A, Marcondes CB, Costa J, Forattini OP, Sallum MA, Wilkerson RC, Powell JR. Historical analysis of a near disaster: *Anopheles gambiae* in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Jan;78(1):176-8.

- 172.** Pattaradilokrat S, Li J, Wu J, Qi Y, Eastman RT, Zilversmit M, Nair SC, Huaman MC, Quinones M, Jiang H, Li N, Zhu J, Zhao K, Kaneko O, Long CA, Su XZ. Plasmodium genetic loci linked to host cytokine and chemokine responses. *Genes Immun.* 2014 Apr-May;15(3):145-52.
- 173.** Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, Oliveira LF, Henderson BL, Castro AP, Maia MH, Barbosa FB, Santos SE, Guerreiro JF, Sena L, Santos EJ. Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus.* 2011 Mar;20(3):265-73.
- 174.** Perce-da-Silva DS, Silva LA, Lima-Junior JC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro-Alves M, Santos F, Porto LC, Oliveira-Ferreira J, Banic DM. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene diversity in a population naturally exposed to malaria in Porto Velho, Northern Brazil. *Tissue Antigens.* 2015Mar;85(3):190-9.
- 175.** Perera MK, Herath NP, Pathirana SL, Phone-Kyaw M, Alles HK, Mendis KN, Premawansa S, Handunnetti SM. Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha/IL-10 ratios with TNF2 allele in severe *P. falciparum* malaria patients in Sri Lanka. *Pathog Glob Health.* 2013 Jan;107(1):21-9.
- 176.** Pittari G, Liu XR, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, Chewing JH, Hsu KC, Dupont B. NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand. *J Immunol.* 2013 May 1;190(9):4650-60.
- 177.** Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, Anderson K, Mahakunkijcharoen Y, Martin LB, Wilson D, Elliott S, Elliott S, Eisen DP, Weinberg JB, Saul A, Good MF. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet.* 2002 Aug 24;360(9333):610-7.
- 178.** Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000 Jun;155(2):945-59.
- 179.** Protocolo da família de kits LabType. Disponível em [http://www.biometrix.com.br/site\\_diagnostica/arquivos/e0d8d3fb539758f33ce44f9f2e34b2b3\\_arquivo.05](http://www.biometrix.com.br/site_diagnostica/arquivos/e0d8d3fb539758f33ce44f9f2e34b2b3_arquivo.05)
- 180.** R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. ISBN: 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org/>.
- 181.** Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, Long EO. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol.* 2006 Jan;4(1):e9.
- 182.** Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol.* 2011 Dec;46(4):216-28. doi: 10.5045/kjh.2011.46.4.216. Epub 2011 Dec 27.
- 183.** Rathore D, Nagarkatti R, Jani D, Chattopadhyay R, de la Vega P, Kumar S, McCutchan TF. An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20524-9. Epub 2005 Mar 21.
- 184.** Reader J, Botha M, Theron A, Lauterbach SB, Rossouw C, Engelbrecht D, Wepener M, Smit A, Leroy D, Mancama D, Coetzer TL, Birkholtz LM. Nowhere to hide: interrogating different metabolic parameters of *Plasmodium falciparum* gametocytes in a

transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malar J.* 2015 May 22;14:213.

- 185.** Rey, L. *Parasitologia*, 4<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2013.893p
- 186.** Richer J, Chudley AE. The hemoglobinopathies and malaria. *Clinical genetics*. 2005 Oct;68(4):332-6. PubMed PMID: 16143020
- 187.** Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nature medicine*. 2013 Feb;19(2):168-78. PubMed PMID: 23389617.
- 188.** Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* 2006 Jan-Feb;28(1-2):35-49. Review.
- 189.** Rios-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Izzo T, dos Santos EV, Pessoa FA, Lima JB, Monteiro WM, Secundino NF, Lacerda MV, Tadei WP, Pimenta PF. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2013 Dec 21;12:460.
- 190.** Rivero S, Covas L. The processing and marketing of seeds from the Amazon City of Porto Velho, RO. *J Technol Manag Innov* 2013: 2013: 321-31.
- 191.** Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D1234-40.doi: 10.1093/nar/gks1140. Epub 2012 Nov 24. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> - Acessado em junho de 2015.
- 192.** Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior Jda C, e Fonseca Bde P, Antas PR, Baldez A, Storer FL, Santos F, Banic DM, de Oliveira-Ferreira J. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Apr;109(2):154-62. Epub 2014 Mar 4.
- 193.** Roetynck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cells and malaria. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:251-63.
- 194.** Rudnick CC, Franceschi DS, Marangon AV, Guelsin GA, Sell AM, Visentainer JE. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol.* 2008 Dec;69(12):872-6.
- 195.** Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep;45(3):297-308.
- 196.** Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):184-90.
- 197.** Saraiva Md, Amorim RD, Moura MA, Martinez-Espinosa FE, Barbosa Md. Urban expansion and spatial distribution of malaria in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 Sep-Oct;42(5):515-22.
- 198.** Sarangi A, Mohapatra PC, Dalai RK, Sarangi AK. Serum IL-4, IL-12 and TNF-alpha in malaria: a comparative study associating cytokine responses with severity of disease from the Coastal Districts of Odisha. *J Parasit Dis.* 2014 Jun;38(2):143-7.
- 199.** Schmidt NW, Podyminogin RL, Butler NS, Badovinac VP, Tucker BJ, Bahjat KS, Lauer P, Reyes-Sandoval A, Hutchings CL, Moore AC, Gilbert SC, Hill AV, Bartholomay LC, Harty JT. Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Sep 16;105(37):14017-22.



- 200.** Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96:41–101.
- 201.** Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep;5(9):722-35.
- 202.** Schweickardt JC, Lima NT. Brazilian scientists visit the Amazon: The scientific journeys of Oswaldo Cruz and Carlos Chagas (1910-13). *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2007 Dec;14 Suppl:15-50.
- 203.** Sehgal VM, SiddjiquiWA, Alpers MP. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83 Suppl:105-6.
- 204.** Servonnet A, Rapp C, Delacour H, Bigaillon C, Pilo JE, Mérens A. [Plasmodium knowlesi: an emerging species in humans?]. *Med Sante Trop*. 2012 Oct-Dec;22(4):417-21.
- 205.** Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>. Acesso em: fevereiro de 2015.
- 206.** Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1114-9. Epub 2007 Aug 12.
- 207.** Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012 Apr 4;5:69.
- 208.** Sivep-Malária. Resumo epidemiológico nacional mensal. Disponível em <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datusus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer> (acessado em 25 de junho de 2015)
- 209.** Smith MW, Patterson N, Lautenberger JA, Truelove AL, McDonald GJ, Waliszewska A, Kessing BD, Malasky MJ, Scafe C, Le E, De Jager PL, Mignault AA, Yi Z, De The G, Essex M, Sankale JL, Moore JH, Poku K, Phair JP, Goedert JJ, Vlahov D, Williams SM, Tishkoff SA, Winkler CA, De La Vega FM, Woodage T, Sninsky JJ, Hafler DA, Altshuler D, Gilbert DA, O'Brien SJ, Reich D. A high-density admixture map for disease gene discovery in african americans. *Am J Hum Genet*. 2004 May;74(5):1001-13. Epub 2004 Apr 14.
- 210.** Smith TG, Ayi K, Serghides L, McAllister CD, Kain KC. Innate immunity to malaria caused by Plasmodium falciparum. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2002 Dec;25(6):262-72.
- 211.** Snow RW. Global malaria eradication and the importance of Plasmodium falciparum epidemiology in Africa. *BMC Med*. 2015 Feb 3;13:23.
- 212.** Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Oct;61(2):315-20.
- 213.** Soe S, Singh S, Camus D, Horii T, Druilhe P. Plasmodium falciparum serine repeat protein, a new target of monocyte-dependent antibody-mediated parasite killing. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):7182-4.
- 214.** Soe S, Theisen M, Roussillon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of

hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):247-52.

**215.** Spangler JB, Moraga I, Mendoza JL, Garcia KC. Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:139-67.

**216.** Stanistic DI, Barry AE, Good MF. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. *Trends in parasitology*. 2013 Dec;29(12):612-22. PubMed PMID: 24176554.

**217.** Sturm A, Heussler V. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol*. 2007 Sep;196(3):127-33.

**218.** Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, Muto M. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2004 May;122(5):1133-6. 82.

