

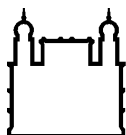
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA A PROTEÍNA CIRCUMSPOROZOITA
(CS) DE *PLASMODIUM VIVAX* E DE SUAS VARIANTES E A INFLUÊNCIA DE
POLIMORFISMOS GÊNICOS HUMANOS NA MODULAÇÃO DESSA RESPOSTA**

VIRGINIA ARAUJO PEREIRA

Rio de Janeiro
Julho de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

VIRGINIA ARAUJO PEREIRA

Resposta imune humoral contra a proteína circumsporozoíta (CS) de *Plasmodium vivax* e de suas variantes e a influência de polimorfismos gênicos humanos na modulação dessa resposta

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

Orientador (a): Prof. Dr. Joseli de Oliveira Ferreira

RIO DE JANEIRO

Julho de 2018

Araujo Pereira, Virginia.

RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA A PROTEÍNA CIRCUMSPOROZOITA (CS) DE *PLASMODIUM VIVAX* E DE SUAS VARIANTES E A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GÊNICOS HUMANOS NA MODULAÇÃO DESSA RESPOSTA / Virginia Araujo Pereira. - Rio de Janeiro, 2018.

137 f.; il.

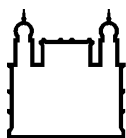
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Joseli De Oliveira Ferreira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax*. 3. Proteína CS. 4. Soroprevalência. 5. Imunogenética. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: VIRGINIA ARAUJO PEREIRA

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA A PROTEÍNA CIRCUMSPOROZOITA
(CS) DE *PLASMODIUM VIVAX* E DE SUAS VARIANTES E A INFLUÊNCIA DE
POLIMORFISMOS GÊNICOS HUMANOS NA MODULAÇÃO DESSA RESPOSTA**

ORIENTADOR (A): Prof. Dr. JOSELI DE OLIVEIRA FERREIRA

Aprovada em: 05/07/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maria de Fátima Ferreira da Cruz - *Presidente* (IOC-Fiocruz)

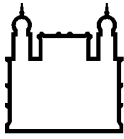
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado (UFF)

Prof. Dr. Lilian Rose Pratt Riccio (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva (Biomanguinhos-Fiocruz)

Prof. Dr. Patrícia Fampa Negreiros Lima (UFRRJ)

Rio de Janeiro, 05 de julho de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

**Este trabalho é dedicado à pesquisa
científica devotada a ajudar milhares
de pessoas que são afligidas pela
malária**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Joseli de Oliveira Ferreira, por todas as suas críticas construtivas e dedicação. Muito obrigado pela confiança e pela oportunidade que me deu de desenvolver este trabalho;

Ao Dr Josué, que me acompanhou desde minha iniciação científica, com amizade, bons conselhos e tantas contribuições científicas;

Ao amigo, padrinho e companheiro de trabalho, Juan Camilo pela amizade, pela parceria, pelas risadas, e por estar sempre disposto a me ajudar;

À amiga, madrinha e conselheira Danielly pela amizade, pelos almoços com gostinho de lar e pelas melhores terapias sempre acompanhadas por um cafezinho;

À amiga e melhor companheira Alinne, por conversas intermináveis e tantas risadas que fizeram nossos dias de trabalho mais leves;

Ao amigo Rodrigo pela amizade, pelas risadas e por tantas dicas científicas;

Aos meus amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, em especial Rafaela, Isabela, Thaize e Clarissa pelas conversas e almoços tão divertidos e renovadores;

Às alunas Arethuza e Lorene pela disposição em aprender e me ensinar a contribuir na formação e pensamento científico de vocês;

Ao meu marido Geovany pela sua cumplicidade, seu amor, carinho, compreensão e por acreditar que sou capaz e me ensinar que ser uma boa profissional é sempre buscar o melhor;

À minha tia Mariza, por sua dedicação materna, amor e confiança, e por estar sempre perto quando preciso de uma palavra ou um abraço;

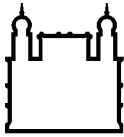
À minha irmã Tatiana, por me incentivar e mesmo distante sempre ser um exemplo para mim;

À minha querida família sempre presente em minha vida pelo amor incondicional, pelo carinho e apoio e por compreenderem minha ausência.

A todos que colaboraram de alguma forma para que este trabalho fosse possível.

**“O maior inimigo do conhecimento não
é a ignorância, mas a ilusão do
conhecimento.”**

(Stephen Hawking)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA A PROTEÍNA CIRCUMSPOROZOITA (CS) DE *PLASMODIUM VIVAX* E DE SUAS VARIANTES E A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GÊNICOS HUMANOS NA MODULAÇÃO DESSA RESPOSTA

RESUMO

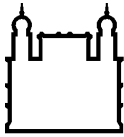
TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Virginia Araujo Pereira

A malária no Brasil teve grande redução no número de casos nos últimos anos, porém as conquistas alcançadas podem ser comprometidas se as ações de vigilância e controle não forem fortalecidas. O *Plasmodium vivax*, espécie predominante no Brasil, permanece um desafio para essas ações devido a possibilidade de recaída e falta de diagnóstico dos estágios hepáticos inativos (hipnozoítos), e parasitemia assintomática. A sorologia para a proteína circumsporozoíta (CS) do *P. vivax* tem sido utilizada como indicador de transmissão e exposição recente à malária, contudo os dados são discordantes. Além disso, a aquisição natural de anticorpos para antígenos plasmodiais pode estar associada à presença de polimorfismos nos genes que regulam a resposta imune do hospedeiro. O objetivo desse estudo foi caracterizar a resposta imune humoral naturalmente adquirida contra a proteína CS de *P. vivax*, avaliar a influência de polimorfismos no sistema HLA e nos genes de IFN- γ , IL-10 e da iNOS na modulação da resposta, e verificar se a soroprevalência para a proteína CS de *P. vivax* poderia ser uma boa ferramenta para monitorar a exposição e a distribuição das espécies plasmodiais. Foram avaliados voluntários de Porto Velho, Rondônia, diagnosticados por microscopia e PCR. Sequenciamento genômico das amostras determinou as variantes de *P. vivax*. Testes de ELISA, Luminex e Reação de Griess foram utilizados para dosagem de IgG e subclasses, das citocinas e do NO, respectivamente. Os polimorfismos das citocinas e iNOS foram detectados por PCR e a tipagem do HLA utilizando Luminex® xMAP®. Os resultados demonstraram que a prevalência de IgG para a CS de *P. vivax* (62%) foi maior do que para *P. falciparum* (49%) e *P. malariae* (46%), e 28% da população exposta à infecção não teve anticorpos detectados para nenhum dos peptídeos testados. Os níveis de anticorpos IgG para a PvCS foram inferiores quando comparados aos níveis de IgG contra antígenos de estágios sanguíneos de *P. vivax* (AMA-1 e MSP-1), os quais apresentaram aumento nos níveis de IgG na presença da infecção. Indivíduos portadores dos haplótipos DRB1*07~DQB1*02 e DRB1*04~DQB1*03 apresentaram maior frequência de respondedores para a PfCS e dos haplótipos DRB1*16~DQB1*03 para PfCS e PvCS. Em contraste os portadores dos alelos HLADRB1*01 e HLA-DQB1*05 apresentaram uma maior frequência de não-respondedores para PvCS, PfCS e PmCS. A avaliação da proporção genotípica dos polimorfismos de IFN- γ , IL-10 e NO evidenciou que a presença do alelo C dos SNPs

IL10A-592A/C e *-819T/C* estava associada com baixos níveis de IL-10 e de parasitemia, e com aumento de resposta de IgG para a CS da variante *P. vivax-like*. Dentre as variantes de *P. vivax*, a VK210 foi a infecção predominante, e a prevalência de IgG para as variantes foi 80,7% para VK210, 68,3% para VK247 e 65,6% para *P. vivax-like*. A soroprevalência contra as repetições da proteína CS mostrou que em áreas de baixa transmissão, os anticorpos naturalmente adquiridos quantificados em um único estudo transversal parecem não ser uma boa ferramenta para monitorar a transmissão à malária.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, Proteína CS, Soroprevalência, Imunogenética.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST *PLASMODIUM VIVAX* CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN (CS) AND VARIANTS AND THE INFLUENCE OF HUMAN GENE POLYMORPHISMS ON THE MODULATION OF THIS RESPONSE

ABSTRACT

PhD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Virginia Araujo

Malaria in Brazil has greatly reduced the number of cases in recent years, but achievements can be compromised if vigilance and control actions are not strengthened. *Plasmodium vivax*, a predominant species in Brazil, remains a challenge for these actions due to the possibility of relapse and lack of diagnosis of the inactive hepatic stages (hypnozoites), and asymptomatic parasitemia. Serology for *P. vivax* circumsporozoite (CS) protein has been used as an indicator of recent transmission and exposure to malaria, however the data are discordant. In addition, the natural acquisition of antibodies to plasmodial antigens may be associated with the presence of polymorphisms in the genes that regulate the host immune responses. The aim of this study was to characterize the naturally acquired humoral immune response against *P. vivax* CS protein, to evaluate the influence of polymorphisms in the HLA system and the IFN- γ , IL-10 and iNOS genes on response modulation, and to verify if the seroprevalence for *P. vivax* CS protein could be a good tool to monitor the exposure and distribution of plasmodial species. Volunteers from Porto Velho, Rondônia, diagnosed by microscopy and PCR were evaluated. Genomic sequencing of the samples determined the *P. vivax* variants. ELISA, Luminex and Griess Reaction tests were used for the determination of IgG and subclasses, cytokines and NO, respectively. Cytokine and iNOS polymorphisms were detected by PCR and HLA typing using Luminex® xMAP®. The results showed that prevalence of IgG for CS of *P. vivax* (62%) was higher than *P. falciparum* (49%) and *P. malariae* (46%), and 28% of the population exposed to infection had no antibodies detected to none of tested peptides. IgG antibodies levels to PvCS were lower when compared to *P. vivax* blood stages IgG levels (AMA-1 and MSP-1), which showed an increase in IgG levels in presence of infection. Individuals with the haplotypes DRB1*07~DQB1*02 and DRB1*04~DQB1*03 had a higher frequency of responders for PfCS and with the haplotypes DRB1*16~DQB1*03 for PfCS and PvCS. In contrast, carriers of the HLADRB1*01 and HLA-DQB1*05 alleles had a higher frequency of non-responders for PvCS, PfCS and PmCS. The evaluation of the IFN- γ , IL-10 and iNOS polymorphisms genotypic proportion showed that C allele presence of IL-10A-592A/C and -819T/C SNPs was associated with low levels of IL-10 and parasitemia, and with increased IgG response to CS of the *P. vivax-like* variant. Among the variants of *P. vivax*, VK210 was the predominant infection, and the prevalence of IgG for the variants was 80.7% for VK210, 68.3% for VK247 and

65.6% for *P. vivax-like*. Seroprevalence against CS protein repeats showed that in areas of low transmission, naturally acquired antibodies quantified in a single cross-sectional study seems not to be a good tool to monitor transmission to malaria.

Key Words: Malaria, *Plasmodium vivax*, CS Protein, Soroprevalence, Immunogenetic.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão Bibliográfica	1
1.1.1 Aspectos gerais da malária	1
1.1.2 História da pesquisa em malária	2
1.1.3 Distribuição global da malária	4
1.1.4 Situação da malária no Brasil	6
1.1.5 Ciclo de vida do plasmódio	9
1.1.6 Resposta imunológica na malária	13
1.1.7 Proteína circumsporozoíta: um alvo imunogênico relevante	16
1.1.8 Influência de polimorfismos na malária	21
1.2 Justificativa	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 RESULTADOS	35
3.1 Artigo 1	35
3.2 Artigo 2	48
4 RESULTADOS COMPLEMENTARES	61
4.1 Materiais e Métodos	61
4.1.1 População de Estudo	61
4.1.2 Sequenciamento genômico para o diagnóstico das variantes de <i>P. vivax</i>	61
4.1.3 Dosagem de anticorpos IgG	62
4.1.4 Dosagem de citocinas e óxido nítrico e Detecção dos polimorfismos	63
4.1.5 Análise estatística dos dados	64
4.2 Resultados	64

4.2.1	Caracterização da população de estudo.....	64
4.2.2	Prevalência e níveis de IgG contra as proteínas PvAMA-1, PvMSP-1 ₁₉ e PvCS.....	65
4.2.3	Prevalência e níveis de IgG e subclasses contra a CS das variantes de <i>P. vivax</i>	66
4.2.4	Associação do diagnóstico da malária e a resposta humoral.....	69
4.2.5	Frequência dos polimorfismos	70
4.2.6	Influência dos SNPs na resposta contra a PvMSP-1 ₁₉ , PvAMA-1 e PvCS	72
4.2.7	Influência dos SNPs na resposta contra as variantes de <i>P.</i> <i>vivax</i>	74
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA	110
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO	111
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de transmissão de malária no mundo.	5
Figura 2. Variação no número de casos de malária no Brasil.....	8
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium spp</i>	10
Figura 4. Formação de hipnozoítos de <i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i>	11
Figura 5. Resposta imune aos estágios do parasito.....	15
Figura 6. Aquisição de imunidade em área endêmica.	16
Figura 7. Estrutura da proteína circumsporozoíta.	18
Figura 8. Mudança conformacional da proteína CS.	20
Figura 9. Níveis de anticorpos IgG específicos e de subclasses de IgG contra PvMSP-1 ₁₉ , PvAMA-1 e PvCS.	66
Figura 10. Prevalência e índices de reatividade de anticorpos IgG adquiridos naturalmente contra as repetições da CS das variantes de <i>P. vivax</i>	67
Figura 11. Prevalência e índices de reatividade de subclasses de IgG adquiridos naturalmente contra as repetições da CS das variantes de <i>P. vivax</i>	68
Figura 12. Frequência e níveis de IgG nos grupos Malária (+) e Malária (-).	69
Figura 13. Prevalência e índice de reatividade das subclasses de IgG para as proteínas de <i>P. vivax</i> nos grupos Malária (+) e Malária (-).....	70
Figura 14. Distribuição dos SNPs na população de estudo.	71
Figura 15. Níveis de IgG contra os antígenos de <i>P. vivax</i> de acordo com os genótipos encontrados na população.....	76
Figura 16. Níveis de IgG contra as variantes de <i>P. vivax</i> de acordo com os genótipos encontrados na população.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos de malária na Amazônia Legal (2017).....	8
Tabela 2. Associação de alelos de HLA e da resposta humoral contra antígenos de <i>P. vivax</i>	24
Tabela 3. SNPs envolvidos na resposta imune da malária.....	26
Tabela 4. Prevalência de IgG e subclasses para PvMSP-1 ₁₉ , PvAMA-1 e PvCS.....	65
Tabela 5. Distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos nos grupos respondedores e não-respondedores para as proteínas PvCS, PvMSP-1 ₁₉ e PvAMA-1.....	73
Tabela 6. Distribuição dos SNPs para os indivíduos respondedores e não-respondedores para a CS das variantes de <i>P. vivax</i>	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCI	Inibição celular dependente de anticorpos
AMA-1	antígeno de membrana apical
APC	células apresentadoras de antígeno
CD4	Cluster de diferenciação 4
CD8	Cluster de diferenciação 8
CS	Circumsporozoíta
CSP	Proteína Circumsporozoíta
DBP	Proteína ligada ao antígeno sanguíneo do grupamento Duffy/ <i>Duffy binding protein</i>
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribunocléico
EBP	proteínas de merozoíto ligadas ao eritrócito
EEF	Formas exo-eritrocíticas
eNOS/NOS3	Óxido nítrico sintase endotelial
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos/ <i>Hepatic growth factor</i>
HLA	Sistema antígeno leucocitário humano/ <i>Human leucocyte antigen</i>
IFNG	Gene interferon gamma
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
IL10A	Gene interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-22	Interleucina 22
LSP	Peptídeo sintético longo/ <i>Long synthetic peptide</i>

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade/ <i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	Fator inibitório de migração dos macrófagos/ <i>Migration inhibitory factor</i>
MSP	Proteína de superfície de merozoítos/ <i>Merozoite surface protein</i>
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica/ <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Célula Natural killer
NKT	Célula Natural killer T
nNOS/NOS1	Óxido nítrico sintase neuronal/ <i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Óxido nítrico/ <i>Nitric Oxide</i>
NOS2A	Gene óxido nítrico sintase induzida
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PNCM	Plano Nacional de Controle à Malária
RI/RII	Região I/II
RBP	Proteína de ligação ao reticulócito/ <i>Reticulocyte binding protein</i>
ROS	Radicais livres de oxigênio
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo/ <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
Th1/2	T helper 1/2
TNF	Fator de necrose tumoral/ <i>Tumoral necrose factor</i>
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina/ <i>Thrombospondin-related anonymous protein</i>
TSR	Sequência de repetição de trombospondina/ <i>Thrombospondin sequence repeat</i>
VMP001	Proteína de malária vivax 001

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Aspectos gerais da malária

A malária é uma doença parasitária de elevada prevalência em regiões que possuem o clima tropical e subtropical e em países localizados perto da linha do Equador. A doença afeta a humanidade desde a pré-história, já tendo recebido os nomes de maleita, impaludismo, paludismo e febre terçã ou quartã. O parasita causador da doença pertence ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Aconoidazida, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Gênero *Plasmodium*. Existem cerca de 120 espécies de *Plasmodium* que podem infectar aves, répteis, roedores e primatas. Entre estas, cinco espécies plasmodiais apresentam uma ameaça significativa para a saúde humana: *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e *Plasmodium knowlesi* (Knowles & Das Gupta, 1932). Este último é um parasito simiano, porém recentemente descrito como causador de infecções em humanos (1). As espécies mais prevalentes no mundo são o *P. falciparum* e o *P. vivax*, sendo ambas responsáveis por 95% das infecções da malária humana (2). Esses protozoários são transmitidos naturalmente ao homem pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*, destacando-se *Anopheles gambiae* e *Anopheles darlingi* como principais vetores. Devido a condição de hemoparasito do plasmódio, a transmissão da malária também pode ocorrer de forma induzida ou congênita, ambas raramente relatadas.

A princípio, todo ser humano é susceptível à infecção malárica, mesmo aqueles que já a contraíram por diversas vezes. Entretanto, a gravidade da malária depende da relação entre o hospedeiro (vulnerabilidade e estado imunológico) e o *Plasmodium* spp. (espécie infectante e densidade parasitária). Em geral, indivíduos não imunes apresentam paroxismos febris que se iniciam com calafrios acompanhados de náusea, vômito, cefaleia e dores musculares e articulares.

O relatório anual de malária da Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2016, 91 países relataram um total de 216 milhões de casos de malária, um aumento de 5 milhões de casos em relação ao ano anterior. A doença levou 445.000

pessoas à morte no mesmo ano, mortalidade elevada que indica como a malária continua a causar grande impacto na saúde pública (3). Cerca de 4% de todos os casos de malária relatados no mundo foram causados pelo *P. vivax*, mas nas Américas essa proporção foi de 69% e no Brasil, o *P. vivax* foi responsável por 89% dos casos de malária, que em sua maioria ocorreram na região Amazônica, com cerca de 190 mil casos notificados em 2017 (SIVEP-Malária).

1.1.2 História da pesquisa em malária

Ainda que a existência de um parasita ancestral do gênero *Plasmodium* desde o período Cretáceo (4) tenha sido revelada só recentemente, a pesquisa no campo da malariologia é bem antiga. Descrições de sintomas da malária já foram observadas em diversas culturas, e seus registros remontam à Antiguidade. Dentre os mais antigos estão escritos chineses e egípcios de 3.000 anos a.C. Esses escritos relacionavam febres agudas à punição do deuses e presença de maus espíritos. Relatos semelhantes foram encontrados na Mesopotâmia e na Índia, datados de tábuas mesopotâmicas 2.000 anos a.C. e 1.800 anos a.C., respectivamente. Na Grécia do século V a.C., Hipócrates descreveu o quadro clínico e as complicações da malária, descartando as superstições que eram atribuídas à doença. Ao longo da Idade Média (século V) a malária se propagou pela Europa, atingindo gravemente o Império Romano. Por isso, a doença se tornou tema de narrativas deste período, relacionando a água parada das regiões de pântanos e alagadiços que cercavam o império com os quadros febris durante a estação de verão. Assim, acreditavam que a causa era o ar insalubre dos miasmas (emanação proveniente de substâncias animais ou vegetais em decomposição) presente nessas regiões pantanosas, denominando essas febres como “mal aire”, do italiano “mau ar”. Em consequência, os romanos construíram grandes sistemas de drenagem para eliminar a causa da malária, porém esses sistemas foram destruídos após a queda do Império Romano na invasão dos bárbaros que também se tornaram vítimas da malária, sendo grande parte dos exércitos devastados pela doença. No século XVI, a malária chega ao Novo Mundo pelos colonizadores, e no século seguinte, os jesuítas descobrem que os índios utilizavam a casca de árvores nativas (*Cinchona* spp.) como cura de doenças febris, denominando este tratamento de Cinchona, que em forma de pó era conhecido como o “pó dos jesuítas”. Em 1820, que o princípio ativo deste pó, a quinina, foi isolado por Petellentier e Caventour que tem sido utilizada por muitos anos no tratamento e na prevenção da malária (5,6).

A pesquisa em malária teve seu grande marco em 1880, quando o médico francês Charles Alphonse Laveran, conseguiu visualizar pela primeira vez o parasita microscópico dentro das células do sangue de um paciente com malária, que lhe rendeu o Prêmio Nobel de medicina em 1907. A partir desta descoberta o modo de transmissão e ciclo do parasita foram esclarecidos ainda no século XIX. Em 1886, Camillo Golgi elucidou o ciclo do parasito nos glóbulos vermelhos, associando os calafrios e febre intermitente com a ruptura e liberação do parasito na circulação sanguínea e relacionando a patogênese da doença com a presença de uma toxina liberada pelo amadurecimento do parasito nas células sanguíneas (7). Em 1897, o inglês Ronald Ross descobriu que o mosquito do gênero *Anopheles* era o agente transmissor, transmitindo o parasito de uma pessoa a outra, o que explicava a ocorrência da doença próximo a lugares pantanosos e alagadiços, propícios criadouros de mosquitos (6,8,9). Por sua descoberta, Ross também foi agraciado com o Prêmio Nobel de medicina em 1902. A partir da observação das febres intermitentes feita por Camillo Golgi, Julius Wagner von Jauregg, professor de psiquiatria e neurologia em Viena, desenvolveu a malarioterapia em 1917, um método de tratamento para estágios avançados da neurosífilis inoculando parasitos da malária a partir da observação de que indivíduos com quadro de febre alta poderiam ser curados da sífilis (10). Jauregg recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1927. Isto porque o tratamento funcionava e apresentava risco considerável, visto que no método era induzida a malária pelo parasita menos agressivo, o *P. vivax*, e a doença podia ser tratada posteriormente com quinino. Durante a guerra, com a dificuldade no fornecimento de quinino, pesquisadores alemães desenvolveram os antimaláricos sintéticos pamaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934). Em 1948, o químico Paul Muller recebe o Prêmio Nobel de medicina pelo desenvolvimento de um poderoso inseticida em 1942, o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), de grande potência e atividade residual, além de baixo custo, sendo um trunfo para a erradicação da malária e salvando milhares de vidas durante e após a II Guerra Mundial.

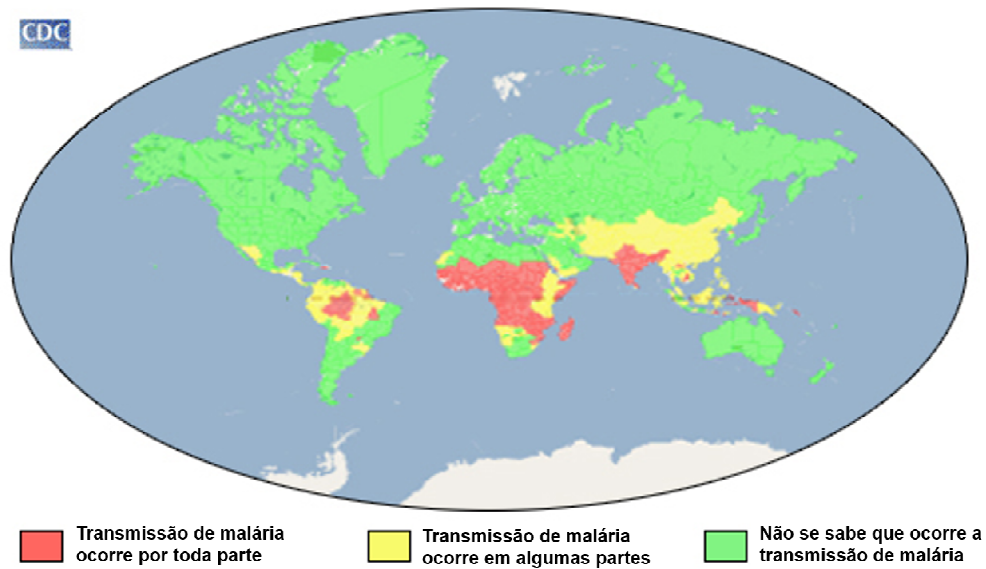
A descoberta do DDT trouxe otimismo em relação a doenças transmitidas por mosquitos, como a malária. Assim, na Oitava Assembleia Mundial de Saúde em 1955 foi aprovada uma resolução para que os países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS) buscassem a erradicação da malária, campanha que representaria um modelo de saúde pública. Apesar de ter conseguido grandes avanços reduzindo em 53% o risco da doença nas populações de áreas endêmicas,

a intervenção tem se revelado muito mais complexa e desafiadora. As razões da falta de êxito da Campanha incluem planejamento inadequado, redução da vigilância no programa de controle, aumento do custo do inseticida, resistência do mosquito ao DDT e do parasita aos antimaláricos, e um financiamento insuficiente. Visto que os parasitos da malária desenvolviam resistência aos fármacos, na busca por novas drogas potenciais, Youyou Tu sintetizou em 1973 a dihidroartemisinina, um derivado potente da *Artemisia annua*. A descoberta da artemisinina salvou milhares de vidas no mundo todo, rendendo mais um Nobel por avanços na pesquisa em malária (11). Atualmente, como consequência de ações insuficientes, observa-se um retorno maciço da malária que hoje afeta 91 países, de modo que são necessários esforços no controle da morbidade e mortalidade, pesquisa de fármacos e inseticidas mais eficientes, e desenvolvimento de uma vacina eficaz.

1.1.3 Distribuição global da malária

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2016, 91 países localizados nas zonas tropicais e subtropicais notificaram transmissão da malária, atingindo cerca de 3,2 bilhões de pessoas em todo o mundo. As áreas afetadas possuem níveis endêmicos diferentes, de acordo com a variedade e intensidade dos fatores de risco (biológicos, ambientais e socioeconômicos) (Figura 1). As principais vítimas de malária tendem a ser de populações com baixas condições socioeconômicas que vivem em áreas rurais, com acesso limitado a diagnóstico, tratamento e formas de prevenção.

Figura 1. Áreas de transmissão de malária no mundo.



Fonte: CDC, 2017.

As espécies plasmodiais causadoras da doença estão dispersas ao redor do mundo, com maior ocorrência de casos por *P. falciparum* e *P. vivax*. Na África Subsaariana 99% dos casos são infecções por *P. falciparum* e as infecções por *P. vivax* são reduzidas devido à alta frequência de indivíduos Duffy negativos que geralmente são resistentes à infecção por *P. vivax*, já que antígenos do grupo sanguíneo Duffy são importantes para que o *P. vivax* infecte os eritrócitos (12). Fora do continente africano, o *P. vivax* é a espécie predominante na Região das Américas (64% dos casos) e é a responsável por mais de 30% dos casos no Sudeste Asiático e por 40% nas regiões do Mediterrâneo Oriental.

De 2010 até 2015 o número de casos confirmados da malária diminuiu. Em 2015 notificações da transmissão da doença foram relatadas em 95 países, dos quais 4 não registraram nenhuma infecção em 2016. Sri Lanka e Quirguistão já receberam a certificação da OMS como países livres da malária, e Argentina e Paraguai estão no processo para solicitação do certificado de eliminação. Contudo após progresso no controle da malária, estima-se que em 2016 houve 5 milhões de casos a mais da doença, quando comparado ao ano anterior, e 216 milhões de casos foram registrados. Já o número de óbitos por conta da infecção foi similar em 2015 e 2016, com 445 mil pessoas falecidas. Apesar do continente africano ainda concentrar cerca de 90% do total de casos e mortes pela doença, a taxa de novos

casos de malária apresentou um aumento percentual maior na Região das Américas (36%), onde a incidência começou a subir em 2013, principalmente, devido ao aumento no Brasil e na Venezuela (3).

A Estratégia Técnica Global da OMS para a Malária prevê reduções de pelo menos 40% na incidência de casos e mortalidade até o ano de 2020. Dentre os 35 países que compõem as Américas, 18 são considerados áreas endêmicas de malária e 12 estão no caminho de alcançar a 40% de redução dos casos. Em contrapartida, dez países das Américas relataram um aumento no número de casos da doença em 2016 (Colômbia, Equador, El Salvador, Haiti, Honduras, Nicarágua, Panamá e Venezuela) e em 2017 (Brasil, Equador, México, Nicarágua e Venezuela). Por essa razão, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) recomendou aos países dessa região que fortaleçam suas ações de vigilância e controle da malária, alertando sobre o risco de surtos, aumento de casos e mortes nas áreas endêmicas, e até a reintrodução de casos em áreas nas quais não ocorria mais transmissão (13). Os programas de controle da malária vêm se intensificado e conseguiram reduzir a incidência global em 18% entre 2010 e 2016. De acordo com o último relatório de malária da OMS, o mundo ainda está longe de alcançar as metas globais traçadas nos planos de controle, porém de 2000 a 2015 estima-se que 6,2 milhões de pessoas foram salvas, a maioria (5,9 milhões) crianças menores de 5 anos de idade. Contudo foi notável o aumento no número de casos relatados no último ano. Sendo assim, os esforços estão direcionados na busca por progressos fundamentais no controle da malária e será preciso vontade política, novos remédios, métodos de controle dos vetores e inovações tecnológicas como vacinas para proteger e salvar as vidas que vêm sendo perdidas anualmente por conta da doença.

1.1.4 Situação da malária no Brasil

Atualmente, o Brasil representa 18% dos 562.800 casos de malária relatados em toda a região das Américas, atrás apenas da Venezuela com 34,4% dos casos. Foram registrados 193.839 casos de malária no Brasil no ano de 2017, representando um aumento de 34% no número de casos comparado ao ano anterior (SIVEP-Malária, SVS). O país já apresentou índices muito mais elevados na sua história, com registro de duas grandes epidemias, uma em meados de 1870 e outra na década de 1940, atingindo entre 80 e 90% da população brasileira em várias localidades. No início da década de 60, o Brasil adotou a estratégia de erradicação

da malária preconizada pela OMS e atingiu os índices mais baixos da doença, que ficou restrita, quase que exclusivamente, à Região Amazônica. Entretanto, os casos de malária notificados aumentaram progressivamente devido a movimentos migratórios e às atividades de mineração incentivadas por diversos órgãos governamentais, tendo sido registrado um aumento importante no número de casos nos anos de 1998 e 1999 (14).

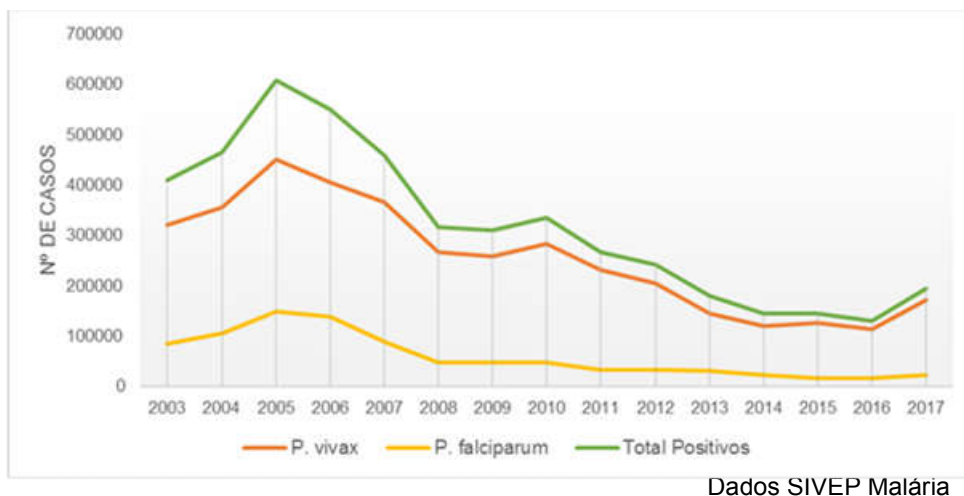
Em julho de 2000, diante da grave situação da malária no país, foi lançado pelo Ministério da Saúde o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) na Região Amazônica, com meta de reduzir em 50% os casos da doença até o final do ano de 2001. A estratégia estava centrada na mobilização política e na estruturação dos sistemas locais de saúde, capacitando-os para a coordenação e execução das ações de controle da malária e, desta forma, fortalecer o processo de descentralização e garantir sua sustentabilidade. Apesar dos bons resultados obtidos com o PIACM, a redução observada no período de 1999 a 2001 não ocorreu de forma homogênea. O maior percentual de decréscimo registrou-se no estado do Amazonas (71%), seguido do Acre (67%), enquanto que nos estados de Rondônia e Amapá a redução foi de 9% e 15%, respectivamente.