**219.** Taniguchi M, Kawabata M. KIR3DL1/S1 genotypes and KIR2DS4 allelic variants in the AB KIR genotypes are associated with *Plasmodium*-positive individuals in malaria infection. *Immunogenetics*. 2009 Dec;61(11-12):717-30.

**220.** Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, Herrera S, Kim JY, Menard D, Póvoa MM, Villegas L, Mulyanto, Snounou G, Cui L, Zeyrek FY, Escalante AA. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2013 Sep;30(9):2050-64.

**221.** Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012 Jun;12(6):457-68. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70055-5. Epub 2012 Mar 23. Review.

**222.** The 1000 genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467:1061-73, Oct. 2010. Disponível em: <http://www.1000genomes.org/sites/1000genomes.org/files/docs/nature09534.pdf>. Acesso em: 06 de abril de 2015.

**223.** Tomaz FM, da Cruz Furini AA, Capobianco MP, Póvoa MM, Trindade PC, Fraga VD, Conceição LM, de Azevedo LR, Oliani SM, Cassiano GC, Cavasini CE, Dos Santos SE, Machado RL. Humoral immune responses against the malaria vaccine candidate antigen *Plasmodium vivax* AMA-1 and IL-4 gene polymorphisms in individuals living in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):273-8.

**224.** Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*. 2001 Sep;15(3):363-74. Review.

**225.** Tse SW, Radtke AJ, Zavala F. Induction and maintenance of protective CD8+ T cells against malaria liver stages: implications for vaccine development. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:172-8.

**226.** Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002 Jul;54(4):221-9. Epub 2002 Jun 14.

**227.** Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(4):471-5. Review.

**228.** Umemura T, Ota M, Katsuyama Y, Wada S, Mori H, Maruyama A, Shibata S, Nozawa Y, Kimura T, Morita S, Joshita S, Komatsu M, Matsumoto A, Kamijo A, Kobayashi M, Takamatsu M, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Tanaka E. KIR3DL1-HLA-Bw4 combination and IL28B polymorphism predict response to Peg-IFN and ribavirin with and without telaprevir in chronic hepatitis C. *Hum Immunol*. 2014 Aug;75(8):822-6.

- 229.** Vanderberg JP. Imaging mosquito transmission of Plasmodium sporozoites into the mammalian host: immunological implications. *Parasitol Int.* 2014 Feb;63(1):150-64. Review.
- 230.** Vendelbosch S, de Boer M, van Leeuwen K, Pourfarzad F, Geissler J, van den Berg TK, Kuijpers TW. Novel insights in the genomic organization and hotspots of recombination in the human KIR locus through analysis of intergenic regions. *Genes Immun.* 2015 Mar;16(2):103-11.
- 231.** Vento S, Cainelli F, Cesario F. Infections and thalassaemia. *The Lancet Infectious diseases.* 2006 Apr;6(4):226-33. PubMed PMID: 16554247.
- 232.** Vidal-Castiñeira JR, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Alonso-Arias R, Martínez-Borra J, Pérez R, Fernández-Suárez J, Melón S, Prieto J, Rodrigo L, López-Larrea C. Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2010 Jan;84(1):475-81. doi: 10.1128/JVI.01285-09. Epub .
- 233.** Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217-51. Epub 2001 Oct 4. Review.
- 234.** Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687. Review.
- 235.** Watzl C, Urlaub D, Fasbender F, Claus M. Natural killer cell regulation beyond the receptors. *F1000Prime Rep.* 2014 Oct 1;6:87. doi: 10.12703/P6-87. eCollection 2014. Review.
- 236.** Weatherall DJ. Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *Bmj.* 2000 Nov 4;321(7269):1117-20.
- 237.** White NJ. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect.* 2008 Jan 15;46(2):172-3
- 238.** Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4778-83.
- 239.** Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens.* 1997 Jun;49(6):574-9.
- 240.** Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol.* 1997; 158(9):4026-8.
- 241.** Wiśniewski A, Kowal A, Wyrodek E, Nowak I, Majorczyk E, Wagner M, Pawlak-Adamska E, Jankowska R, Ślesak B, Frydecka I, Kuśnierczyk P. Genetic polymorphisms and expression of HLA-G and its receptors, KIR2DL4 and LILRB1, in non-small cell lung cancer. *Tissue Antigens.* 2015 Jun;85(6):466-75.
- 242.** Woldearegai TG, Kremsner PG, Kun JF, Mordmuller B. Plasmodium vivax malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2013 May;107(5):328-31.
- 243.** World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2014. Link: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/)
- 244.** Wright GJ, Rayner JC. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS pathogens.* 2014 Mar;10(3):e1003943.
- 245.** Wunderlich F, Al-Quraishy S, Dkhil MA. Liver-inherent immune system: its role in blood-stage malaria. *Front Microbiol.* 2014 Nov 4;5:559.
- 246.** www.lifetechnologies.com. Acesso em: 06 de abril de 2015.

- 247.** Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson TJ, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau H, Carnevale P, D'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestre A, Mayxay M, Ménard D, Musset L, Newton PN, Nkoghé D, Noya O, Ollomo B, Rogier C, Veron V, Wide A, Zakeri S, Carme B, Legrand E, Chevillon C, Ayala FJ, Renaud F, Prugnolle F. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 10;109(2):511-6.
- 248.** Yindom LM, Forbes R, Aka P, Janha O, Jeffries D, Jallow M, Conway DJ, Walther M. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Tissue Antigens*. 2012 Feb;79(2):104-13.
- 249.** Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet*. 2006 Nov;70(Pt 6):822-8.
- 250.** Zhang G, Niu G, Franca CM, Dong Y, Wang X, Butler NS, Dimopoulos G, Li J. Anopheles midgut FREP1 mediates *Plasmodium* invasion. *J Biol Chem*. 2015 May 19.

### Anexo 1– artigo publicado

## Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene diversity in a population naturally exposed to malaria in Porto Velho, Northern Brazil

D. S. Perce-da-Silva<sup>1</sup>, L. A. Silva<sup>1</sup>, J. C. Lima-Junior<sup>2</sup>, J. Cardoso-Oliveira<sup>3</sup>, M. Ribeiro-Alves<sup>4</sup>, F. Santos<sup>5</sup>, L. C. M. S. Porto<sup>3</sup>, J. Oliveira-Ferreira<sup>2</sup> & D. M. Banic<sup>1</sup>

1 Laboratory of Simulids and Onchocerciasis "Malaria and Onchocerciasis Research", Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

2 Laboratory of Immunoparasitology Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

3 Laboratory for Histocompatibility, Estadual University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

4 HIV/AIDS Clinical Research Center, National Institute of Infectology, INI, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

5 Laboratory of Entomology, LACEN, Rondônia, Brazil

#### Key words

Brazil; human leukocyte antigen; killer immunoglobulin-like receptors; malaria

#### Correspondence

Dalma Maria Banic  
Laboratory of Simulids and Onchocerciasis  
"Malaria and Onchocerciasis Research"  
Oswaldo Cruz Institute  
Oswaldo Cruz Foundation  
Rio de Janeiro  
Brazil  
Tel: 55 21 25621613  
Fax: 55 21 25621634  
e-mail: banic@ioc.fiocruz.br

Received 8 February 2014; revised 10 November 2014; accepted 13 January 2015

doi: 10.1111/tan.12523

#### Abstract

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are expressed mainly in natural killer cells and specifically recognize human leukocyte antigen (HLA) class I molecules. The repertoire of KIR genes and KIR–HLA pairs is known to play a key role in the susceptibilities to and the outcomes of several diseases, including malaria. The aim of this study was to investigate the distribution of KIR genes, KIR genotypes and KIR–HLA pair combinations in a population naturally exposed to malaria from Brazilian Amazon. All 16 KIR genes investigated were present in the studied population. Overall, 46 KIR genotypes were defined. The two most common genotypes in the Porto Velho communities, genotypes 1 and 2, were present at similar frequencies as in the Americas. Principal component analysis based on the frequencies of the KIR genes placed the Porto Velho population closer to the Venezuela Mestizos, USA California hispanic and Brazil Paraná Mixed in terms of KIR gene frequencies. This analysis highlights the multi-ethnic profile of the Porto Velho population. Most of the individuals were found to have at least one inhibitory KIR–HLA pair. Seventy-five KIR–HLA pair combinations were identified. The *KIR2DL2/3\_HLA-C1*, *KIR3DL1\_HLA-Bw4* and *KIR2DL1\_HLA-C2* pairs were the most common. There was no association between KIR genes, KIR genotypes or KIR–HLA pair combinations and malaria susceptibility in the studied population. This is the first report on the distribution of KIR and known HLA ligands in the Porto Velho population. Taken together, these results should provide baseline information that will be relevant to population evolutionary history, malaria and other diseases studies in populations of the Brazilian Amazon.