Na perspectiva de manter a malária em números aceitáveis no Brasil como os observados na década de 1970 (IPA 3,9/1.000) e dar continuidade aos avanços proporcionados pelo PIACM, foi então criado o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Essas ações, juntamente com implementações no tratamento, afetaram as frequências das duas principais espécies plasmodiais presentes no país, *P. falciparum* e *P. vivax*, reduzindo o número de casos por *P. falciparum* drasticamente. Até os dias atuais, *P. vivax* ainda é a espécie plasmodial prevalente no Brasil, representando 88,3% dos casos em 2017, e causando morbidade importante que afeta as comunidades endêmicas. No país, 99% dos casos são por infecções por *P. vivax* e/ou *P. falciparum*, enquanto infecções por *P. malariae* são encontradas em um percentual reduzido (0,01%) (SIVEP-Malária).

Conforme demonstrado na Figura 2, apesar dos avanços expressivos alcançados com as medidas de controle adotadas, o número de casos de malária volta a crescer a partir de 2003. Este aumento foi atribuído a ocupações desordenadas, mudanças climáticas e a atividades como extração de madeira, agricultura e mineração. Nos últimos anos houve uma redução constante e significativa na incidência de malária, porém os dados de 2017 são preocupantes

porque mostraram uma nova expansão da doença que é atribuída pelo Ministério da Saúde as mudanças climáticas e ao próprio ciclo da doença (15).

Figura 2. Variação no número de casos de malária no Brasil.



Estima-se que 98% do total de casos relatados no país são autóctones e registrados, em sua maioria, na Amazônia Legal, região que inclui nove estados do território nacional: Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, com distribuição heterogênea dos casos. Os estados do Amazonas, Pará, Acre, Amapá e Roraima apresentaram os maiores índices de casos de malária em 2017. Em Roraima, 8% do total de casos de malária registrados são casos importados da Venezuela (Tabela 1) (16).

Tabela 1. Número de casos de malária na Amazônia Legal (2017)

	Total de positivos	Autóctones	Importados de outra UF	Importados de outro país	Infecções por <i>P. vivax</i>	Infecções por <i>P. falciparum</i>
Amazonas	81.297	79.678	929	649	73.243	7.270
Pará	36.812	35.602	1.061	149	33.600	1.273
Acre	36.728	35.721	945	62	28.878	7.387
Amapá	15.505	14.345	866	294	13.783	1.474
Roraima	14.074	11.048	115	2.911	12.869	1.067
Rondônia	7.808	6.541	1.194	73	6.575	1.169
Maranhão	958	328	116	514	834	91
Mato Grosso	589	439	130	20	569	12
Tocantins	72	36	29	7	71	1

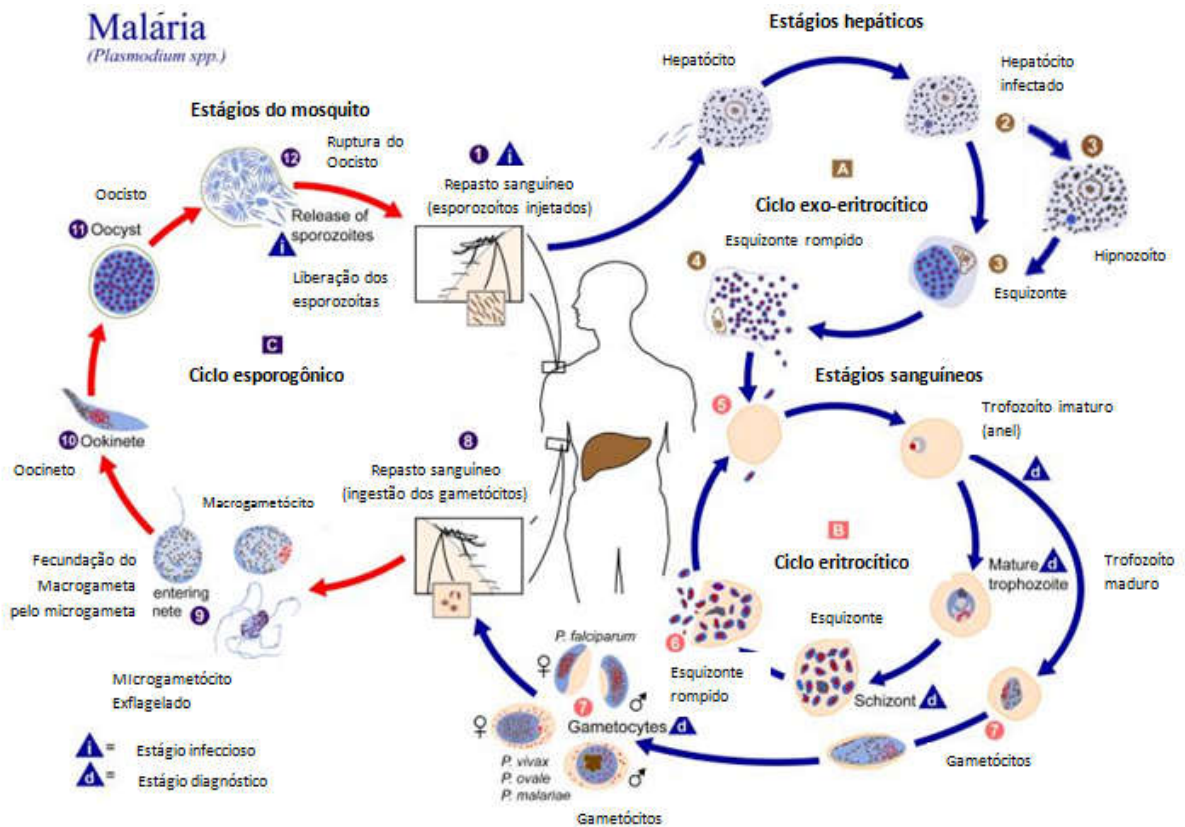
Dados Sivep-Malaria.

Em um levantamento do número de casos de malária entre 2007-2014, observou-se que na região extra-amazônica foram notificados apenas 0,5% do total de casos de malária do Brasil. Desses, 89% foram importados dos estados da área endêmica e dos países da África (17,18). A região Extra-Amazônica inclui 18 estados das regiões sudeste, sul, centro-oeste e nordeste, e é considerada uma área receptiva para transmissão de malária, uma vez que possui os vetores e ambiente climático propício. Em consequência da baixa transmissão Extra-Amazônica, a letalidade da doença é maior pelo atraso no diagnóstico devido à falta de conhecimento da doença pelos clínicos locais. Entre 2007 e 2013 foram relatados cerca de 7 mil casos na região, menos de 1% do total de casos no país no mesmo período, sendo 932 casos autóctones. Destes, 74,7% ocorreram nas áreas cobertas por Mata Atlântica, nos estados de São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná (19). Nas regiões de Mata Atlântica a ocorrência da malária está associada com a presença de plantas da família Bromeliaceae, que funcionam como criadouros dos mosquitos vetores *Anopheles* do subgênero *Kertessia* (20). Assim, de acordo com o ambiente e a situação epidemiológica o vetor pode variar, visto que várias espécies de anofelinos estão presentes em todo território nacional (21). A presença do anofelino juntamente com características geográficas e ambientais que favorecem a interação do plasmódio com o vetor contribuem para a manutenção da malária.

1.1.5 Ciclo de vida do plasmódio

Os seres humanos estão entre os hospedeiros vertebrados no ciclo de vida dos plasmódios, e são infectados pelo parasito durante a picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, o hospedeiro invertebrado e vetor da doença. O ciclo de vida do plasmódio é complexo, constituído por uma fase sexuada (esporogônica) no hospedeiro invertebrado e duas fases assexuadas (esquizogônica) no hospedeiro vertebrado, fases pré-eritrocítica e eritrocítica (Figura 3).

Figura 3. Ciclo biológico do *Plasmodium spp.*



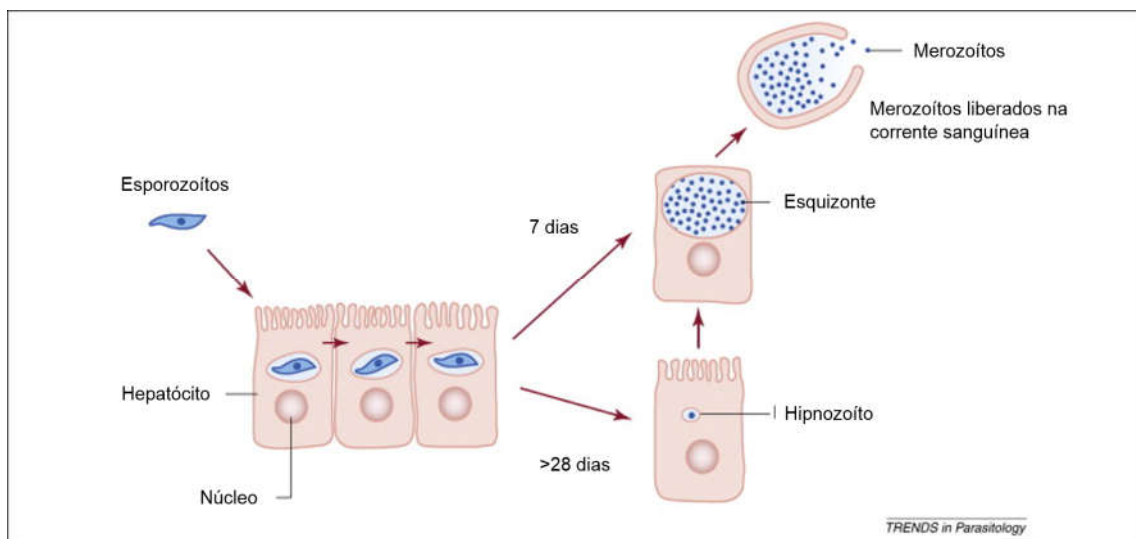
Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (CDC – Atlanta), 2010.

De acordo com o ciclo biológico dos parasitos da malária humana, representado na figura 3, o hospedeiro vertebrado é infectado quando a fêmea do anofelino infectada inocula esporozoítos (forma infectante) presentes na saliva na pele do hospedeiro através da picada. Após a inoculação alguns esporozoítos podem permanecer na derme por algumas horas (1-3 horas) e serem eliminados por fagócitos. Quanto aos demais esporozoítos que deixam o local da picada, grande parte invade os vasos sanguíneos para chegar ao fígado (22) e outros podem ser drenados por vasos linfáticos, se acumulando nos linfonodos (23,24). Uma vez no fígado, os esporozoítos se aderem as células endoteliais dos sinusóides hepáticos e iniciam o *gliding*, processo de locomoção intermediado por um mecanismo de actina-miosina. Com este mecanismo o esporozoíto pode invadir as células hepáticas por duas maneiras: penetrando a célula dentro de um vacúolo parasitóforo, formado através da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira por meio de junções móveis, ou migrando através e fora da célula em passagens sucessivas, a

transmigração (25). Este processo de locomoção parece ser essencial, pois induz a secreção de fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) tornando os hepatócitos mais susceptíveis à infecção (26). A invasão dos hepatócitos é auxiliada por duas proteínas principais do parasito, a circumsporozoíta (CSP) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP- do inglês *thrombospondin-related adhesive protein*) que se ligam aos sulfatos de heparina dos proteoglicanos, na superfície dos hepatócitos (27).

Protegidos no vacúolo parasitóforo, os esporozoítos iniciam um processo de maturação e de divisão celular denominado esquizogonia pré-eritrocítica, uma reprodução assexuada que vai causar a diferenciação do esporozoíto em trofozoíto e a formação dos esquizontes hepáticos repletos de merozoítos. Nessa fase, as espécies *P. vivax* e *P. ovale* podem se desenvolver em formas latentes (hipnozoítos), que vão permanecer dormentes no interior dos hepatócitos. Como consequência, os hipnozoítos são responsáveis por episódios de recaída, meses ou até anos após a infecção inicial (28) (Figura 4).

Figura 4. Formação de hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*.



Os merozoítos formados vão ser liberados diretamente na corrente sanguínea através de vesículas delimitadas pela membrana da própria célula hospedeira, os merossomos, marcando o fim da fase pré-eritrocítica do ciclo do parasito (29). Esta fase dura geralmente seis dias para *P. vivax*, oito dias para *P. falciparum* e entre doze a quinze dias para *P. malariae*. Uma vez livres na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos dando início a fase eritrocítica ou ciclo assexuado

sanguíneo. O processo de invasão dos eritrócitos ocorre por meio de interações que envolvem o reconhecimento de receptores específicos. Este processo consiste em quatro etapas: primeiro, o parasito adere de forma reversível à parede do eritrócito; em seguida ocorre a reorientação do parasito, na qual ele posiciona o polo apical perpendicularmente à membrana eritrocítica; posteriormente, se inicia a formação de uma zona de contato irreversível entre a superfície do polo apical e a superfície do eritrócito (*tigh junction*), e por fim, ocorre a invasão com invaginação da membrana eritrocítica e formação da membrana do vacúolo parasitóforo. Durante a invasão a junção é deslocada para o polo posterior e o conteúdo de organelas situadas na região apical, como roptrias, grânulos densos e micronemas, é liberado (30–32).

O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito pode seguir dois caminhos distintos. No primeiro, após a formação de um novo vacúolo parasitóforo, os merozoítos se diferenciam em anéis (trofozoítos jovens), depois trofozoítos maduros, que iniciam um processo de esquizogonia assexuada formando esquizontes repletos de novos merozoítos que irão romper a membrana dos eritrócitos, sendo liberados na circulação sanguínea novamente para invadir outros eritrócitos e repetir o ciclo eritrocítico dentro de um período que varia entre 36 e 72 horas, dependendo da espécie plasmodial (*P. falciparum*: ciclos febris de 36 a 48 horas, *P. vivax* de 48 horas e *P. malariae* de 72 horas). O aumento da temperatura corporal e o aparecimento de outras manifestações clínicas da malária coincide com o fim de cada ciclo eritrocítico que se repete sucessivas vezes (33). No segundo caminho, os merozoítos dentro do eritrócito se diferenciam em estágios sexuais: os microgametócitos masculinos e macrogametócitos femininos. Estas formas sexuais presentes na circulação vão ser ingeridas pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo.

No interior do intestino médio do mosquito, os gametócitos se diferenciam em gametas no processo de exflagelação e se fundem formando o zigoto, caracterizando a fase sexual do parasito (34). O zigoto se transforma em oocineto, uma forma móvel que penetra a membrana peritrófica do intestino médio do anofelino e se diferencia em oocisto. Os oocistos vão passar por sucessivas divisões mitóticas e diferenciação celular (esporogonia) e produzir milhares de esporozoítos. Ao romperem os oocistos, os esporozoítos são liberados na hemocele e se acumulam na glândula salivar do mosquito na qual são armazenados até serem inoculados em um novo hospedeiro vertebrado.

1.1.6 Resposta imunológica na malária

Os mecanismos envolvidos na resposta imunológica da malária são complexos e vários componentes do sistema imune parecem estar envolvidos. A resposta imune celular é considerada a mais importante no controle do estágio hepático da infecção, enquanto no estágio eritrocítico o controle do parasito se deve principalmente à resposta humoral. Nestas interações, estão envolvidas as moléculas do complexo de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex* - MHC), receptores de linfócitos B e T, e anticorpos, cujas ações contribuem no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (35).

Durante a resposta inicial, estudos em modelos murinos demonstraram que uma pequena parte dos esporozoítos inoculados alcança o sistema linfático e chega ao linfonodo drenante, sendo degradados e apresentados aos linfócitos T por células dendríticas. Quanto àqueles que permanecem na derme, a saliva do mosquito induz a degranulação de mastócitos e a infiltração de neutrófilos no sítio de inoculação, destruindo os parasitos (22). O processo de entrada do esporozoíto na pele até a invasão dos hepatócitos no fígado ocorre num curto espaço de tempo, exigindo uma resposta imune rápida para a eliminação do parasito. Além disso, assim como os merozoítos, os esporozoítos são extracelulares, sendo alvos importantes de anticorpos, componentes chave na imunidade antimalárica. A proteína circumsporozoíta (CS), que recobre toda a superfície do esporozoíto, é um dos principais alvos do reconhecimento da resposta humoral nesse estágio, assim como um estímulo para a produção de IFN- γ , a partir de macrófagos e células T-CD4⁺ (36,37).

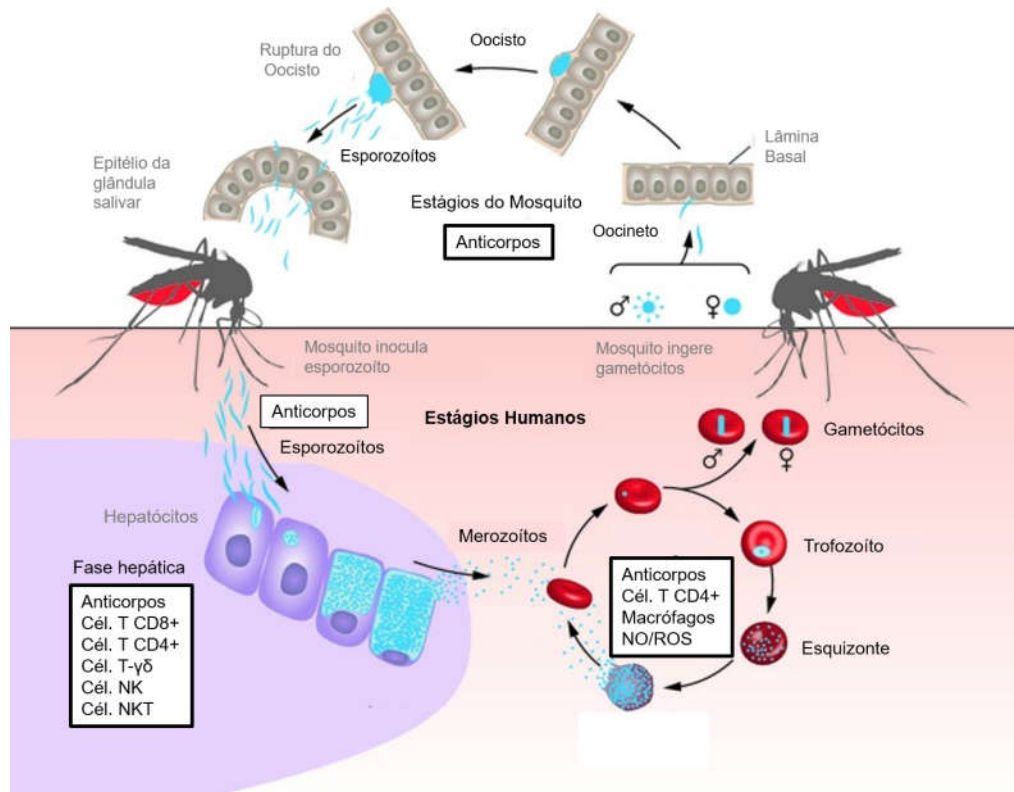
Na fase hepática, o esporozoíto é reconhecido por células de Kupffer que irão apresentar fragmentos de antígeno para células T-CD4⁺ através da ligação com MHC de classe II (38). Células T-CD8⁺ migram para o local da infecção devido ativação pela secreção de IL-2 e IFN- γ , perfil Th1 direcionado pela produção de IL-12 por células dendríticas e responsável pela amplificação da resposta imune adaptativa (39,40). As células T-CD8⁺, NKT e T $\gamma\delta$ ativadas vão promover a morte de parasitos pré-eritrocitários em hepatócitos infectados com o auxílio de IFN- γ no aumento da expressão de MHC de classe I (41). A resposta imune protetora nessa fase implica no reconhecimento dos antígenos CS e TRAP expressos na superfície do esporozoíto (42).

Enquanto a fase hepática da infecção é clinicamente silenciosa, a infecção por eritrócitos leva à doença e a todas as suas complicações. Um dos problemas na

fase eritrocítica é que as hemácias não apresentam moléculas de MHC, estruturas importantes no reconhecimento de células infectadas através da apresentação de antígenos (24,43). Por essa razão, a resposta humoral exerce um papel crucial no controle da malária. Os anticorpos atuam no bloqueio da invasão dos eritrócitos por meio do reconhecimento de proteínas da região apical do merozoíto, e na opsonização dos merozoítos, o que facilita seu reconhecimento e fagocitose pelos macrófagos (44). Experimentos de transferência passiva de anticorpos IgG de soro de adultos imunes para crianças diminuíam a parasitemia e protegiam as crianças do desenvolvimento da forma grave da doença, comprovando o papel protetor dos anticorpos (45,46). Assim, a presença de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) está associada com a proteção à doença, reduzindo sintomas e carga parasitária, através da opsonização do parasito ou da hemácia infectada o que pode impedir a invasão e citoaderência das hemácias e o desenvolvimento intra-eritrocítico, em colaboração com monócitos e macrófagos (inibição celular dependente de anticorpos, do inglês *antibody-dependent cell-mediated inhibition* - ADCI) (47–49). Além do papel fundamental dos anticorpos, a resposta imune contra os estágios eritrocíticos também é mediada por células e contribui numa resposta imunológica do tipo Th1 com a proliferação de células T-CD4⁺ e T-CD8⁺, secreção de IFN- γ e alta concentração de radicais de nitrogênio e oxigênio (NO e ROS) em células mononucleares do sangue periférico (50). A resposta imune é direcionada principalmente aos seguintes antígenos: proteínas de superfície de membrana do merozoíto, as MSPs (do inglês *membrane surface protein*), dentre elas MSP-1, MSP-3 e MSP-9, proteínas de merozoíto ligadas aos eritrócitos, as EBPs (do inglês *erythrocyte binding protein*), dentre elas a DBP de *P. vivax* (*duffy binding protein*), e a proteína de membrana apical, AMA-1 (do inglês *apical membrane antigen-1*) (42).

Num quadro geral da resposta imune, se destacam aquelas direcionadas aos estágios de vida do plasmódio que irão atenuar o quadro clínico da doença pela aquisição de uma resposta imune humoral e celular (Figura 5).

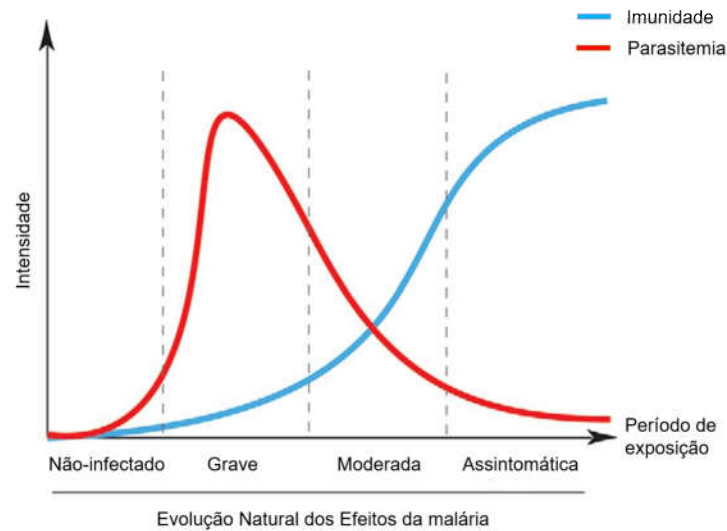
Figura 5. Resposta imune aos estágios do parasito.



Adaptado de Arama *et al.*, 2014.

Em populaes de áreas endêmicas de malária, crianças mais velhas e adultos podem desenvolver uma imunidade naturalmente protetora após vários anos de exposico e sucessivas infeces que favorecem o desenvolvimento de células de memória, T-CD4⁺, T-CD8⁺ e as células B. Esta imunidade denominada de premunizo  capaz de reduzir a parasitemia e por consequência os sintomas da doença, porém essa imunidade não  estéril (Figura 6). Além disso, essa imunidade  lábil, pode ser perdida se o contato com o parasito for interrompido, e  espécie específica, requerendo a exposico a um repertório de isolados circulantes para adquirir proteo efetiva.

Figura 6. Aquisição de imunidade em área endêmica.



Adaptado de Mendonça *et al.*, 2015.

Idealmente, a resposta imune contra a malária deve ser rápida e mediada por componentes pró-inflamatórios a fim de controlar o crescimento parasitário. O balanço entre respostas pró e anti-inflamatórias é crítico para uma proteção clínica efetiva, ou seja, pouca ativação pode não inibir o crescimento do parasito e em excesso pode levar à patologia da doença. Componentes anti-inflamatórios devem agir suprimindo a resposta para reduzir a inflamação e evitar danos causados pela própria resposta imune. Os antígenos de superfície dos parasitos são polimórficos ou exibem variação antigênica clonal, sendo necessário que a resposta imune desenvolva um repertório diversificado de anticorpos capazes de bloquear a invasão parasitária e a adesão tecidual (51). Os títulos de anticorpos anti-esporozoítos em soros de indivíduos naturalmente infectados são na ordem de centenas, enquanto que os de indivíduos imunizados com esporozoítos irradiados de milhares (52). A compreensão de antígenos alvos e mecanismos da imunidade humana à malária é crucial para o avanço de vacinas eficazes e para o desenvolvimento de ferramentas para medir a imunidade e a exposição em populações endêmicas.

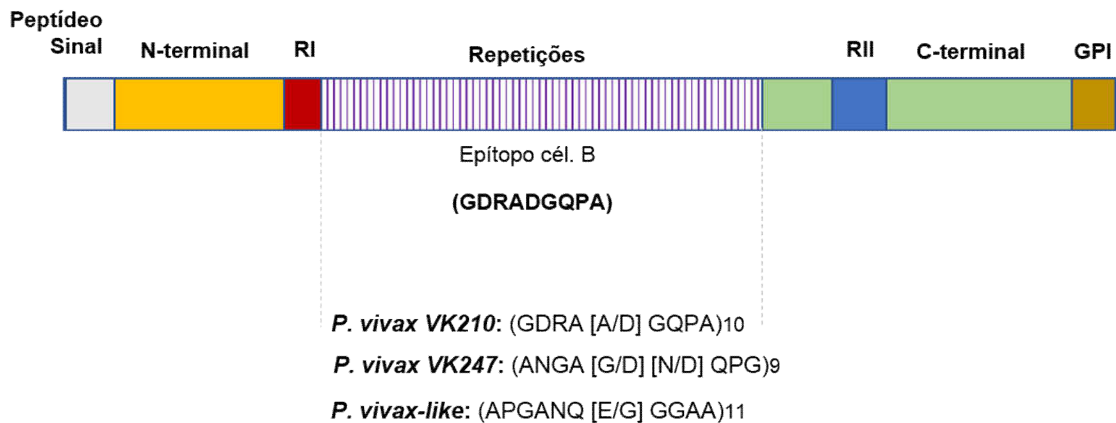
1.1.7 Proteína circumsporozoíta: um alvo imunogênico relevante

Há muito tempo se sabe que uma imunidade protetora a malária pode ser induzida experimentalmente em humanos pela imunização com esporozoítos atenuados por irradiação, ou pela inoculação de esporozoítos sob um esquema de tratamento profilático com cloroquina, indicando que a imunização com esporozoítas

induz uma resposta imune capaz de inibir o desenvolvimento do parasita antes que ele apareça no sangue e produza os sintomas clínicos da doença (53). Soros de animais e humanos, protegidos por este tipo de imunização, reconhecem, entre outras moléculas, a proteína circumsporozoíta (CS) que é abundante na superfície do esporozoítio e está envolvida no processo de invasão dos hepatócitos. Por isso a proteína CS de *Plasmodium* tem sido o antígeno mais estudado e promissor na indução de imunidade protetora em animais e humanos (54–56).

A proteína CS, com cerca de 58 kDA, possui uma estrutura altamente conservada nas diferentes espécies plasmodiais. A figura 7 mostra a estrutura da proteína CS constituída por um domínio N terminal, uma região de repetição central localizada entre duas regiões conservadas, região I (RI) e região II (RII), e uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) fixada no extremo C-terminal. A região de repetição central contém epítomos de célula B imunodominantes, alvo de anticorpos protetores, enquanto as regiões N e C-terminal contêm epítomos de células T-CD4⁺ e CD8⁺ reconhecidos por células T na resposta citotóxica e auxiliar. O domínio repetitivo central possui números variados de repetições de aminoácidos em tandem e as extremidades amino e carboxila altamente conservadas (57,58). As sequências em tandem no domínio central são específicas para cada espécie plasmodial, apresentando-se conservadas para o *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. brasilianum*. Contudo, para o *P. vivax*, essa sequência apresenta três variantes de acordo com a composição de aminoácidos das repetições: VK210, VK247 e *P. vivax-like*. A primeira variante sequenciada e que se caracteriza pela presença de um nonapeptídeo (GDRA (A/D) GQPA) repetido em tandem no domínio central da proteína, foi denominada VK210, considerada a forma clássica de *P. vivax* (59). Em cepas da Tailândia, outra variante foi descrita com a repetição de aminoácidos ANGA (G/D) (N/D) QPG, denominada VK247 (60). Posteriormente, em Papua Nova Guiné, foi relatada a existência de uma variante com morfologia semelhante ao *P. vivax*, mas com sequência repetitiva diferente das outras, APGANQ (E/G) GGAA, denominada *P. vivax-like* (61).

Figura 7. Estrutura da proteína circumsporozoíta.



Em relação a CS de *P. falciparum*, por se tratar da espécie plasmodial que é responsável pela alta mortalidade em crianças na África, foram feitos grandes investimentos nos últimos anos e, recentemente, resultados promissores foram obtidos em ensaios clínicos conduzidos com uma vacina recombinante composta pela região repetitiva e C terminal da proteína CS de esporozoíto de *P. falciparum* fusionada ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B (vacina RTS,S) (62). RTS,S, agora conhecida como MosquirixTM, é a vacina mais avançada contra a malária humana causada pelo *P. falciparum*. Ensaios clínicos de fase III demonstram que, ao longo dos primeiros 18 meses após três doses de RTS,S, os casos de malária foram reduzidos em quase metade das crianças com idade de 5-17 meses no momento da primeira vacinação, e em 27% dos bebês com idade de 6-12 semanas. Ao final do estudo, quatro doses de RTS,S reduziram os casos de malária em 39% ao longo de quatro anos de acompanhamento das crianças, e em 27% ao longo de três anos de acompanhamento em bebês (62).

No que se refere a malária causada por *P. vivax*, em estudos de imunização de camundongos C57/BL6 (63), macacos *Rhesus* (64) e seres humanos (65) com uma vacina sintética baseada na CS de *P. vivax*, a VMP001 (do inglês *vivax malaria protein 001*), foram observadas resposta imune humoral e celular robustas. No entanto, embora os anticorpos específicos contra a CS pareçam ser protetores, uma vez que causam aglutinação de esporozoítos vivos, os resultados do ensaio clínico Fase I/IIa embora não comprovassem o papel protetor dos anticorpos, demonstraram que a vacinação com peptídeos sintéticos longos (LSP) representando a CS de *P. vivax* ligados a um epítipo universal da toxina tetânica em

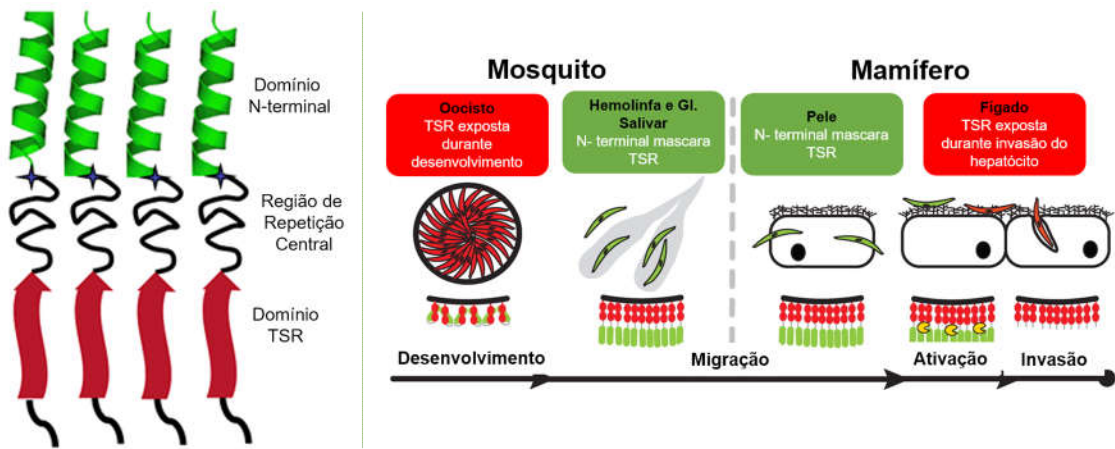
primatas não-humanos produz anticorpos IgG1 e IgG3 que reconheceram a LSP e CS desde a primeira imunização (55). Estudos de imunização com esporozoítos irradiados de *P. vivax* em humanos têm sido limitados pela falta de cultura *in vitro* que pudesse ser usada como fonte de gametócitos para infecção do mosquito. Em humanos a investigação da resposta imune à proteína CS tem sido limitada a dados sorológicos empregando peptídeos sintéticos das regiões repetitivas da CS das três variantes de *P. vivax* (66,67). Os níveis e a soroprevalência de anticorpos contra esporozoítos de *P. falciparum*, em especial contra o epítipo repetitivo da CS de *P. falciparum*, são considerados indicadores de exposição ao parasito ao longo do tempo e tem sido utilizado como marcador de intensidade de transmissão da malária em áreas endêmicas (68–71).