#### Introduction

The killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) constitute a family of transmembrane glycoproteins that are expressed mainly on the surface of natural killer (NK) cells and in a few subsets of T cells (1, 2). The KIRs participate in the regulation of the activity of both cell types through interaction with polymorphic human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on the surface of target cells (3, 4), and thereby affecting both innate and adaptive immunity.

A family of highly polymorphic genes clustered within the leukocyte receptor complex on human chromosome 19q13.4

encodes the KIR. Currently, 16 genes/pseudogenes have been characterized. Fourteen of these genes encode receptors that trigger inhibition (*KIR3DL1-3*, *KIR2DL1-3* and *KIR2DL5*), activation (*KIR3DS1* and *KIR2DS1-5*) or both (*KIR2DL4*), whereas the other two are pseudogenes (*KIR2DP1* and *KIR3DP1*) that do not encode cell-surface receptors (5).

The KIR diversity is the result of the gene and allele contents, which give rise to haplotype variety and leading to an astonishing number of different genotypes that vary greatly among different ethnic groups. According to the Allele Frequency Net Database (6, 7), which is available at [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net), more than 400 distinct KIR

genotypes have been identified from approximately 12,741 individuals belonging to 108 different populations. In addition, their HLA class I ligands (HLA-A, HLA-B and HLA-C) are also extremely polymorphic, and this generates a wide diversity in the number and type of inherited KIR–HLA combinations (8), which likely contributes to the generation of varying degrees of susceptibility to infections and disease (9–14). Thus, the knowledge of the KIR gene composition in a given population can contribute to the understanding of the disease epidemiology and the genetic and geographic history of a given region (15–18).

Recent studies have demonstrated the important influence of KIR and HLA ligand genes on the susceptibility to and outcomes of various noninfectious and infectious diseases (13, 18), including malaria (12, 19–23). Malaria infection has a variable clinical phenotype, ranging from mild febrile illness to severe disease and death, but infection can also occur in the absence of clinical symptoms. These variations in disease patterns are attributable to a number of different factors, which include the genetic background of both the host and pathogen (24, 25). In humans, it has been clearly demonstrated that the genetic polymorphisms in the gene-encoding components of the immune response can influence the outcome of malaria infection (25). In relation to KIR and HLA ligands, only a few studies have addressed the role of polymorphism in these genes in malaria. The first study found that NK cell interferon (IFN)-gamma production in response to *Plasmodium falciparum* antigens is, in part, regulated by KIR genes (26). Subsequently, the associations of KIR and HLA ligand genes with the susceptibility to and outcome of malaria infection have been found in studies conducted in different malaria-exposed populations from Gambia, Kenya, Thailand, India and the Solomon Islands (12, 20–23). However, no KIR genes associated with malaria in Brazilian endemic areas have been identified.

In light of these findings, the aim of the present study was to characterize the KIR and HLA ligand genetic profiles of individuals from the Brazilian Amazon (Porto Velho, RO) who are naturally exposed to malaria infections. The findings will be relevant for studies on population evolutionary history, as well as studies on malaria and vaccines for populations in the Brazilian Amazon.

## Material and methods

### Ethics statement

The study protocol and consent forms were reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethics Committee and National Ethics Committee of Brazil (approval reference number: 354/06). Written informed consent was obtained from all adult participants or from the parents of the minors (under 18 years of age) who participated in this study at the time of enrollment.

### Study area and population

The study was conducted in 377 unrelated and randomly selected individuals from Porto Velho rural communities (63°54'13''W 8°45'43''S). Porto Velho is the capital of the state of Rondônia in the Brazilian Amazon. In this region, malaria transmission is found throughout the year with seasonal fluctuations and an increased number of cases between April and September (27). The population of villages in this region is composed of rain forest natives and also of migrants from non-endemic areas of Brazil. The rain forest natives are mainly descended from Amazon Amerindians, which are the original inhabitants of this region, admixed with European settlers and Sub-Saharan Africans who arrived from the 19th to the beginning of the 20th century (28). The Brazilian migrants are mainly descended from people who came from the southern and southeastern regions in the 1970s and 1980s and had predominantly European ancestors (mainly Italian, German and Polish) (28) due to colonization programs implemented by the government that focused on agriculture and wide-ranging human settlement (29). The enrollment exclusion criteria were as follows: age < 10 years old, pregnancy, breast-feeding, anti-malarial drug use, mental disorders and status as member of an indigenous population.

### Collection of epidemiological data, human blood samples and malaria diagnosis

A questionnaire was applied to all of the participants to obtain information on demographics, time of residence in the endemic area and personal malaria history. The individuals' cumulative exposure to malaria was estimated by the age, the length of residence (in years) in the malaria endemic area and the self-reported number of lifetime malaria episodes. The individuals' clinical protection was estimated by the length of the period (in months) since their last malaria episode (LME). Blood samples (10 ml) from all of the donors were drawn by venipuncture into ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) tubes. The samples were centrifuged, and the plasma and red cell pellets were stored separately at –20°C until analysis. Thin and thick blood smears of all of the donors were examined for malaria parasites. The parasitological evaluations were performed by examination of 200 fields at 1000-fold magnification under oil-immersion by two researchers with expertise in malaria diagnosis. Donors positive for *Plasmodium vivax* and/or *P. falciparum* were subsequently treated according to Brazilian Ministry of Health standards for malaria therapy.

### Genomic DNA extraction

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples collected in EDTA by using a QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined using a Qubit fluorimeter (Life Technologies, Carlsbad, CA), and the

filtrates containing the isolated DNA were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until time of use.

### KIR and HLA genotyping

The reverse sequence-specific oligonucleotide technique (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) with Luminex xMap technology (Luminex Corp., Austin, TX) were used for the typing of the 14 KIR genes and two KIR pseudogenes namely *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* and *KIR3DP1* and of the HLA Class I alleles HLA-A, HLA-B and HLA-C, according to the manufacturer's instructions. To distinguish HLA-C1/C2 groups, we subjected some of the samples to high-resolution tests (RSSOH1A, RSSOH1B and RSSOH1C) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) other samples (e.g. some *HLA-C\*16* can be HLA-C1 or C2) to Olerup SSP<sup>®</sup> KIR HLA Ligand tests (Olerup, Stockholm, Sweden).

### Multidimensional principal components analysis

The multidimensional PCA was performed on the KIR gene frequencies from Porto Velho (BPV) and from 51 world populations available in the Allele Frequency Net database (6, 7). To avoid spurious associations resulting from the use of noisy data, we filtered out datasets from populations with less than a hundred genotyped individuals or that were not previously reported in the literature. All of the analyses were conducted using R version 2.14.0 (30).

### Statistical analysis

The carrier frequency was calculated through the direct counting of individuals possessing at least one copy of the gene (individuals heterozygous for a KIR gene cannot be distinguished from those that are homozygous without family members, who were not available for this study). The genotypic frequency (GF) was calculated by the formula  $GF = 1 - \sqrt{1 - CF}$ , which was derived from the carrier frequency  $CF = \text{frequency } (F\%) / 100$  (31). The survey data were recorded and entered into a database created with Epi Info 2007 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was performed using online calculator (32) with one degree of freedom. The analyses were performed using Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) according to the necessary statistical test. Differences in the medians of the study population data were tested using the non-parametric Mann-Whitney test whenever appropriate. Differences in the proportions of infected individuals and of individuals who reported previous malaria episodes were evaluated with the chi-squared test. The value of  $P < 0.05$  was considered significant.

**Table 1** Epidemiological characteristics of the studied population ( $N = 377$ )

Gender	
Male ( $N$ )	223
Female ( $N$ )	154
Age ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	$34 \pm 16$
Time of residence in malaria endemic area/years ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	$22 \pm 17$
Number of past malaria infections ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	$12 \pm 9$
Past months since the last malaria infection ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	$40 \pm 60$
Acute malaria infection ( $N/\%$ ) <sup>a</sup>	93/24.6
Previous malaria episodes ( $N/\%$ ) <sup>b</sup>	326/86.5

$\bar{x}$ , mean;  $N$ , number of individuals; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>The difference in the proportions of infected individuals was statistically significant ( $\chi^2 = 191.5$ ;  $P < 0.0001$ ).