A variante *P. vivax*, VK210, possui maior distribuição global, com presença relatada no Brasil, Índia, Tailândia e Peru (72–75). Dados sorológicos utilizando peptídeos sintéticos das regiões repetitivas da CS das três variantes de *P. vivax*, identificaram a presença de anticorpos para todas as variantes em amostras de áreas endêmicas de malária do Estado do Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso e Acre (76,77). Estudos moleculares também confirmaram a presença das variantes de *P. vivax* em indivíduos infectados nos Estados de Rondônia, Amapá, Pará e Amazonas (72,78). Da Silva et al. (2006) relataram diferenças na infectividade de anofelinos para as variantes, indicando que o *A. darlingi* era mais suscetível a infecção pelo *P. vivax* VK210 (79). Foi observada também diferentes características exibidas pelas variantes tanto na resposta aos medicamentos quanto na sintomatologia (72,80).

A proteína CS é estruturalmente necessária na formação de esporozoítos e desempenha papéis cruciais durante a jornada dos esporozoítos, incluindo invasão de glândulas salivares em mosquitos, maturação do esporozoíta e invasão de hepatócitos no fígado do hospedeiro humano (81–83). Ela possui dois estados conformacionais, uma conformação adesiva que expõe a região C-terminal e uma não adesiva, que mascara a região C-terminal e expõe a região N-terminal, conferindo um fenótipo migratório aos esporozoítos (84). O conhecimento das mudanças conformacionais da CS juntamente com suas funções é importante para o desenvolvimento de vacinas pré-eritrocíticas eficientes. Como demonstrado na figura 8, epítopos de células T encontrados na porção N-terminal ficam expostos no momento da invasão celular e no processo migratório, momento crítico para a indução da resposta imune protetora no hospedeiro. No desenvolvimento do

esporozoítos e na invasão dos hepatócitos se expõe a porção C-terminal que contém uma sequência de repetição de trombospondina denominada TSR (do inglês *thrombospondin-like type I repeat*), reconhecida por sua propriedade adesiva. Além disso, apesar da vacina RTS'S se basear na região C-terminal, estudos recentes destacaram a importância fisiológica da região N-terminal na ligação de células hepáticas envolvendo um epítipo considerado imunogênico e capaz de induzir anticorpos protetores (85–87).

Figura 8. Mudança conformacional da proteína CS.



TSR: sequência de repetição de trombospondina

Adaptado de Coppi, 2011.

Proteínas de superfície, como a CS, apresentam polimorfismo alélico e estão sob seleção natural positiva pela resposta imune. Uma importante fonte de polimorfismo gênico na proteína CS é o número de repetições na região central (88–90). Oliveira-Ferreira e colaboradores (2004) demonstraram associação entre resposta humoral e polimorfismos na região central da CS de *P. vivax* (variantes genotípicas de *P. vivax*) em indivíduos de área endêmica brasileira. Foi observada associação entre respostas de anticorpos às repetições de CS da variante VK247 e a presença de HLA-DR16 e entre HLA-DR7 e a ausência de respostas de anticorpos às repetições de CS da forma clássica VK210 (77). Já Ribeiro e colaboradores (2016) demonstraram pela primeira vez que as diferentes variantes podem causar efeitos na resposta imune do hospedeiro. A variante VK247 está associada com cargas parasitárias e perfil de citocinas pró-inflamatórias maiores em comparação com o observado para com a forma clássica VK210 (91). Esses achados mostram

que a presença de polimorfismos em proteínas imunogênicas pode ser determinante no desfecho da doença.

1.1.8 Influência de polimorfismos na malária

O polimorfismo gênico pode ser definido como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus* (local ocupado por um gene). Neste cenário, pode-se levantar a hipótese de que algum fator de seleção atuou sobre aquele gene, causando o aumento da frequência do alelo atípico (92). A presença destes polimorfismos em um determinado gene pode ou não acarretar em alterações funcionais.

Sendo uma doença de elevada prevalência ao longo de milhares de anos, a malária tem exercido forte pressão seletiva no genoma humano (93). Os fatores genéticos do hospedeiro contribuem significativamente na diversidade de quadros observados na malária, conferindo resistência inata ou susceptibilidade à doença. Em 1949, Haldane incentivou a investigação nesse campo quando propôs que um alelo mutante atinge e mantém uma elevada frequência como consequência de uma vantagem seletiva contra a malária, cuja distribuição coincide com a da talassemia (doença hereditária autossômica recessiva caracterizada por redução da taxa de síntese de uma das cadeias de globina que forma a hemoglobina) (94).

No ciclo intraeritrocitário do plasmódio, os eritrócitos apresentam papel fundamental como células hospedeiras, carregando o maior número de variações genéticas que afetam a estrutura e/ou funcionalidade já descritas como associadas à proteção contra malária, implicando uma pressão seletiva positiva com aumento de frequência de genes superior a 1%. Dentre as alterações genéticas já associadas com a doença podemos citar as talassemias, o antígeno Duffy, o sistema ABO, a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a de piruvato cinase (PK) (95–98).

Além desses distúrbios genéticos, existem evidências acumuladas que destacam outros polimorfismos nos genes de codificação de moléculas envolvidas na regulação gênica da resposta imune do hospedeiro à malária, como moléculas do sistema antígeno leucocitário (do inglês *Human leucocyte antigen*, HLA), importantes citocinas e mediadores produzidos por macrófagos, linfócitos T ativados, células de Kupffer, células NK e células endoteliais.

1.1.8.1 Associação do HLA

Enquanto linfócitos B reconhecem diretamente os antígenos solúveis através de seus receptores de superfície, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ necessitam que o antígeno seja processado e apresentado por uma célula apresentadora de antígeno (do inglês *antigen-presenting cells*, APC) em associação a moléculas de histocompatibilidade (glicoproteínas). Essas glicoproteínas são codificadas em um grande grupo de genes que foram identificados pela primeira vez por seus efeitos potentes na resposta imune aos tecidos transplantados. Por essa razão, o complexo genético foi denominado complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *Major histocompatibility complex*, MHC). O complexo MHC é a região mais variável do genoma humano que carrega diferentes loci que codificam genes funcionais extremamente polimórficos, o que varia sua capacidade de ligação ao antígeno (99). Esses genes pertencem ao sistema de antígenos leucocitários humanos (do inglês *Human leukocyte antigen*, HLA), e codificam as principais moléculas encarregadas da apresentação de antígeno na superfície celular. Localizado no cromossoma 6, o complexo HLA consiste em mais de 200 genes divididos em três classes: classe I, II e III. Os genes MHC de classe II, reconhecidos por seu controle da resposta imunológica, codificam duas cadeias que formam os heterodímeros funcionais HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM e HLA-DO (2.649 alelos conhecidos), sendo HLA-DR o locus mais polimórfico (42,100). O MHC de classe II é expresso predominantemente em APCs como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer e linfócitos B, e tem influência reconhecida na produção de anticorpos.

Há estudos que vêm relatando associação de certos alelos HLA com a susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas como a hanseníase, a leishmaniose tegumentar, a tuberculose, a esquistossomose e a malária (101–104). Na malária, a associação com antígenos de HLA apresenta características muito peculiares. Estudos sobre a importância dos genes que regulam a resposta imune à malária permitiram estabelecer a ideia de que a seleção natural exercida pela presença do parasito tem contribuído para a manutenção da extensa diversidade alélica de HLA. Hill e colaboradores reforçaram essa visão ao demonstrar a influência dos genes HLA na proteção contra a malária grave na África subsaariana (104). Outro estudo longitudinal realizado por Jepson e colaboradores mostrou que a susceptibilidade a episódios de febre malárica em gêmeos na Gâmbia é determinada por fatores genéticos ligados ao MHC (105).

As associações encontradas entre os antígenos de HLA e a malária vêm apresentando resultados variados. No Quênia, a proteção contra malária grave estava associada com o alelo DRB1*0101, no norte de Gana com DRB1*04, e na capital da Índia com o alelo DRB1*0809 (106–108). Enquanto isso, em outros estudos que investigavam as correlações de HLA-DQ e -DR nenhuma associação entre os alelos de HLA e a resposta à malária foi estabelecida (109–113).

As associações do sistema HLA atuam através da seleção de peptídeos de um patógeno para apresentação aos linfócitos. Sendo HLA-B uma cadeia de classe I expressa nos hepatócitos, o alelo HLA-B53 foi associado com o reconhecimento de epítomos derivados de um antígeno de célula hepática (LSA-1) (114). A produção de citocinas induzidas pelo LSA-1 também parece estar sendo modulada pelo complexo HLA. Foi observado uma resposta específica a este antígeno com altos níveis de IFN- γ associada com o alelo DQB1*0501 no Gabão, e um favorecimento da indução de IL-6 e IFN- γ pelos alelos DQB1*0201 e 0301, assim como a indução de IL-10 por DQB1*06 (115). As associações da resposta específica com as formas hepáticas indicam que essas formas do parasito são alvos da resposta imune e potenciais alvos para uma vacina. O desencadeamento ou não de uma resposta imune protetora à determinados patógenos e/ou imunógenos, pode estar associado com fatores genéticos. Estudos sobre a influência das moléculas HLA na resposta imune em populações etnicamente diversas são importantes antes da implementação de ensaios vacinais. Neste sentido, vem sendo relatada associação de potenciais candidatos vacinais com diferentes alelos de HLA (Tabela 2).

Tabela 2. Associação de alelos de HLA e da resposta humoral contra antígenos de *P. vivax*.

Antígeno/Proteína	HLA	Associação	Referência
CS variante VK247	DRB1*16	+	Oliveira-Ferreira <i>et al.</i> , 2004
CS variante VK210	DRB1*07	-	Oliveira-Ferreira <i>et al.</i> , 2004
CS peptídeo N	DRB1*03	-	Storti-Mello <i>et al.</i> , 2011
CS peptídeo N	DRB1*11,12 (DR5)	-	Storti-Mello <i>et al.</i> , 2011
MSP3-NT,CT e FL	DRB1*03, 04, 06 e 16	+	Lima-Junior <i>et al.</i> , 2012
MSP9-RIRII	DRB1*01	-	Lima-Junior <i>et al.</i> , 2012
MSP9-RIRII	DRB1*04	+	Lima-Junior <i>et al.</i> , 2012
MSP9-RII	DRB1*01	-	Lima-Junior <i>et al.</i> , 2012
MSP9-RII	DRB1*04	+	Lima-Junior <i>et al.</i> , 2012
MSP9-CT	DRB1*04	+	Lima-Junior <i>et al.</i> , 2012
AMA-1	DRB1*03	+	Storti-Mello <i>et al.</i> , 2011

Adaptado de Lima-Junior *et al.*, 2016.

Embora candidatos vacinais de *P. vivax* tenham se mostrado pouco imunogênicos em ensaios clínicos, Ferreira e colaboradores construíram uma proteína quimérica denominada PvRMC-RBP1, composta de um domínio imunodominante da proteína-1 de ligação a reticulócitos de *P. vivax* (do inglês *Plasmodium vivax reticulocyte binding protein-1* RBP) e de epítomos promíscuos de células T do MHC de classe II, e comprovaram a preservação de epítomos conformacionais de células B na proteína quimérica. Contudo, não foi encontrada associação entre os alelos HLA-DRB1*04 e os alelos HLA-DQB1*03 e as respostas de anticorpos IgG às proteínas quiméricas ou nativas (113). Em estudos que avaliaram proteínas de superfície de merozoítos (MSPs) de *P. vivax*, foi observado altos níveis de anticorpos IgG específicos em indivíduos brasileiros carreadores dos alelos HLA-DRB1*04 e HLA-DQB1*03. Os altos níveis de anticorpos observados foram associados a uma possível pressão seletiva por *P. vivax* na população ameríndia (112). Uma associação significativa foi encontrada entre níveis elevados de anticorpos IgG contra a MSP-1 de *P. vivax* e a presença do alelo HLA-DR3 (111). No que se refere à proteína CS, candidato vacinal mais avançado nos ensaios clínicos, um estudo de fase I utilizando uma vacina de peptídeo do antígeno múltiplo de *P. falciparum* induziu níveis elevados de anticorpos específicos em voluntários

que expressavam as moléculas HLA-DQB1*0603, HLA-DRB1*0401 ou HLA-DRB1*1101 (116). Os resultados de Oliveira-Ferreira e colaboradores mostraram em indivíduos de Rondônia uma associação significativa entre a resposta de anticorpos contra as repetições da CS correspondente à variante *VK 247* de *P. vivax* e a presença do alelo HLA-DRB1*16, bem como uma associação entre a presença de HLA-DRB1*07 e a ausência de respostas de anticorpos às repetições da CS da variante *VK210* (77). Já Storti-Mello e colaboradores descreveram uma associação significativa entre a ausência de resposta de anticorpos à região N-terminal da CS e a presença de HLA-DRB1*03 e DR5 em um estudo com indivíduos de diferentes regiões da Amazônia brasileira (111).

O conjunto dos achados descritos nos últimos anos sobre a influência do sistema HLA na modulação da resposta contra a malária é extremamente importante e útil e pode abrir portas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes para a malária.

1.1.8.2 Polimorfismos nos genes de citocinas

Estudos em modelos murino e humano demonstraram que as citocinas juntamente com as células T, células NK e macrófagos, contribuem para o controle da imunopatologia na malária. O equilíbrio entre as citocinas de perfil Th1 e Th2 (T helper 1 e 2) parece ser crucial no controle dos sintomas clínicos da doença livrando o hospedeiro do desenvolvimento dos quadros graves ou moderados da infecção. A partir da evidência encontrada por Kwiatkowski e colaboradores, que mostraram que o polimorfismo do gene fator de necrose tumoral (do inglês *tumoral necrose factor*, TNF) estava associado com susceptibilidade à malária cerebral, polimorfismos na região reguladora de citocinas vêm sendo descritos. Os genótipos específicos de importantes citocinas envolvidas na resposta imune também estão sendo associados com risco de rejeição de órgãos após transplantes e com a susceptibilidade ou gravidade em certas doenças infecciosas e autoimunes (117,118). Com efeito, polimorfismos funcionais em genes de citocinas, que podem alterar a síntese e secreção destas proteínas, têm sido associados a doenças que têm uma patogênese inflamatória (119).

Os polimorfismos mais comuns dentro do genoma humano são os do tipo SNP, polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *single nucleotide polymorphism*). Eles se caracterizam pela variação em apenas um nucleotídeo no interior de uma sequência de DNA, que pode ser codificante ou não, e ocorrem aproximadamente

uma vez a cada 1.350 pares de bases no genoma humano (120). A presença de SNPs pode influenciar a expressão gênica, a função proteica e a susceptibilidade a doenças. A base de dados de SNP do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) conta com mais de 11 milhões de SNP identificados em humanos, porém a maior parte dos polimorfismos causa pequeno impacto na saúde. Até o presente momento, poucas dezenas de SNPs funcionais em genes de mediadores da resposta imunológica foram relacionados à proteção ou susceptibilidade à malária (Tabela 3).

Tabela 3. SNPs envolvidos na resposta imune da malária.

Gene	Efeito	Referência
polimorfismo MIF-173	Susceptibilidade à alta parasitemia em crianças infectadas	Awandare, 2006
polimorfismos IL-1β-31C/T e -511A/G	Aumento da susceptibilidade à anemia severa e níveis circulantes de IL-1 β	Ouma, 2008
alelo IL4-524T	Aumento dos níveis de anticorpos contra a CS e Pf332	Luoni, 2001
haplótipo IL4+33T/-590T	Aumento de IgE em crianças com malária grave	Gyan, 2004
alelo IL4-590T	Prevalência de infecções por <i>P. falciparum</i>	Vafa, 2007
genótipo IL4 VNTR ½	Associação com malária grave	Cabantous, 2009
haplótipo IL4-590T/-34T e intron VNTR R2	Proteção contra a malária	Jha, 2012
haplótipo IL10-1082G/-819C/-592C	Proteção contra anemia severa	Ouma, 2008
Haplótipo IL10+4949G/+919C/-627G/-1117C/-3585T	Proteção de 49% contra a malária grave	Wilson, 2005
Haplótipo IL10-1082A/-819T/-592^a	Risco de anemia em recém-nascidos	Lokossou, 2013
genótipo IL10-1082AA	Aumento dos níveis de IgG contra MSP-2/3d7 e AMA-1 em mães e recém-nascidos	Lokossou, 2013
polimorfismo IL10-3575T/A	Associação com a produção de IL-10 e a ocorrência dos sintomas	Domingues, 2016
genótipo IL13-1055TT	Redução dos níveis de IgG contra AMA-1 em recém-nascidos	Lokossou, 2013
alelo IL13-1055T	Proteção contra a malária severa	Ohashi, 2003
alelo IL22+708T	Proteção contra anemia severa	Koch, 2005

alelo IL22-1394G	Associação fraca com susceptibilidade à malária cerebral	Koch, 2005
haplótipo IL22-394A/+708T	Proteção contra a doença	Koch, 2005
IL17RA LD	Associação com malária cerebral	Marquet, 2015
alelo TNF-238^a	Risco de anemia severa e malária cerebral	Mcguire, 1999
alelo TNF-238^a	Altera o balanço da IL-10 em crianças com malária grave	May, 2000
polimorfismo TNF-238	Susceptibilidade à malária severa e desfecho clínico de infecções por <i>P. falciparum</i>	Olaniyan, 2016
polimorfismos TNF-308, -238 e -244	Aumento da parasitemia e sintomatologia	Nguyen, 2017
polimorfismo NOS2A-1173C/T	Proteção contra malária cerebral e anemia severa	Hobbs, 2002
polimorfismo NOS2A-954G/C + microssatélite CCTTT₍₈₎	Proteção contra hiperparasitemia	Cramer, 2004
polimorfismo NOS2A-1173C/T + microssatélite CCTTT₍₁₃₎	Relação com maior número de casos fatais	Cramer, 2004

Apesar das citocinas apresentarem baixo grau de variação genética, se observa um número cada vez maior de estudos incriminando os polimorfismos localizados em regiões reguladoras de genes de citocinas como fator que pode influenciar na susceptibilidade ou na evolução da malária. O papel de cada citocina em humanos durante a infecção ainda não está claro, porém existem evidências de que a expressão de algumas citocinas e mediadores celulares são extremamente importantes na evolução da doença. Esse trabalho destaca o papel e a influência de duas principais citocinas de perfil Th1 e Th2, IFN- γ e IL-10, e de radicais reativos de oxigênio como o neurotransmissor óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*, NO).

❖ Interferon-gamma (IFN- γ)

O IFN- γ é uma citocina solúvel descrita como o indutor chave dos mecanismos imunes efetores essenciais para o controle inicial da infecção malárica, tanto nos estágios pré-eritrocíticos quanto nos eritrocíticos. Na malária, o IFN- γ tem ação antiparasitária direta e, em sinergismo com o TNF- α , é capaz de induzir a produção de óxido nítrico (em inglês *nitric oxide*, NO) e radicais livres. Andrade e colaboradores (2010) evidenciaram uma correlação positiva entre os níveis de IFN- γ e a gravidade da doença (121).

A codificação desta citocina se dá pelo gene humano *IFNG* localizado no cromossomo 12 na região 12q24.1 (122). Mutações nesse gene estão associadas a uma maior susceptibilidade a infecções virais, bacterianas e parasitárias e a várias doenças autoimunes (123–127). No primeiro íntron do gene *IFNG* ocorre uma sequência microssatélite polimórfica formada por curtas repetições em tandem (do inglês *short tandem repeat*, STR) de dois nucleotídeos (C e A), caracterizando diferentes alelos e expressões do gene (128–130). Junto à essa região no extremo 5' de uma repetição CA foi descrito o principal SNP na posição +874 (rs2430561, polimorfismo +874T/A), coincidindo também com o sítio de ligação do fator de transcrição NF-K β . Este SNP apresenta troca do alelo T por A, e esta mutação está relacionada com a expressão alterada de IFN- γ , na qual indivíduos portadores do alelo selvagem T produzem quantidades normais da citocina, enquanto portadores do alelo mutante A apresentam produção reduzida. Essa alteração pode explicar a associação deste polimorfismo na susceptibilidade de várias doenças infecciosas como a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), hepatite B, câncer cervical, tuberculose e toxoplasmose (131–135). Entretanto, não foi encontrada associação desse polimorfismo com pancreatite crônica, leishmaniose, tuberculose e hepatite C (136–139).

O polimorfismo IFNG+874T/A pode desempenhar um papel significativo na susceptibilidade para a malária. Medina e colaboradores (2011) analisaram a distribuição de alelos e genótipos desse polimorfismo em indivíduos de área endêmica brasileira com infecção por *P. vivax*, e não encontraram associação deste polimorfismo na susceptibilidade e progressão da doença. Porém, ao analisar a influência deste polimorfismo na produção de IFN- γ , observaram forte associação do genótipo AA com produção reduzida da citocina (140). Outro estudo brasileiro de Furini e colaboradores (2016) avaliou a influência do polimorfismo IFNG+874T/A nos níveis de anticorpos IgG contra proteínas de estágio eritrocítico de *P. vivax*. Apesar de níveis de IgG específicos superiores em indivíduos portadores do genótipo TT (selvagem), essa diferença não foi significativa, não havendo associação dos alelos e genótipos desse polimorfismo com os níveis de IgG específicos (141). Na população africana, Koch e colaboradores (2005) também não encontraram associação deste SNP com a susceptibilidade à malária grave (142). No mesmo ano, um estudo de ancestralidade conduzido por Upperman e colaboradores (2005) testou a hipótese de associação da deficiência G6PD com SNPs de citocinas pró e anti-inflamatórias. Analisando a ocorrência do SNP IFNG+874T/A em pacientes com

e sem a deficiência de G6PD, os autores observaram uma baixa produção significativa de IFN- γ em indivíduos portadores da deficiência associada ao alelo T selvagem (143). Estudos demonstraram que o polimorfismo IFNG+874T/A apresenta associação à maior susceptibilidade a uma variedade de doenças infecciosas (144) e pode estar ligado ao perfil imunogenético responsável pela proteção contra a infecção por *Plasmodium*, como as respostas celular e humoral desenvolvidas.

❖ Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida tardiamente por células Th2, células CD8⁺, monócitos, células B ativadas e tímócitos, com efeito pleiotrópico biológico em vários tipos celulares. A IL-10 pode estimular e suprimir a resposta imunológica, inibindo a produção de citocinas importantes como IFN- γ e IL-12, de coestimuladores e de moléculas do MHC de classe II, resultando numa forte inibição da capacidade de apresentação de antígeno e consequente inibição da proliferação de linfócitos T. Ela atua na proliferação e diferenciação de células B, granulócitos, neutrófilos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (145–147).

Na malária, a IL-10 está associada com a proteção e reinfeção em estágios hepáticos (148). Na presença da infecção pelo plasmódio ocorre um aumento na produção de IL-10 quando a parasitemia está elevada. Níveis elevados de IL-10 durante os episódios de malária são benéficos, neutralizando os efeitos das outras citocinas produzidas pelas células Th1 e CD8⁺, que são responsáveis por grande parte da imunopatologia associada com a superprodução de IFN- γ (149).

A IL-10 é codificada pelo gene humano *IL10A* localizado no cromossomo 1 na região 1q31-32 e apresenta mais de 27 sítios polimórficos. Os polimorfismos que ocorrem na região promotora do gene *IL10A* estão associados com a produção alterada desta citocina (150). Dentre os polimorfismos que ocorrem na região promotora, os SNPs nas posições -1082, -819 e -592 (-1082A/G, -819T/C e -592A/C) têm sido deveras investigados e foram descritos por influenciar a transcrição do RNA mensageiro e a expressão de IL-10 *in vitro* (151,152). Estes SNPs foram associados com a proteção à anemia grave e o aumento da produção de IL-10 em crianças quenianas parasitadas por *P. falciparum* (153). Lokossou e colaboradores (2013) também identificaram associação com estes SNPs. Na presença do haplótipo IL10A-1082A/-819T/-592A o risco de anemia em recém-nascidos é aumentado. Além disso, os mesmos autores demonstraram que recém-nascidos e mães carregando o genótipo IL10A-1082AA apresentaram maiores níveis

de IgG contra proteínas de estágio sanguíneo do plasmódio (154). Em contraponto, Carpenter et al. (2009) não encontraram evidência de associação da malária com polimorfismos na região promotora do gene de IL-10 (155).

A análise de um painel inclusivo de variação em genes envolvidos na resposta imune pode fornecer uma visão ampliada do complexo painel de citocinas cruciais na determinação da gravidade dos sintomas clínicos, no grau de parasitemia e ainda na eliminação da malária.

❖ Óxido nítrico (NO)

Apesar do óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) ser uma das mais simples moléculas biológicas da natureza, ele está envolvido em importantes processos fisiológicos como neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares (156,157). Uma característica importante é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica de acordo com a concentração e/ou depuração tecidual (158).

Sabe-se que na malária altos níveis de NO podem ser produzidos para a eliminação direta dos parasitos ou limitando o crescimento parasitário, contribuindo ainda para a ativação patológica do sistema imune, prejudicando a sinalização neuronal e causando dano oxidativo nas células sanguíneas, o que conduz ao quadro de anemia (159). Contudo, diversas evidências mostram que durante a malária os níveis de produção de NO são baixos devido a hiporargininemia (deficiência na enzima arginase I), ao aumento da inibição de NO pela hemoglobina livre e pelos níveis elevados de superóxido provocados pela infecção (160). Resta determinar se a biodisponibilidade do NO está associada à gravidade da malária, particularmente a malária cerebral, enquanto outros estudos evidenciam um papel protetor (159).

A enzima responsável por catalisar a produção de NO pode ser de origem endotelial (eNOS ou NOS3), neuronal (nNOS ou NOS1) e a que sustenta a produção mais abundante, a induzível (iNOS ou NOS2). A produção de NO induzida pela iNOS está envolvida no sistema imune inato e contribui para a morte intra-hepática de parasitas em resposta a IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6 secretados por células T e NK ativadas (161). A enzima iNOS é expressa pelo gene humano NOS2A localizado no cromossomo 17 na região 17q11.2-q12. A expressão gênica é regulada por várias vias: indução da expressão por NF-K β , IFN- γ (sinalizando

através da cascata JAK-STAT) e fatores indutores de hipóxia (HIF-1); e inibição da expressão por TGF- β e interleucinas 4, 10 e 13.

A presença de polimorfismos na região promotora do gene *NOS2A* causa alterações na atividade do produto gênico (enzima iNOS), enquanto polimorfismos que ocorrem na região reguladora alteram os níveis do produto do gene. Foram descritos três polimorfismos na região promotora do gene *NOS2A* que foram associados a doenças como o diabetes, HIV, artrite reumatoide, psoríase e acalasia idiopática (162–166). Dentre estes polimorfismos estão duas repetições de microssatélite (TAAA e CCTTT) e um SNP na posição -954 (*NOS2A*-954G/C).

Na infecção malárica, estes polimorfismos presentes na região promotora do gene *NOS2A* apresentaram papel importante. Ohashi e colaboradores (2002) demonstraram numa população da Tailândia uma forte associação entre as repetições CCTTT e o risco de malária grave, assim como com o nível de transcrição da iNOS. Porém, não foi observada correlação com os níveis de NO. O mesmo estudo avaliou a influência do SNP *NOS2A*-954G/C e verificou associação da presença do alelo C com altos níveis de atividade da enzima NOS (167). O estudo desenvolvido por Cramer e colaboradores (2004) observaram que o polimorfismo *NOS2A*-954G/C em associação com a repetição CCTTT₍₈₎ são fatores de proteção à hiperparasitemia em crianças ganenses (168). A mesma tendência foi relatada por Kun e Planche e seus colaboradores. O primeiro encontrou associação do polimorfismo *NOS2A*-954G/C com a proteção à malária em crianças do Gabão, Nigéria e Senegal, e o segundo encontrou associação com a proteção contra a malária grave, também em crianças do Gabão (169,170). Já Burgner e colaboradores encontraram uma associação alélica fraca desse SNP com a malária na população de Gâmbia (171), o que evidencia a necessidade de investigação da influência destes polimorfismos funcionais em diferentes populações de áreas endêmicas de malária.

1.2 Justificativa

A malária continua sendo um problema de saúde pública global causando mais de 400 mil mortes anualmente. No Brasil, apesar da grande redução do número de casos nos últimos sete anos as conquistas alcançadas podem ser comprometidas se as ações de vigilância e controle não forem fortalecidas. Em

2017, o número de casos notificados foi 193.839, um aumento de 34% em relação a 2016.

O *P. vivax* é a espécie predominante no Brasil (88% do total), seguido por *P. falciparum* (10%), infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* (0,6%) e *P. malariae* (0,01%). Embora as perspectivas de eliminação da malária por *P. falciparum* sejam boas, um aumento progressivo nos casos de *P. vivax* permanece um desafio. A presença de portadores assintomáticos e a possibilidade de recaída juntamente com a falta de diagnóstico dos estágios hepáticos inativos (hipnozoítos) são obstáculos para o controle e vigilância dessa espécie plasmodial. Adicionalmente, nas últimas décadas também foram relatadas variações no gene da proteína circunsporozoíta (CS) de *P. vivax*, proteína necessária na formação dos esporozoítos, envolvida na invasão parasitária de hepatócitos e atualmente considerada importante candidata vacinal. Essas variantes de *P. vivax* foram relatadas universalmente e em diversas áreas da Amazônia brasileira. Informações sobre a distribuição geográfica do parasita são importantes para a interpretação precisa dos dados epidemiológicos.

Antes da era do diagnóstico molecular, a sorologia foi usada para identificar indivíduos com infecção atual ou recente e tem sido utilizada para monitorar a intensidade e a exposição da transmissão de *P. falciparum* e *P. vivax*. Embora inúmeros trabalhos tenham utilizado a sorologia para a proteína CS para monitorar as mudanças na transmissão, identificar "hotspots" de transmissão e grupos de alto risco, os dados são discordantes. Dentro deste contexto, avaliamos se a soroprevalência para a proteína CS de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* poderia ser uma boa ferramenta para monitorar a exposição e a distribuição dessas espécies em uma área rural de Porto Velho, Rondônia. Essa área endêmica experimentou um declínio na proporção de casos de *P. falciparum*, um aumento progressivo na proporção de *P. vivax* e poucos casos relatados de *P. malariae*.

A importância dos genes que regulam a resposta imune na malária foi demonstrada em vários estudos. Polimorfismos nos genes codificadores de moléculas, como o sistema HLA e outros genes, como os de citocinas e mediadores da resposta imune têm influência reconhecida na resposta imune específica e na susceptibilidade a infecção. Deste modo, avaliamos a influência de polimorfismos no sistema HLA e nos genes de IFN- γ , IL-10 e óxido nítrico na infecção malárica e na modulação da resposta imune adquirida as proteínas de *P. vivax*.

Os nossos dados, no contexto da eliminação da malária, mostram que fatores que afetam a aquisição e a manutenção de anticorpos antimaláricos são importantes para o desenvolvimento de ferramentas de vigilância sorológica.

A nossa hipótese é de que a proteína CS pode ser utilizada como marcador de exposição recente e transmissão da malária por *P. vivax* na área endêmica e de que polimorfismos gênicos do sistema HLA e dos genes de componentes da resposta imunológica como as citocinas e a iNOS podem causar alterações na aquisição natural da resposta de anticorpos contra a CS, favorecendo a susceptibilidade do hospedeiro ao *Plasmodium* e influenciando a soroprevalência para a CS de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a resposta imune humoral naturalmente adquirida para as proteínas CS de esporozoítos e de estágios eritrocíticos (MSP1 e AMA1) de *P. vivax* e avaliar a influência de polimorfismos no sistema HLA e nos genes de citocinas na modulação da resposta imune em indivíduos de áreas endêmicas da Amazônia brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o diagnóstico das espécies plasmodiais por reação de PCR e sequenciamento das variantes de *P. vivax*;
- Avaliar a resposta imune humoral adquirida para as proteínas CS de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*, e suas variantes genotípicas;
- Verificar se os polimorfismos de HLA influenciam a resposta imune naturalmente adquirida contra a malária e a resposta específica à CS em uma população da Amazônia brasileira exposta à infecção;
- Verificar a presença dos polimorfismos nos genes das citocinas interferon gama e interleucina 10, e da enzima óxido nítrico sintase induzida e suas influências nos níveis plasmáticos e na susceptibilidade à malária em uma população da Amazônia brasileira exposta à infecção.
- Comparar a resposta imune humoral adquirida para as proteínas CS, AMA-1 e MSP-1₁₉ de *P. vivax* e verificar a influência dos polimorfismos das citocinas IFN- γ (IFNG+874T/A) e IL-10 (IL10A-819T/C e IL10A-592A/C), e da molécula de óxido nítrico (NOS2A-954G/C) na resposta.

3 RESULTADOS

3.1 Artigo 1

PEREIRA, V.A.; SÁNCHEZ-ARCILA, J.C.; VASCONCELOS, M.P.; FERREIRA, A.R.; VIDEIRA, L.S.; TEVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D.S.; MARQUES, M.T.Q.; CARVALHO, L.H.; BANIC, D.M.; PORTO, L.C.M.S; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* in the Brazilian Amazon. **Infect Dis Poverty. 2018;**

Esse trabalho teve como objetivo verificar se a prevalência e os níveis de anticorpos para a proteína circunsporozoíta (CS) de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* podem ser utilizados como ferramenta para monitorar a presença e o grau de exposição da população a essas espécies plasmodiais, em áreas endêmicas brasileiras.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon

Virginia Araujo Pereira¹, Juan Camilo Sánchez-Arcila¹, Mariana Pinheiro Alves Vasconcelos², Amanda Ribeiro Ferreira¹, Lorene de Souza Videira¹, Antonio Teva³, Daiana Perce-da-Silva⁴, Maria Teresa Queiroz Marques⁵, Luzia Helena de Carvalho⁶, Dalma Maria Banic⁴, Luiz Cristóvão Sobrino Pôrto⁵ and Joseli Oliveira-Ferreira^{1*}

Abstract

Background: Brazil has seen a great decline in malaria and the country is moving towards elimination. However, for eventual elimination, the control program needs efficient tools in order to monitor malaria exposure and transmission. In this study, we aimed to evaluate whether seroprevalence to the circumsporozoite protein (CSP) is a good tool for monitoring the exposure to and/or evaluating the burden and distribution of *Plasmodium* species in the Brazilian Amazon.