<sup>b</sup>The difference in the proportions of individuals who reported previous malaria episodes was statistically significant ( $\chi^2 = 271.01$ ;  $P < 0.0001$ ).

## Results

### General features of the studied population

The epidemiological data summarized in Table 1 show that the studied population was exposed to malaria infection throughout the year. A significantly higher proportion of the studied individuals reported a prior malaria experience (86.5%) compared with the number of individuals who could not recall malaria infections in the past and mentioned that they never had malaria even though they were born in the endemic area ( $\chi^2 = 271.01$ ;  $P < 0.0001$ ). A positive correlation was observed between the time of residence in the endemic area and age [Spearman's  $r = 0.6974$ , confidence interval (CI):  $0.6416 - 0.7454$ ,  $P < 0.0001$ ]. Among donors, the number of previous malaria episodes (NPM) and the length of the period (in months) since the LME were significantly higher in individuals older than 31 years (median):  $>31$  years ( $n = 167$ ), NPM = 5, CI:  $5.966 - 8.176$  and LME = 24 months, CI:  $40.16 - 61.39$ ;  $\leq 31$  years ( $n = 159$ ), NPM = 3, CI:  $4.425 - 7.214$  and LME = 10 months, CI:  $19.08 - 32.17$  ( $P = 0.0006$  and MW = 14,130 and  $P = 0.0003$  and MW = 1,1230, respectively). Therefore, we used the age, years of residence in the endemic area and number of past malaria episodes reported by donors as indices of malaria exposure, and we used the past months since the LME as a crude approximation of clinical protection. At the time of blood collection, 93 (25%) individuals were infected, 64 (69%) with *P. vivax*, 28 (30%) with *P. falciparum* and one individual with both species, which is consistent with the current local case distribution data for these two species reported by the Ministry of Health.

### KIR gene frequencies

The distribution of KIR gene frequencies ( $F\%$ ) in unrelated individuals from Porto Velho (RO) is illustrated in Table 2. All 16 KIR genes investigated (14 genes and 2 pseudogenes, including framework loci) were detected in

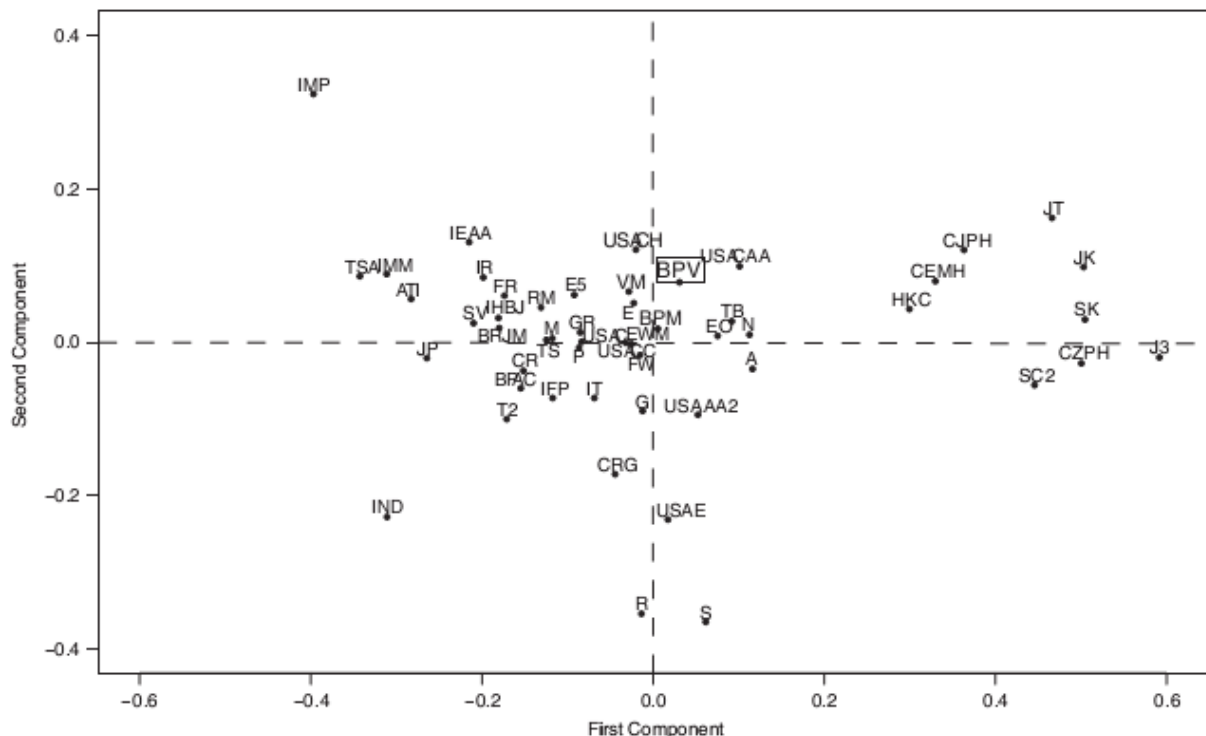
**Table 2** Distribution of KIR gene frequencies in the studied population ( $N=377$ )

KIR gene	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1
<i>N</i>	359	176	337	377	222	354	377	377	163	157	86	354	162	153	360	377
<i>F%</i>	94.9	46.4	89.1	100	58.6	93.9	100	100	43.2	41.4	22.5	93.6	42.9	40.6	95.6	100
<i>GF</i>	0.774	0.267	0.669	1	0.356	0.753	1	1	0.246	0.234	0.119	0.747	0.244	0.229	0.790	1

*F%*, KIR genes frequencies; *GF*, genotypic frequency; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptors; *N*, number of individuals.

the study population, and the framework loci *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* and *KIR3DP1* were present in all individuals (Table 2). In general, the frequencies of inhibitory KIR genes were greater than 89%, with the exception of *KIR2DL2* and *KIR2DL5* (with frequencies of 46.4% and 58.6%, respectively), whereas the percentage of subjects in the study population carrying any of the activating KIR genes (except for the *KIR2DS4*, with a frequency of 93.6%) ranged from 22.5% to 43.2% in the study population. *KIR2DS4*

is unique in comprising nondeleted (membrane-bound) *KIR2DS4\*001/002/011/014/015* alleles and deleted variants (*KIR2DS4\*003/004/006/007/008/009/010/012/013*) which contain a 22-bp deletion in exon 5 (33, 34). The deleted variants are transcribed; however, proteins are secreted without being membrane-bound on the NK cell surface (34–36). We only performed output analysis of *KIR2DS4* alleles in 233 (65.8%) of 354 positive individuals. We found 155 (66.5%) samples with truncated



**Figure 1** Biplot representation of principal component analysis (PCA) showing the variables (KIR gene frequencies), eigenvectors, relationships among populations and eigenvalues. The cumulative proportion of the variance explained by principal components 1 (58.34%) and 2 (13.96%) is 72.3%. The populations are referred to by abbreviations as follows: A, Argentina; ATI, Azores Terceira Island; BPV, Brazil Porto Velho; BPM, Brazil Parana Mixed; BRJM, Brazil Rio de Janeiro Mixed; BPAC, Brazil Porto Alegre Caucasian; CEMH, China Eastern Mainland Han; CJPH, China Jiangsu Province Han; CRG, Costa Rica Guanacaste; CR, Czech Republic; E, England; EO, England Oxfordshire; E5, England pop5; EWM, England West Midlands; FR, France Reims; FW, France West; G, Germany; Gr, Greece; HKC, Hong Kong Chinese; I, Iran; IMM, India Mumbai Maharashtrian; IMP, India Mumbai Parsi; IEAA, Iran East Azerbaijan Azerbaijani; IFP, Iran Fars Persian; IHBJ, Iran Hormozgan and Balochistan Jonobi; IND, Israel North Druze; I, Italy; JK, Japan Kyoto; J3, Japan pop3; JT, Japan Tokyo; JP, Jordan Palestine; M, Macedonia; N, Norway; P, Poland; RM, Reunion Mixed; R, Romania; S, Senegal; SC2, Singapore Chinese pop2; SK, South Korea; SV, Sweden Vasterbotten; TB, Thailand Bangkok; TSA, Trinidad South Asians; T2, Turkey pop2; TS, Turkey South; USAA2, USA African American pop2; USACAA, USA California Asian American; USACH, USA California Caucasians; USACH, USA California Hispanic; USAC, USA Caucasian; USAE, USA Eastern; and VM, Venezuela Mestizo.



version of *KIR2DS4* and 78 (33.5%) samples with full length version.

### Principal component analysis

The multidimensional PCA was performed to investigate the relationship of the Porto Velho communities with 51 other global populations in terms of KIR gene frequencies (Figure 1). The biplot representation of the PCA results shows the Porto Velho population far from some populations, such as Asians, West Africans (Senegal) and Middle Easterners, and relatively close to the Venezuela Mestizos, USA California hispanic and Brazil Paraná Mixed in terms of KIR gene frequencies. The two main components accounted for 72.3% of the data variance.

### Frequencies of KIR ligands (HLA class I genes)

The frequency distribution of the HLA genes with KIR-binding motifs is shown in Table 3. Among the five HLA class I KIR ligands analyzed in our population, HLA-C1 (79.6%), HLA-Bw4 (70.8%) and HLA-C2 (66.8%) were the most frequent KIR ligands, as expected. The HLA-C genotype frequencies were in agreement with HWE ( $\chi^2 = 1.19$ ;  $P = 0.274$ ) (Table 3).

### Frequencies of coexistent KIR and its putative HLA ligand genes

Because of the fact that KIR and their HLA ligands display considerable genetic diversity, are located on different chromosomes and segregate independently from each other, some individuals lack particular KIR–HLA receptor–ligand pairs. Therefore, we evaluated the coexistence of KIR genes and their putative HLA ligands in the same individual to observe the possible KIR and HLA ligand combinations within our population (Table 4).

The great majority of individuals (99.5%) carried at least one HLA gene encoding a putative ligand for inhibitory KIR receptors, whereas 30.5% of the individuals (115/377) lacked any HLA gene that encoding a putative ligand for activating KIR receptor.

**Table 3** Frequencies of HLA class I (KIR ligands) in the studied population ( $N = 377$ )

KIR ligands	<i>Np</i>	(%)
HLA-C1	300	79.6
HLA-C2	252	66.8
HLA-C1/C1	125	33.2
HLA-C2/C2	77	20.4
HLA-C1/C2	175	46.4
HLA-Bw4	267	70.8
HLA-A3/A11	88	23.3

HLA, human leukocyte antigen; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptors; *N*, number of subjects included in the study; *Np*, number of positive individuals.

**Table 4** Frequencies of KIR genes in the presence of their putative HLA class I ligands (KIR–HLA pairs) in the studied population ( $N = 377$ )

KIR–HLA	<i>Np</i>	(%)
<b>Inhibitor pairs</b>		
<i>KIR2DL1_C2</i>	243	64.4
<i>KIR2DL1_C2/C2</i>	74	30.4
<i>KIR2DL1_C1/C2</i>	169	69.6
<i>KIR2DL2/3_C1*</i>	300	79.6
<i>KIR2DL2/3_C1/C1</i>	124	41.3
<i>KIR2DL2/3_C1/C2</i>	176	58.7
<i>KIR3DL1_Bw4</i>	250	66.3
<i>KIR3DL2_A3/A11</i>	88	23.3
<b>Activating pairs</b>		
<i>KIR2DS1_C2</i>	112	29.7
<i>KIR2DS1_C2/C2</i>	46	41.1
<i>KIR2DS1_C1/C2</i>	66	58.9
<i>KIR2DS2_C1*</i>	125	33.1
<i>KIR2DS2_C1/C1</i>	48	38.4
<i>KIR2DS2_C1/C2</i>	77	61.6
<i>KIR3DS1_Bw4*</i>	114	30.2

HLA, human leukocyte antigen; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptors; *N*, number of subjects included in the study; *Np*, number of positive individuals.

\*Very weak and/or controversial affinity.

The *KIR-2DL2/3\_HLA-C1*, *KIR3DL1\_HLA-Bw4* and *KIR2DL1\_HLA-C2* pairs were the most common with respective frequencies of 79.6%, 66.3% and 64.4% (Table 4). A total of 75 different KIR–HLA pair combinations were identified in our studied population, and each carried between one and eight putative pairs per individual. The largest proportion of the Porto Velho population (70%;  $P < 0.001$  for all) displayed between 2 and 4 putative KIR–HLA pairs. As expected, the frequencies of individuals that carried more putative inhibitory KIR–HLA pairs (69%) were significantly higher than both those of the individuals carrying more putative activating KIR–HLA pairs (10%) and the individuals carrying a similar amount of putative inhibitory and activating KIR–HLA pairs (21%) ( $P < 0.0001$ , for both). No association between these three KIR–HLA pair profiles with respect to malaria susceptibility was observed (Table 5) ( $P > 0.05$  for all).

Based on the fact that certain KIR–HLA receptor–ligand combinations are associated with malaria susceptibility, such as *KIR2DL2/KIR2DS2* and *KIR2DL3*, which share the HLA-C1 ligand (21, 22), their frequencies were analyzed in our population. The results show that 46.9% (177/377) of the individuals carried an inhibitory KIR gene (*KIR2DL2*) and/or its corresponding activating counterpart (*KIR2DS2*). Of these individuals, 78% (138/177) displayed their respective ligand HLA-C. The analysis of *KIR2DL3* revealed that 89.4% (337/377) of the individuals carried an inhibitory KIR gene (*KIR2DL3*) and of them, 79.2% (267/337) displayed the respective ligand HLA-C1 gene. The examination of whether the presence of *KIR2DL2*, *KIR2DS2* or *KIR2DL3* in combination or not with HLA-C1 was associated with the number of previous malaria

**Table 5** Epidemiological profile of the studied population according to the genotype containing

Genotypes containing	(years) Age		Time of residence in malaria endemic area (years)		Previous malaria episodes		Past months since the last malaria infection	
	Median	<i>P</i>	Median	<i>P</i>	Median	<i>P</i>	Median	<i>P</i>
INHIBITORY/ACTIVATING KIR-HLA PAIRS								
More inhibitory KIR-HLA pairs ( <i>N</i> = 260)	29 (20-44)		23 (17-34)		4 (1-10)		12 (1-48)	
More activating KIR-HLA pairs ( <i>N</i> = 37)	33 (24.5-45.5)	>0.05*	29 (22-44.5)	>0.05*	4 (2-10)	>0.05*	24 (2-72)	>0.05*
Similar amount of inhibitory and activating KIR-HLA pairs ( <i>N</i> = 80)	33 (21-51)		27 (18-42)		5 (3-10)		11 (1-45)	
KIR2DL2/KIR2DS2_HLA-C PAIRS								
KIR2DL2/KIR2DS2_C1+ ( <i>N</i> = 125)	30 (21-48)		25 (18-37.5)		5 (2-10)		11.5 (2-48)	
KIR2DL2/KIR2DS2_C1- ( <i>N</i> = 31)	32 (22-46)	>0.05	26 (20-35)	>0.05	4 (1-7.7)	>0.05	14 (1-48)	>0.05
KIR2DL3_HLA-C PAIRS								
KIR2DL3_C1+ ( <i>N</i> = 267)	30 (21-45)		24 (17-37)		5 (2-10)		18 (5-60)	
KIR2DL3_C1- ( <i>N</i> = 70)	28 (19.7-46.2)	>0.05	23 (16-35.2)	>0.05	4 (2-10)	>0.05	21.5 (2-57)	>0.05
ACTIVATING KIR GENES								
More than four activating genes ( <i>N</i> = 62)	30.5 (22-46)		26 (18-41)		4 (2-10)		12 (2-60)	
Less or equal four activating genes ( <i>N</i> = 315)	31 (20-44)	>0.05	23 (17-34.5)	>0.05	4 (1-10)	>0.05	12 (1-48)	>0.05
GENOTYPES								
Genotype 1 ( <i>N</i> = 117)	32 (20.5-40.5)		24 (17-36)		4 (1-10)		12 (1-60)	
Genotype 2 ( <i>N</i> = 58)	33.5 (22-48.2)		26 (18.7-42)		4 (1-10)		14 (1-60)	
Genotype 3 ( <i>N</i> = 23)	35 (22-51)	>0.05*	29 (18-45)	>0.05*	5 (2-10)	>0.05*	9 (1.2-66)	>0.05*
Genotype 4 ( <i>N</i> = 28)	30.5 (21.2-47.5)		23 (18-35)		5 (3-10)		10 (1-36)	
Genotype 5 ( <i>N</i> = 21)	36 (19.5-50.5)		23 (17.5-40)		2 (1-10)		12 (5-36)	
The 41 less common genotypes ( <i>N</i> = 130)	29 (20-44.2)		23 (16-33)		4 (2-10)		11.5 (1-60)	

HLA, human leukocyte antigen; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptors; *N*, number of individuals.