Methods: Cross-sectional surveys were conducted in a rural area of Porto Velho, Rondônia state. Parasite infection was detected by microscopy and polymerase chain reaction. Antibodies to the sporozoite CSP repeats of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* (PvCS, PfCS, and PmCS) were detected using the enzyme-linked immunosorbent assay technique. Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 and DQB1 genes were typed using Luminex® xMAP® technology.

Results: The prevalence of immunoglobulin G against *P. vivax* CSP peptide (62%) was higher than *P. falciparum* (49%) and *P. malariae* (46%) CSP peptide. Most of the studied individuals had antibodies to at least one of the three peptides (72%), 34% had antibodies to all three peptides and 28% were non-responders. Although the majority of the population was not infected at the time of the survey, 74.3% of parasite-negative individuals had antibodies to at least one of the CSPs. Importantly, among individuals carrying the haplotypes DRB1*04~DQB1*03, there was a significantly higher frequency of PfCS responders, and DRB1*16~DQB1*03 haplotype for PvCS and PfCS responders. In contrast, HLA-DRB1*01 and HLA-DQB1*05 allelic groups were associated with a lack of antibodies to *P. vivax* and *P. falciparum* CSP repeats, and the haplotype DRB1*01~DQB1*05 was also associated with non-responders, including non-responders to *P. malariae*.

(Continued on next page)

* Correspondence: lila@ioc.fiocruz.br

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: Our results show that in low transmission settings, naturally acquired antibody responses against the CSP repeats of *P. vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* in a single cross-sectional study may not represent a valuable marker for monitoring recent malaria exposure, especially in an area with a high prevalence of *P. vivax*. Furthermore, HLA class II molecules play an important role in antibody response and require further study with a larger sample size. It will be of interest to consider HLA analysis when using serosurveillance to monitor malaria exposure among genetically diverse populations.

Keywords: Malaria, Circumsporozoite protein, Serological marker, Human leucocyte antigen, IgG antibody, Porto Velho, Rondônia, Brazil

Multilingual abstracts

Please see Additional file 1 for translations of the abstract into the five official working languages of the United Nations.

Background

Malaria remains an acute public health problem, particularly in Sub-Saharan Africa, despite an impressive reduction in the number of cases globally. According to the latest estimates from the World Health Organization, there were 212 million new cases of malaria and 429 000 deaths in 2015 worldwide [1].

In Brazil, major successful control efforts have contributed to the number of cases declining from 615 246 in 2000 to 143 145 in 2014, a reduction of 76.7% [2]. Based on this achievement, the Ministry of Health launched the Plan for the Elimination of Malaria in Brazil, in November 2015 [3]. In 2016, 128 503 cases were reported in Brazil, with *Plasmodium vivax* representing 88.3%, *P. falciparum* 11.7%, and only a few cases of *P. malariae* being reported (however, molecular techniques have detected this species in 9–12% of malaria patients in selected settings) [4, 5]. While the prospects for eliminating *P. falciparum* malaria are good, a progressive increase in *P. vivax* cases remains a challenge [6, 7]. In *P. vivax* infections, the presence of asymptomatic carriers and the possibility of relapse impose additional challenges for surveillance. In addition, there is no current method for diagnosing hypnozoite carriers and *P. vivax* infections that recur after drug treatment can be attributed to relapse arising from the dormant liver stages (hypnozoites) or recrudescence originating from asexual blood-stage parasites that survived drug treatment, or a reinfection resulting from a new mosquito inoculation [8].

The challenge to sustain and ensure malaria elimination is to detect asymptomatic infections in order to block transmission. In endemic areas, the risk of infection has been routinely estimated by parasite prevalence using microscopy and rapid diagnostic tests (RDTs) or estimated using the entomological inoculation rate (EIR) [9, 10]. Microscopy and RDT are easy to deploy, but are

not sensitive enough to detect low-grade infections that are typical of settings with residual malaria transmission. The EIR method is time consuming, requires very large mosquito samples, and has been found to be less accurate in low transmission areas [11]. Many studies have been reporting the evaluation and validation of polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of malaria in the field. However, costs and technical requirements currently hamper their implementation in endemic areas [12].

Prior to the molecular diagnosis era, serology was used to identify subjects with evidence of current or recent infection, with this method having the potential to detect not only ongoing blood stage infections but also symptomatic or asymptomatic infections [13–15]. In recent years, using serological data to monitor *P. falciparum* and *P. vivax* transmission intensity and exposure has gained recognition in the monitoring of changes in transmission, and in identifying hotspots of transmission and high-risk groups [16–19].

Numerous studies conducted in a variety of epidemiological settings have revealed that the levels and seroprevalence of sporozoite antibodies, especially those against the repetitive epitope of circumsporozoite protein (CSP) of *P. falciparum*, are a predictor of parasite exposure over time and are a good indicator of malaria transmission intensity [20–24]. However, the persistence of antibody responses long after malaria transmission has ceased has been reported in a non-endemic region of Brazil and in a low transmission area in Thailand, and long-lived anti-CSP antibody responses have been detected in the absence of a blood-stage infection [25, 26]. Moreover, antibody responses to sporozoite showed some evidence that host genetics, such as human leukocyte antigen (HLA) class II, do affect antibody responses [27–29].

In naturally exposed individuals in the Brazilian Amazon, the expression of HLA-DR7 has been associated with poor responses against the CSP repetitive region of *P. vivax* (VK210), HLA-DR3, and HLA-DR5, with poor responses against N-terminal region [28–30]. In a phase I trial of *P. falciparum* multiple antigen peptide vaccine, the

formulation elicited high levels of parasite-specific antibodies in volunteers expressing DQB1*0603, DRB1*0401, or DRB1*1101 class II molecules [31]. HLA class II molecules may play an important role in antibody response and show huge variability. In humans, this will need to be considered when employing serosurveillance.

In Brazil, a number of cross-sectional studies have aimed to characterize antibody response to CSPs of all three *Plasmodium* species: *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae*. Most of the studies on the antibody responses to CSPs of *P. vivax* and *P. falciparum* point out an association with malaria exposure [24, 32].

In this study, we aimed to test whether seroprevalence to CSPs of *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* is a good tool for monitoring the exposure to and/or evaluating the burden and distribution of these species in a rural area of Porto Velho, Rondônia state. This endemic area has experienced a decline in *P. falciparum* cases, a progressive increase in *P. vivax* cases, and has had a few reported cases of *P. malariae*. The influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allelic products on the antibody responses was also taken into consideration.

Methods

Study population and sample collection

This study comprised of cross-sectional surveys being conducted in a rural community of Porto Velho (63°54' 13' W 8°45' 43' S), municipality of Rondônia state, Brazilian Amazon.

In this region, malaria transmission occurs throughout the year with seasonal fluctuations and an increased number of cases in the dry months between April and September. *Anopheles darlingi* is the main vector in all Amazon areas and is the dominant species in Rondônia [33–35]. The numbers of malaria cases in Rondônia were 43 514 in 2010 and 30 412 in 2011 (when the survey was conducted). In both years, *P. vivax* was the predominant species, accounting for more than 88% malaria cases, there were 10.8% of *P. falciparum* cases in 2010 and 7.2% in 2011, and no *P. malariae* cases were reported [36].

Samples and survey data were collected during the dry months of June–September in 2010 and 2011. Study participants were recruited via visits to their houses, which were randomly selected. Those who were diagnosed at the outpatient clinic were also recruited. The enrolment exclusion criteria were as follows: age < 10 years old, pregnancy, breastfeeding, antimalarial drug use, mental disorders, and status as a member of an indigenous population. Informed consent was obtained from all participants and the protocol of this study was reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee (CEP/FIOCRUZ, 492/08).

All individuals answered a questionnaire and were asked if they had any symptoms, such as fever, headaches, chills, myalgia, and/or nausea. After the epidemiological survey was conducted, blood was drawn from each participant by venipuncture and malaria infection was diagnosed by microscopic examination of Giemsa-stained blood smears and PCR using primers specific for genus (*Plasmodium* spp.) and species (*P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae*). The amplification protocols have been described previously [37].

Subjects were considered positive for *Plasmodium* infection if they were positive according to the thick blood smear and/or PCR. The parasitological evaluations were performed by examination of 200 fields at 1000-fold magnification under oil immersion. Parasite densities were estimated by counting the number of parasites per microliter of blood (all species and stages) per 200 leukocytes in thick blood films, multiplying this by the number of individual leukocytes, and dividing this by 200. All smear-positive individuals were treated with antimalarial drugs, as according to the protocol of the Brazilian Ministry of Health.

Peptide synthesis

Synthetic peptides representing the repeated immunodominant epitope of the CSP were used as an antigen for the detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies. For *P. vivax*, all three variant sequences were used: *P. vivax* VK210 DGQPAGDRAAGQPAG-(DRADGQPAG)₂, *P. vivax* VK247 (ANGAGNQPAG)₃-ANGAGN, and *P. vivax*-like (APGANQEGGAA)₃. For *P. falciparum* and *P. malariae*, sequences (NANP)₈ and (GNAA)₂-GNDA-(GNAA)₄ were used, respectively.

Measuring IgG responses

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the CSP was conducted, as previously described [38]. Briefly, MaxiSorp™ plates (Nunc, Carlsbad, CA, USA) were coated with 5 µg/ml of the synthetic peptides representing CSP repeats of *P. vivax* (PvCS), *P. falciparum* (PfCS), and *P. malariae* (PmCS), and incubated overnight at 4 °C. Individual plasma samples were assayed at a dilution of 1:100 for one hour at 37 °C. Bound antibodies were detected by IgG-peroxidase conjugated goat anti-human IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), followed by O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and hydrogen peroxide. The optical densities (ODs) were recorded on an ELISA reader (BioTek ELx800™) at 490 nm. On each plate, reactive standard sera and non-reactive standard sera from individuals living in non-endemic areas who have never been exposed to malaria infection were placed. Results were expressed as reactivity index (RI), which was

calculated by dividing the mean OD values of tested samples by the mean plus three standard deviations (SDs) of negative controls tested simultaneously. Samples with an RI greater than 1 were considered positive for the CSP peptide tested. In the case of *P. vivax*, positive samples presenting RI > 1 for any of the three CSP repeats representing *P. vivax* CSP genotypes (VK210, VK247, and *P. vivax*-like) were considered.

HLA genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) using QIAamp[®] DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA). The concentration and quality of all DNA were analysed using NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes were typed using a Luminex[®] Multi-analyte profiling system (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA). This system uses LABType[®] SSO One Lambda typing kit (One Lambda, Inc., CA, USA) and is based on the PCR sequence-specific oligonucleotide probes. The highly polymorphic exons 2 of the HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes were amplified using the kit-specific primer pairs. The 5' ends of the upstream primers were labeled with biotin. Hybridized amplicons were labeled with streptavidin, R-phycoerythrin, and quantified on the Luminex[®] 100[™] flow analyzer (One Lambda, Inc., CA, USA). The hybridized patterns were classified using HLA Visual 2.0 software (One Lambda, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Analysis were done using Epi Info[™] 2002 (CDC, Atlanta, GA, USA), GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and R version 3.4.0 (Vienna, Austria) [39]. Differences in medians in terms of the study population data were calculated using the non-parametric Mann–Whitney U test. The student's t-test was used to compare the means of normally distributed data, or normalized transformations were performed on raw data before testing by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences in the proportions of the frequencies between variables were evaluated using the chi-square (χ^2) test. Associations between antibody levels and epidemiological data were assessed with Spearman's rank correlation. Overall associations of antibody responses with the alleles from each HLA-DRB1* and HLA-DQB1* loci were evaluated by comparing the allele frequencies between seronegative (non-responders) and seropositive (responders) subjects using a Fisher's exact test 2×2 contingency table. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Characteristics of the study participants

Details about the study population are summarized in Table 1. Three hundred and fifty-seven individuals were enrolled in this study. The majority of individuals included in this study were randomly selected ($n = 285$). Only 72 individuals were recruited from the outpatient clinic, but they lived in the same area as the other participants and had similar exposure to malaria infections.

Table 1 Epidemiological characteristics of study participants

		Malaria diagnosis			P-value
		Positive <i>n</i> = 98	Negative <i>n</i> = 259	Total <i>n</i> = 357	
Gender <i>n</i> (%)	Female	30 (19.4)	125 (80.6)	155 (43.4)	0.003
	Male	68 (33.7)	134 (66.3)	202 (56.6)	
Age (years)		30.2 ± 11.6	30.5 ± 15.5	30.4 ± 14.5	0.862
Time of residence in endemic area		25.6 ± 11.5	24.2 ± 13.1	24.5 ± 12.7	0.352
Previous malaria infection		7.7 ± 12.4	11.7 ± 15.2	10.6 ± 14.5	0.021
Time since last malaria infection		29.7 ± 69.4	41.6 ± 66.7	38.3 ± 67.5	0.137
Previous <i>Plasmodium</i> species					
	<i>P. vivax</i>	35 (47.3)	71 (32.0)	106 (35.8)	0.236
	<i>P. falciparum</i>	1 (1.4)	13 (5.9)	14 (4.7)	
	<i>P. vivax/P. falciparum</i>	38 (51.3)	137 (61.6)	175 (59.1)	
Current <i>Plasmodium</i> species					
	<i>P. vivax</i>	–	–	71 (72.5)	< 0.0001
	<i>P. falciparum</i>	–	–	26 (26.5)	
	<i>P. vivax/P. falciparum</i>	–	–	1 (1.0)	

Gender: *n* (%); Age: mean ± SD; Time of residence in endemic area (years): mean ± SD; Previous malaria infection: mean ± SD; Time since the last malaria infection (months): mean ± SD; Previous *Plasmodium* species: *n* (%); Current *Plasmodium* species: *n* (%)

Parasite prevalence determined by microscopy and/or PCR was 27% (71 had *P. vivax*, 26 had *P. falciparum*, and one had a mixed infection). It is worth noting that all individuals testing positive by microscopy were also positive by PCR, except five individuals who were found positive only by PCR.

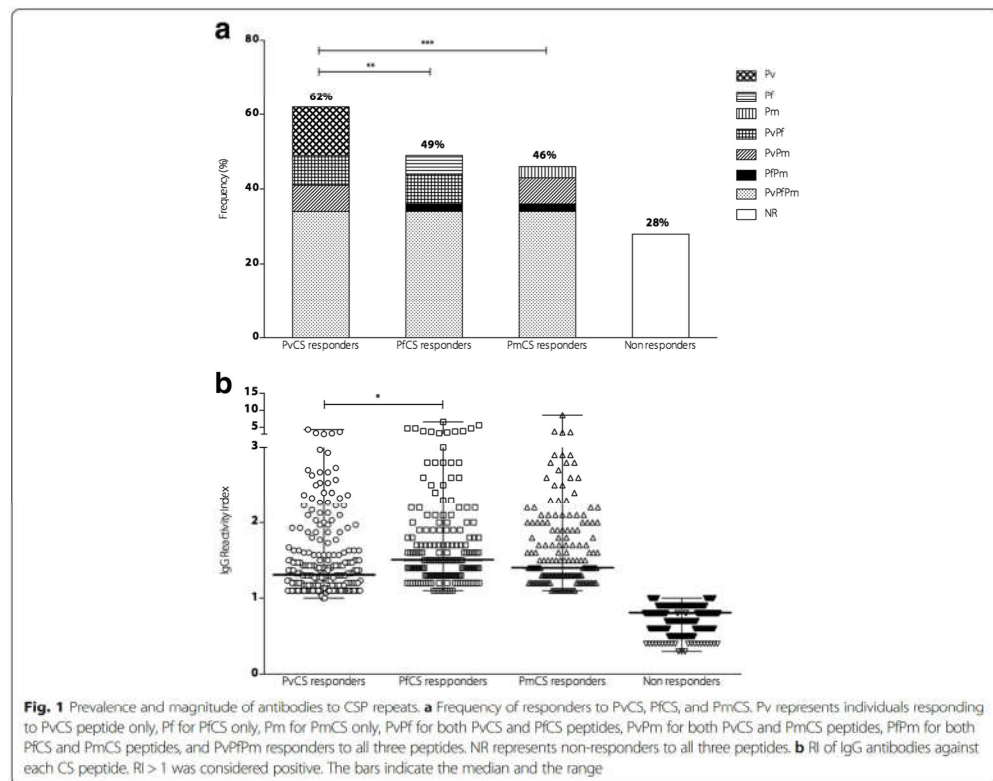
The proportion of males to females was not significant, but the infection rate was higher in males. No differences were observed in the mean age, time of residence in endemic area, and time elapsed since the last malaria episode between parasite-positive and parasite-negative individuals. However, individuals who were parasite-negative recalled a higher number of previous malaria episodes than those who were parasite-positive. The studied population recalled, by memory, having had previous episodes with confirmed diagnosis of *P. vivax* or *P. falciparum* malaria, but no history of *P. malariae*.