Median values (Interquartile range) are shown; Mann-Whitney test.

\*Among all.

infections and the length of the period since the LME did not reveal any significant association (Table 5) ( $P > 0.05$  for all).

### KIR genotypes

A total of 46 different KIR genotypes were identified in our studied population (Figure 2) based on the presence and absence of 16 KIR genes. All of these were previously described in the KIR genotype database ([www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)) and contained between 9 and 15 KIR genes per individual. The genotype 1, the most common, accounted for 31% of all genotypes in our studied population, and genotypes 2, 4, 3 and 5 were detected in 15.4%, 7.4%, 6% and 5.6% of the studied population (Figure 2). Twenty-six of the 46 genotypes (56.5%) had a frequency of less than 1.0%, accounting for 10.1% of the individuals. The two most common genotypes (1 and 2) observed in our population were present at a similar frequency to that of North, Central and South American populations ([www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net))

( $P > 0.05$  for all). The relation between the number of previous malaria episodes and the length of the period since the LME with the different KIR genotypes was analyzed. However, no relationship was found between any of the KIR genotypes and susceptibility to malaria infection in our studied population (Table 5) ( $P > 0.05$  for all).

### Discussion

Here, we presented for the first time the characterization of the KIR and HLA ligand genetic profiles of Porto Velho communities (Brazilian Amazon), which are naturally exposed to malaria infections and compared them with those of other worldwide populations reported elsewhere. In addition, we searched for patterns in the KIR genotype distribution that could be associated with malaria susceptibility in this population.

All 16 KIR genes investigated were present in the studied population. PCA analyses based on the frequencies of the KIR genes showed that Porto Velho population was further

ID Genotype	Inhibitory KIR									Activating KIR					Pseudogenes		Total		
	2DL					3DL				2DS					3DS	2DP	3DP	N	%
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1	1	1			
1																	117	31	
2																	58	15.4	
3																	23	6	
4																	28	7.4	
5																	21	5.6	
6																	9	2.4	
7																	10	2.6	
8																	6	1.6	
9																	5	1.3	
10																	1	0.3	
11																	1	0.3	
13																	1	0.3	
14																	1	0.3	
17																	1	0.3	
18																	4	1.1	
19																	6	1.6	
20																	6	1.6	
21																	3	0.8	
24																	1	0.3	
27																	2	0.5	
30																	6	1.6	
32																	4	1.1	
46																	1	0.3	
51																	1	0.3	
58																	2	0.5	
68																	7	1.8	
69																	4	1.1	
70																	3	0.8	
71																	9	2.4	
72																	1	0.3	
73																	3	0.8	
74																	4	1.1	
75																	1	0.3	
76																	3	0.8	
78																	1	0.3	
80																	1	0.3	
81																	1	0.3	
86																	1	0.3	
87																	1	0.3	
91																	4	1.1	
94																	3	0.8	
106																	8	2.1	
112																	1	0.3	
144																	1	0.3	
293																	1	0.3	
325																	1	0.3	
N	359	176	337	377	222	354	377	377	163	157	86	354	162	153	360	377	377	100	
%	95.2	46.7	89.4	100	58.9	93.9	100	100	43.2	41.6	22.8	93.9	42.9	40.6	95.6	100			

**Figure 2** KIR genotype profiles in the Porto Velho communities (Brazilian Amazon). ID, Identification number in allelfrequencies.net; N° INH, amount of inhibitory KIRs present; N° ACT, amount of activating KIRs present; The filled boxes indicate the presence of the gene, the gray boxes represent the framework genes; White boxes indicate the absence of the gene.

away from some populations, such as Asians, West-Africans (Senegal) and Middle East, for instance, and relatively close to inbreed populations like Venezuela Mestizos, USA California hispanic and Brazil Parana Mixed, but not too far from populations that migrated from Europe to America a few centuries ago, so with some expected inbreeding, like USA Caucasian (USAC) and USA Eastern (USAE).

Through the establishment of inter-ethnic relations, this analysis demonstrates the multi-ethnic profile of the Porto Velho population. Since Portuguese colonization (18th century), Porto Velho has received a succession of migration waves associated with the rubber boom and the construction of the Madeira-Mamoré railroad and more recently in the 70s and

80s, the colonization programs focused on agriculture and wide-ranging human settlement. Because of this last wave of migration, Porto Velho and the nearby regions received workers, natives of the southeastern, northeast and southern regions, with predominantly European ancestors (mainly Italian, German and Polish), that increased the diversification of the ethnic composition in this area (37). Thereby, the KIR diversity observed in the Porto Velho population showed patterns of genetic differentiation that may be related not only to genetic drift but also to gene flow, or even as the result of different selective pressures because of KIR immune function.

At present, population studies have revealed more than 390 genotypes that differ in their gene content (6, 7). This

study enabled us to identify 48 different KIR genotypes in our population, all of them previously described in the KIR genotype database. The two most common genotypes in the Porto Velho communities, genotypes 1 and 2, are common in many other populations. However, the frequencies were similar to those observed in the North, Central and South Americas (www.allelefreqencies.net), which is consistent with the results of mitochondrial DNA and classical markers studies reflecting the human demographic history of the American continent, starting with the first settlement of the Americas by Asians across the Bering Strait approximately 15–18 thousand years ago plus post-Columbus migrations with more than five centuries of admixture between Natives Americans, Europeans, Africans and modern Asians (38–40).

It is known that both HLA and KIR gene families exhibit substantial genetic diversity and segregate independent of each other in a normal Mendelian fashion, resulting in a multitude of possible KIR–HLA combinations between individuals and also between populations. Numerous genetic studies have demonstrated the influence of KIR–HLA gene pairs on the susceptibility to and outcomes of various noninfectious and infectious diseases (18, 41). Thus, we evaluated the putative KIR–HLA pair combinations in our population. The number and types of combinations of the KIR–HLA pairs are variable. As expected, the frequencies of individuals carrying the putative inhibitory KIR–HLA gene pairs were higher than the number of those carrying putative activating KIR–HLA pairs. It is worth noting that although several genetic studies have suggested a functional interaction for certain activating KIR–HLA pairs (42), some of these statements remain controversial (22).

No association was found between the presence of KIR genes and their corresponding HLA ligands (*KIR2DL1* and *KIR2DS1* with *HLA-C2*; *KIR2DL2/3* and *KIR2DS2* with *HLA-C1*; *KIR3DL1* and *KIR3DS1* with *HLA-Bw4*). Thus, these findings may indicate that natural selection pressure on the KIR–HLA combinations is not a major factor determining population frequencies. These findings are in agreement with previously published reports on other Brazilian populations (43, 44).

Previous studies have reported a possible association of the predominance of activating KIR genes with susceptibility to malaria infections (12, 20, 26). It has been suggested that the predominance of activating genes (i.e. >4) may contribute to the pathogenesis of malaria because of a more aggressive inflammatory immune response, which allows the disease can develop the into its various clinical forms. On the other hand, studies have also demonstrated that the number of activating genes (i.e. ≤4) inherited by an individual may play a role in protection. In our study, we did not observe any association between the numbers of activating KIR genes (Table 5) or the number of putative activating KIR–HLA pairs with malaria susceptibility.

As expected, the frequencies of individuals carrying the putative inhibitory KIR–HLA gene pairs were higher than

that of the individuals carrying putative activating KIR–HLA pairs. Although, the majority of individuals carried at least one KIR–HLA functional inhibitory gene pair, it is worth noting that approximately 30% of the individuals lacked functional activating KIR–HLA genes pairs. This results is in agreement with the findings of some population studies that reported the cases of individuals without inhibitory or activating KIR–HLA pairs (45, 46), which increases the evidence that the ligands of most activating KIR remain to be determined (47).

Two of the 377 individuals in the studied population did not carry any HLA gene encoding a putative ligand for inhibitory KIR receptors. These individuals had the C2C2 genotype and carried the *KIR2DL2*, *KIR2DL5* and *KIR3DL1* genes. Despite the presence of an inhibitory pair being important for the avoidance of self-aggression, it is important to take into account the existence of other inhibitory receptors on the surface of NK cells, which are also responsible for a similar role (48, 49). Moreover, some alleles of *KIR2DL2* are able to cross-react, with differing avidities, with a small number of C2 and may used it as a functional ligand that can be responsible for the inhibition of NK cells activation (50, 51). A previous studies demonstrated that the *KIR2DL2*, *KIR2DS2* and *KIR2DL3* genes, which share the HLA-C1 ligand, are involved in increased susceptibility to several diseases (52–54), including malaria (21, 22). In contrast, similar associations were not observed in our population. Influence of the KIR genes and their HLA ligands with resistance/susceptibility and severity in malaria in Africa and Asia has been reported (15, 16, 21), however, the influence of these genes in malaria in Brazil is still poorly explored. In the present work, no association was established between the KIR genes, KIR genotypes or KIR–HLA pair combinations and malaria susceptibility. Taking into account that susceptibility to diseases may vary considerably under different epidemiological scenarios. Brazil has a peculiar epidemiological situation and the dynamics of malaria infection and severity differ greatly from malaria endemic regions of Africa and Asia. This happens most probably due to a combination of factors, such as (i) in Brazil, malaria is hypo to meso-endemic, is present throughout the year with clear seasonal fluctuations, is diagnosed and treated early, *Anopheles darlingi* is the main vector and *P. vivax* accounts for 82% disease incidence (55), (ii) the genetic background of the parasite and (iii) the immune status allied to the diverse genetic background of the Porto Velho population, as before mentioned. In this sense, we can speculate that generalization of findings from Africa and Asia may not be appropriate for our malaria endemic area in the Amazon region of Brazil. Despite these results, we understand that there is still need to extend these analyses with additional parameters to measure malaria susceptibility, such as parasitemia, clinical manifestations and cytokine levels, including IFN-gamma. In this context, studies with these parameters are being undertaken in our study population. Taken together, our findings are relevant to population evolutionary

history, malaria and other diseases studies in populations of the Brazilian Amazon.

### Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

### References

- Young NT, Canavez F, Uhrberg M, Shum BP, Parham P. Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 2001; **53**: 270–8.
- Chan WK, Rujkijyanont P, Neale G *et al.* Multiplex and genome-wide analyses reveal distinctive properties of *KIR*+ and CD56+ T cells in human blood. *J Immunol* 2013; **191**: 1625–36.
- Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 626–33.
- Rempel JD, Hawkins K, Lande E, Nickerson P. The potential influence of *KIR* cluster profiles on disease patterns of Canadian Aboriginals and other indigenous peoples of the Americas. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**: 1276–80.
- Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H *et al.* Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC Genomics* 2006; **7**: 209.
- Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: D913–9.
- Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: www.allelefrequencies.net. *Tissue Antigens* 2003; **61**: 403–7.
- Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; **367**: 800–11.
- Vidal-Castiñeira JR, López-Vázquez A, Díaz-Peña R *et al.* Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2010; **84**: 475–81.
- Gao X, Jiao Y, Wang L *et al.* Inhibitory *KIR* and specific *HLA-C* gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B. *Clin Immunol* 2010; **137**: 139–46.
- Vejbaesya S, Nonnoi Y, Tanwandee T, Srinak D. Killer cell immunoglobulin-like receptors and response to antiviral treatment in Thai patients with chronic hepatitis C virus genotype 3a. *J Med Virol* 2011; **83**: 1733–7.
- Taniguchi M, Kawabata M. *KIR3DL1/S1* genotypes and *KIR2DS4* allelic variants in the AB *KIR* genotypes are associated with Plasmodium-positive individuals in malaria infection. *Immunogenetics* 2009; **61**: 717–30.
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Semin Immunol* 2008; **20**: 343–52.
- Khakoo SI, Carrington M. *KIR* and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 2006; **214**: 186–201.
- Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N *et al.* Co-evolution of human leukocyte antigen (*HLA*) class I ligands with killer-cell immunoglobulin-like receptors (*KIR*) in a genetically diverse population of sub-Saharan Africans. *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003938.
- Velickovic M, Velickovic Z, Panigoro R, Dunckley H. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Indonesian populations of Sumatra, Sulawesi and Moluccas Islands. *Tissue Antigens* 2010; **76**: 325–30.
- Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D *et al.* Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 2011; **133**: 143–64.
- Jamil KM, Khakoo SI. *KIR/HLA* interactions and pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 298348.
- Hansen DS, D'Ombra MC, Schofield L. The role of leukocytes bearing natural killer complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 416–23.
- Lourembam SD, Sawian CE, Baruah S. Differential association of *KIR* gene loci to risk of malaria in ethnic groups of Assam, Northeast India. *Infect Genet Evol* 2011; **11**: 1921–8.
- Yindom LM, Forbes R, Aka P *et al.* Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by Plasmodium falciparum in The Gambia. *Tissue Antigens* 2012; **79**: 104–13.
- Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K *et al.* Significant association of *KIR2DL3-HLA-C1* combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of *KIR* and *HLA*. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002565.
- Omosun YO, Blackstock AJ, Gatei W *et al.* Differential association of gene content polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors with placental malaria in HIV- and HIV+ mothers. *PLoS One* 2012; **7**: e38617.
- MacRae JI, Maréchal E, Biot C, Botté CY. The apicoplast: a key target to cure malaria. *Curr Pharm Des* 2012; **18**: 3490–504.
- Tran TM, Samal B, Kirkness E, Crompton PD. Systems immunology of human malaria. *Trends Parasitol* 2012; **28**: 248–57.
- Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL *et al.* Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol* 2003; **171**: 5396–405.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladišlau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 2010; **9**: 115PMC2891813.
- Ferreira RG, Moura MM, Engracia V *et al.* Ethnic admixture composition of two western Amazonian populations. *Hum Biol* 2002; **74**: 607–14.
- Fearnside PM. Deforestation in Brazilian Amazonia: history, rates, and consequences. *Conserv Biol* 2005; **19**: 680–8.
- R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. ISBN: 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org/>.
- Single RM, Martin MP, Meyer D, Gao X, Carrington M. Methods for assessing gene content diversity of *KIR* with examples from a global set of populations. *Immunogenetics* 2008; **60**: 711–25.
- A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hardy-Weinberg [homepage on

- the Internet] 2008. <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>.
33. Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes. *Transpl Immunol* 2005; **14**: 135–42.
  34. Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM. Studies on the expression of the deleted KIR2DS4\*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations. *Hum Immunol* 2007; **68**: 128–34.
  35. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; **190**: 40–52.
  36. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens* 2002; **60**: 254–8.
  37. Rivero S, Covas L. The processing and marketing of seeds from the Amazon City of Porto Velho, RO. *J Technol Manag Innov* 2013; **2013**: 321–31.
  38. Bodner M, Perego UA, Huber G et al. Rapid coastal spread of First Americans: novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome Res* 2012; **22**: 811–20.
  39. Ascunce MS, Fane J, Kassu G et al. Mitochondrial diversity in human head louse populations across the Americas. *Am J Phys Anthropol* 2013; **152**: 118–29.
  40. Marangoni A, Caramelli D, Manzi G (2014) Homo sapiens in the Americas. Overview of the earliest human expansion in the New World. *J Anthropol Sci* 2014; **92**: 79–97.
  41. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 2005; **201**: 1025–9.
  42. Körner C, Altfeld M. Role of KIR3DS1 in human diseases. *Front Immunol* 2012; **3**: 326.
  43. Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati MR, Martin MP, Carrington M, Petzl-Erler ML. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics* 2012; **64**: 143–52.
  44. Augusto DG, Piovezan BZ, Tsuneto LT, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML. KIR gene content in Amerindians indicates influence of demographic factors. *PLoS One* 2013; **8**: e56755.
  45. Rudnick CC, Franceschi DS, Marangon AV, Guelsin GA, Sell AM, Visentainer JE. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol* 2008; **69**: 872–6.
  46. Uhrberg M, Parham P, Wemert P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002; **54**: 221–9.
  47. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* 2011; **46**: 216–28.
  48. Yu J, Heller G, Chewning J, Kim S, Yokoyama WM, Hsu KC. Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J Immunol* 2007; **179**: 8570.
  49. Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens* 2013; **82**: 363–73.
  50. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 2008; **180**: 3969–79.
  51. Frazier WR, Steiner N, Hou L, Dakshanamurthy S, Hurley CK. Allelic variation in KIR2DL3 generates a KIR2DL2-like receptor with increased binding to its HLA-C ligand. *J Immunol* 2013; **190**: 6198–208.
  52. Estefanía E, Gómez-Lozano N, Portero F et al. Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens* 2007; **70**: 34–41.
  53. Martin MP, Nelson G, Lee JH et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; **169**: 2818–22.
  54. Mehers KL, Long AE, van der Slik AR et al. An increased frequency of NK cell receptor and HLA-C group I combinations in early-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011; **54**: 3062–70.
  55. MS/SVS/SIVEP Malária – Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância e Saúde/Sistema de informação de Vigilância epidemiológica - Notificação de casos 2014 [internet]. <http://dw.saude.gov.br>.

## Anexo 2 – Termo de consentimento

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Instituições:** Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro; Laboratório Central de Saúde – LACEN, Porto Velho; Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro.

**Coordenadores da Pesquisa:** Dalma Maria Banic e Joseli de Oliveira Ferreira

**Endereço:** Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz; Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar, Av. Brasil 4365 - CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ - Brasil

**Telefones:** 021-3865-8115; 069-3216-5300.

**Nome do Projeto de Pesquisa:** Resposta imune inata na malária por *P. vivax* e *P. falciparum*: seu perfil e sua influência nas infecções e nas respostas imunes adquiridas a antígenos candidatos a compor uma vacina

**Nome do Voluntário:** \_\_\_\_\_

A malária é uma doença transmitida pela picada do mosquito mas pode ser adquirida por meio do contato direto com sangue de uma pessoa infectada (como por exemplo, em transfusões, transplante de órgãos e ainda no compartilhamento de seringas no caso de usuários de drogas injetáveis). Os principais sintomas de malária na sua fase inicial são a febre alta, associada ou não a calafrios, tremores e dor de cabeça, pode ter também, dentre outros sintomas, dores pelo corpo, vômitos, diarreia, dor abdominal, falta de apetite, tonteira e sensação de cansaço.

Não existe vacina para prevenir malária portanto a forma mais eficaz de se proteger é evitar o contato com o mosquito. Entre as principais medidas de proteção estão o uso de cortinados sobre a cama ou rede; telas em portas e janelas, inseticidas no ambiente onde se dorme e uso de repelente no corpo. É importante evitar frequentar locais próximos a criadouros naturais, como beiras de rios ou áreas alagadas, no final de tarde, início da noite e nas primeiras horas da madrugada.

A malária é uma doença que tem cura, mas pode evoluir em alguns indivíduos para suas formas graves em poucos dias se não for diagnosticada e tratada rapidamente. Pelo presente documento, você está sendo convidado a participar de uma investigação a ser realizada na Fundação Oswaldo Cruz, com o objetivo de avaliar como o organismo do indivíduo reage à malária em diferentes períodos da doença e quais os componentes do sangue (plasma, células e produtos secretados por elas) estão envolvidos na melhora da doença.

Esse documento procura esclarecê-lo sobre o problema de Saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. Caso você necessite de alguma informação ou esclarecimento durante o período em que estiver participando do estudo, procure Dra. Fatima Santos no Laboratório Central de Saúde – LACEN, Secretaria de Estado da Saúde, Rua Anita Garibaldi 4130, Bairro Costa Silva, Porto Velho, Rondônia, telefone: 321 65300.

A sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode recusar-se a participar de uma ou de outras etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade. O seu atendimento no posto de Saúde não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo.

A sua participação com relação ao projeto consiste em autorizar a realização de exames para avaliar a evolução da sua doença e que esse material seja utilizado neste estudo. Também será necessária a autorização para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como objetivo a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos de diagnóstico; avaliação da resposta a antígenos candidatos a uma vacina etc. desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do médico e comparecer ao Posto de Saúde nas datas marcadas.

Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade. Entretanto, se necessário, os registros médicos estarão disponíveis para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento.

**Procedimentos, exames e testes que serão utilizados**

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença através de uma entrevista detalhada e preenchimento de um questionário por um membro da equipe, exame médico e coleta de sangue para realização de vários exames (distensão e gota espessa para diagnóstico, hemograma completo, testes imunológicos, tipagem de células e produtos secretados por elas, entre outros). Para isto será necessária a coleta 30mL de sangue por via endovenosa em três ocasiões: no dia do diagnóstico antes do tratamento (D0), 15 dias (D15) e 30 (D30) dias após o diagnóstico. A retirada do sangue poderá ser feita por um médico, farmacêutico ou biólogo da equipe de investigadores. Todos os indivíduos serão tratados para malária logo após a coleta de sangue e acompanhados para verificação de cura após tratamento.

**Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:**

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros.

**Formas de ressarcimento**

Quando necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecido um lanche.

**Benefícios esperados**

Os resultados desse estudo poderão não beneficia-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Nome do voluntário**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Nome do Pesquisador**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Testemunha 1<sup>1</sup>**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Testemunha 2<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Apenas no caso de voluntários impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.

<sup>2</sup> Apenas no caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.



### Anexo 3 – Questionários dos dados epidemiológicos

REGISTRO No

**PROJETO:** Resposta imune inata na malária por *P. vivax* e *P. falciparum*: seu perfil e sua influência nas infecções e nas respostas imunes adquiridas a antígenos candidatos a compor uma vacina

#### DADOS PESSOAIS

<b>NOME:</b>	<b>SEXO:</b> <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	
<b>IDADE:</b>	<b>NATURALIDADE:</b>	<b>PROCEDÊNCIA:</b>
<b>ENDEREÇO ATUAL:</b>		
<b>NÚMERO DE RESIDENTES NO ENDEREÇO ATUAL:</b>		
<b>PROFISSÃO:</b>		

#### Tempo de residência

Área endêmica (anos) :      Rondônia (anos):      Endereço atual:

#### HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

##### NÚMERO DE INFECÇÕES ANTERIORES DE MALÁRIA:

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma       Não lembra

##### NÚMERO DE INFECÇÕES ESSE ANO (2004):

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma       Não lembra

##### DATA DA ÚLTIMA INFECÇÃO:

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma       Não lembra

##### LOCAL PROVAVEL DE INFECÇÃO:

**FEZ O TRATAMENTO COMPLETO?:**  Sim       Não

**JA FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA:**  Sim       Não      Data:

**MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA:**  Sim       Não      Data:      **OBS:**

**TEM ALGUÉM NA FAMÍLIA COM MALÁRIA OU TEVE MALÁRIA RECENTEMENTE?**  Sim  Não

## EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

### LOCALIZAÇÃO DA CASA

Floresta       Coleção d'água       Nenhuma

### TIPO DE CASA (proteção em relação ao contato com mosquito)

Boa  Parcial       Nenhuma

### ATIVIDADES AO AMANHECER:

### ATIVIDADES AO ANOITECER:

### SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA?

Sim     Não     Foi informado mas não acredita

### COMO?:

### USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS

Mosquiteiro     Inseticida     antimaláricos     Outras     Nenhuma

Data da última borrifação de inseticida (FNS):

## INFECÇÃO ATUAL

### SINTOMAS

Febre     Cefaleia     Calafrios     Náusea     Mialgia     Nenhum

### DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:

### DIAGNÓSTICO

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma

### PARASITEMIA:

### LOCAL PROVAVEL DE INFECÇÃO:

RECEBEU TRANSFUÇÃO DE SANGUE ? :  Sim     Não      Data:

ÉDOADOR DE SANGUE?:  Sim     Não      Data da última doação:

## COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

GOTA ESPESSA     ESFREGAÇO     PLASMA

CÉLULAS       HLA       PARASITOS

OBS

## Anexo 4 – Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 27 de outubro de 2006.

Carta: 055/06


De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Dalma Maria Banic e  
- Dra. Claude Pirmez

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo 354/06 intitulado "Resposta imune inata na malária por *P.vivax* e *P.falciparum*: seu perfil e sua influência nas infecções e nas respostas imunes adquiridas a antígenos candidatos a compor uma vacina" que está com **APROVADO**.

Atenciosamente

  
MARCIA OLIVEIRA NETO  
Secretaria Geral  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Oswaldo Cruz