Malaria-associated symptoms were present in 86.7% of the infected individuals, even though they all reported repeated malaria infections. The most common symptoms

reported by the participants at the time of blood collection were fever (66%), headaches (76%), chills (54%), myalgia (57%), and nausea (43%).

Naturally acquired antibody responses against the CSP

The prevalence of naturally acquired antibodies to PvCS, PfCS, and PmCS was measured. Of the study participants, 72% presented IgG against at least one of the three peptides. The prevalence of IgG against PvCS (62%) was higher than PfCS (49%, $P < 0.01$) and PmCS (46%, $P < 0.001$). Most of the individuals had antibodies to at least one of the three peptides (72%), 34% had antibodies to all three peptides and 28% were non-responders. Although *P. malariae* was not detected by microscopy or PCR in the study population, the prevalence of antibodies to PmCS (46%) was similar to PfCS (49%) (see Fig. 1a). Levels of antibodies, expressed as the RI, were significantly higher in responders to PfCS than to PvCS (see Fig. 1b). However, the IgG RI of anti-CS antibody was also not associated with time of residence in endemic area ($r = 0.048$, $P = 0.36$ for PvCS; $r = 0.04$, $P = 0.45$ for PfCS, and $r = 0.058$, $P = 0.27$ for PmCS) or number of

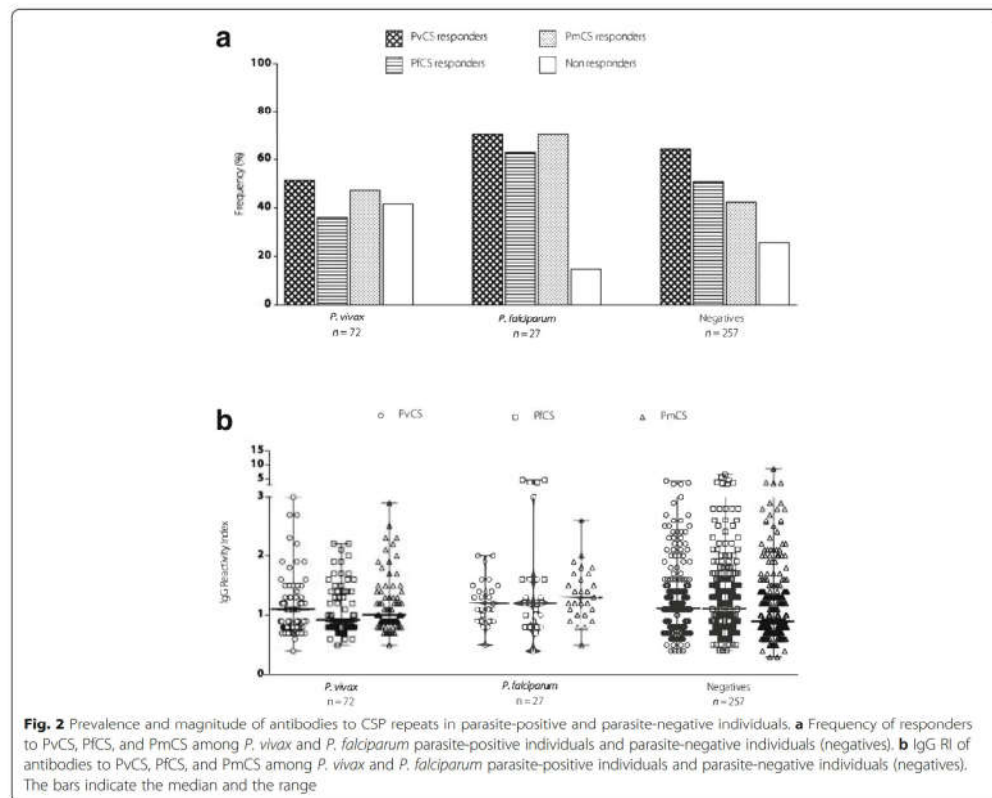


past malaria infections ($r = 0.016$, $P = 0.75$ for PvCS; $r = 0.010$, $P = 0.84$ for PfCS, and $r = 0.053$, $P = 0.31$ for PmCS). We did not find any association between antibody responses and age ($r = 0.006$, $P = 0.11$ for PvCS; $r = 0.009$, $P = 0.06$ for PfCS, and $r = 0.004$, $P = 0.21$ for PmCS).

Effect of *P. falciparum* and *P. vivax* infections on IgG positivity and magnitude

The prevalence and magnitude of specific CSP antibodies in parasite-positive individuals showed that 51.4% of *P. vivax*- and 62.9% of *P. falciparum*-infected individuals had antibodies to the corresponding CSP repeats. In individuals diagnosed with *P. vivax*, the prevalence of antibodies to PvCS was similar to PfCS and PmCS, and 41.7% were non-responders. In individuals diagnosed with *P. falciparum*, the prevalence of antibodies to PfCS was also similar to PvCS and PmCS. However, only 14.8% were non-responders, and the prevalence of antibodies to PfCS and PmCS were significantly higher in individuals

with *P. falciparum* when compared to *P. vivax*-infected individuals. Although the majority of the population (72%) was not infected at the time of the survey ($n = 257$), 74.3% of the parasite-negative individuals had antibodies to at least one of the CSPs. Among the parasite-negative individuals, the prevalence of antibodies to PvCS was significantly higher when compared to PfCS ($P < 0.01$) and PmCS ($P < 0.0001$), and 25.7% were non-responders (see Fig. 2a). Comparing the antibody levels between malaria-positive and malaria-negative individuals, the presence of parasites did not have any impact on the IgG RI of responders. Likewise, no significant differences were observed in the magnitude of PvCS antibodies in *P. vivax* parasite-positive individuals and PfCS antibodies in *P. falciparum* parasite-positive individuals. Although individuals who were parasite-negative seemed to have higher antibody levels, no significant differences were observed between parasite-positive and parasite-negative individuals for all three CSPs (see Fig. 2b).



Antibody responses to CSP according to the time elapsed since the last malaria infection

To investigate the ability of the CSP antibody to determine whether individuals had been infected in the recent past, we compared the prevalence and the RI of anti-CSP antibodies according to the time elapsed since the individuals' last malaria infection according to their recall in memory.

Individuals positive for malaria were assigned as having malaria in the last ≤ 1 month. Figure 3a shows that the frequency of responders to PvCS, PfCS, and PmCS did not significantly differ between individuals who had been infected more recently (≤ 1 month and (1, 12] months). In individuals who had the last malaria infection over a year ago (> 12 months), the prevalence rates of antibodies to PvCS and PfCS were higher when compared with individuals more recently infected. The IgG RI to PvCS, PfCS, and PmCS did not differ according to the time since the last malaria infection. It is noteworthy that among individuals who reported their last malaria infection over the past 12 months, IgG levels to PfCS and PmCS were higher when compared to PvCS (see Fig. 3b). However, no association was observed between the IgG RI and time elapsed since the last malaria infection for all the CSP antigens ($r = 0.009$, $P = 0.85$ for PvCS;

$r = 0.015$, $P = 0.78$ for PfCS, and $r = 0.024$, $P = 0.64$ for PmCS).

HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele and antibody responses

Considering that HLA class II molecules play an important role in antibody response and that 28% of individuals did not respond to all three CSP peptides, we evaluated the influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on the naturally acquired IgG responses to the CSPs of *P. vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* in 280 individuals. The frequency of each allele in responders and non-responders to all three CSPs are summarized in Table 2.

Common allele groups ranged from 13 at the HLA-DRB1 locus and five at the HLA-DQB1 locus. The predominant HLA-DRB1 allelic groups were HLA-DRB1*04 (16%) and HLA-DRB1*13 (14%), and the most frequent HLA-DQB1 were HLA-DQB1*03 (38%) and HLA-DQB1*06 (21%). Although 72% of the population were positive to at least one of the peptides, the frequency of HLA-DRB1*01 was significantly higher in non-responders to PvCS and PfCS and HLA-DQB1*05 in non-responders to PvCS and PfCS. In contrast, we observed a higher frequency of HLA-DQB1*02 genotype in responders to PfCS peptide. Antibodies to PmCS showed no association with particular HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genotypes.

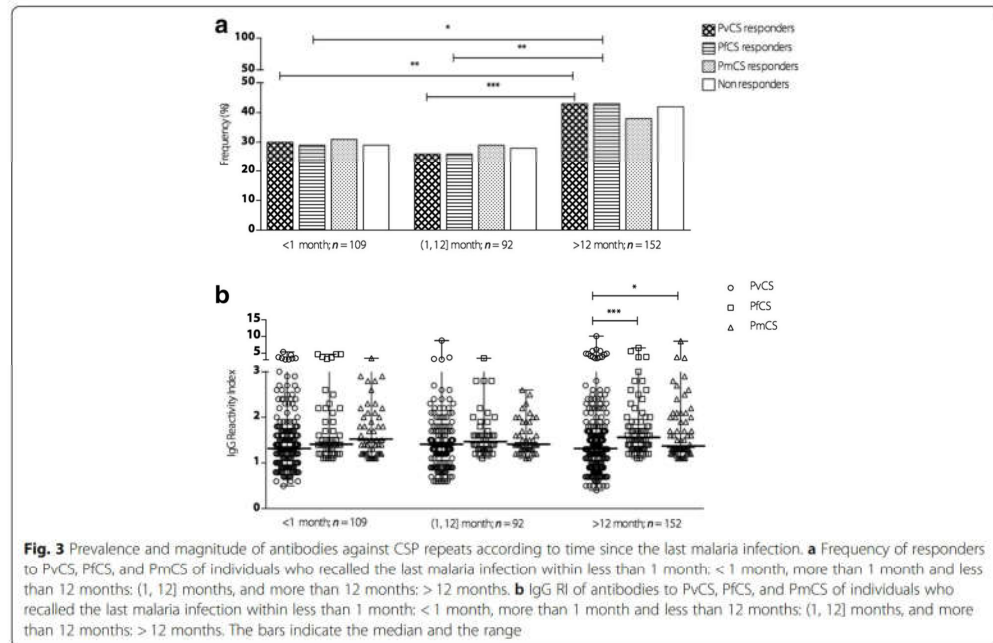


Table 2 Frequency (f) and number (n) of antibody responders (R) and non-responders (NR) to CS peptide repeats for *P. vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* according to HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genotypes

	PvCS		PfCS		PmCS	
	R	NR	R	NR	R	NR
	f (n)	f (n)	f (n)	f (n)	f (n)	f (n)
HLA-DRB1						
DRB1*01	0.05 (18)	0.15 (30) ***	0.04 (12)	0.13 (36) ***	0.06 (15)	0.11 (33)
DRB1*03	0.06 (23)	0.05 (9)	0.06 (17)	0.05 (15)	0.06 (16)	0.05 (16)
DRB1*04	0.16 (59)	0.15 (29)	0.18 (52)	0.13 (36)	0.14 (35)	0.17 (53)
DRB1*07	0.12 (43)	0.08 (16)	0.13 (36)	0.08 (23)	0.11 (27)	0.10 (32)
DRB1*08	0.07 (27)	0.10 (19)	0.09 (25)	0.08 (21)	0.09 (23)	0.07 (23)
DRB1*09	0.02 (9)	0.03 (6)	0.02 (6)	0.03 (9)	0.02 (6)	0.03 (9)
DRB1*10	0.03 (12)	0.02 (3)	0.01 (4)	0.04 (11)	0.03 (7)	0.03 (8)
DRB1*11	0.11 (40)	0.10 (19)	0.10 (27)	0.12 (32)	0.12 (31)	0.09 (28)
DRB1*12	0.01 (2)	0.03 (5)	0.01 (3)	0.01 (4)	0.01 (3)	0.01 (4)
DRB1*13	0.15 (56)	0.11 (22)	0.15 (41)	0.13 (37)	0.14 (34)	0.14 (44)
DRB1*14	0.04 (16)	0.04 (7)	0.05 (13)	0.04 (10)	0.04 (9)	0.05 (14)
DRB1*15	0.09 (33)	0.10 (19)	0.08 (23)	0.10 (29)	0.10 (26)	0.08 (26)
DRB1*16	0.08 (28)	0.05 (10)	0.08 (23)	0.05 (15)	0.07 (18)	0.06 (20)
HLA-DQB1						
DQB1*02	0.17 (62)	0.12 (24)	0.19 (53)*	0.12 (33)	0.17 (43)	0.14 (43)
DQB1*03	0.40 (145)	0.34 (65)	0.41 (116)	0.34 (94)	0.38 (96)	0.37 (114)
DQB1*04	0.08 (30)	0.08 (16)	0.07 (21)	0.09 (25)	0.06 (16)	0.10 (30)
DQB1*05	0.15 (54)	0.24 (47) **	0.13 (36)	0.23 (65) *	0.17 (42)	0.19 (59)
DQB1*06	0.20 (74)	0.22 (42)	0.20 (55)	0.22 (61)	0.21 (52)	0.21 (64)

The association was verified using a Fisher's exact test 2 × 2 contingency table; *P < 0.01, ** P < 0.001, *** P < 0.0001. Each individual contributed with two HLA allele observations

Evaluation of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 haplotypes and antibody responses

Associations attributed to individual DRB1 and DQB1 allele groups were partially reflected by the DRB1~DQB1 haplotypes. These allele groups contributed to 10 common DRB1~DQB1 haplotypes.

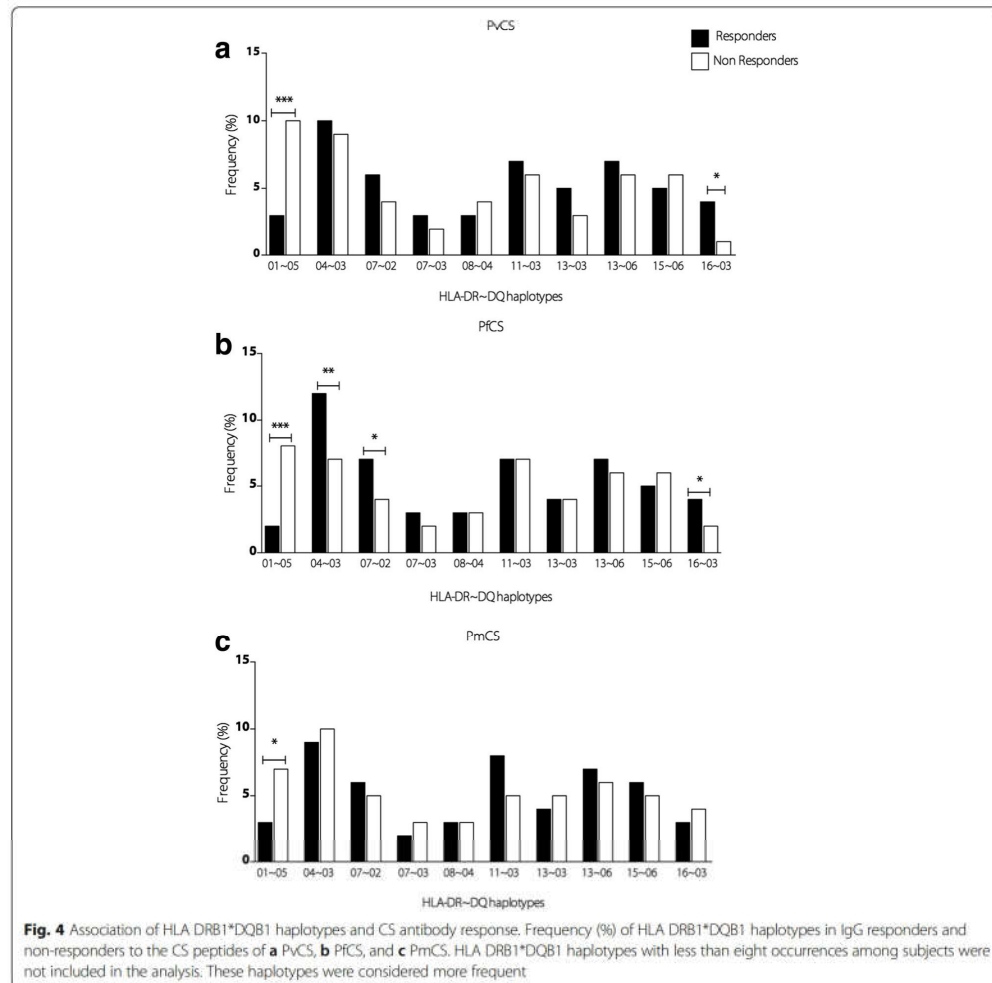
Frequencies of responders and non-responders to each peptide according to the haplotypes are described in Fig. 4. The association between DRB1*01 and DQB1*05 of non-responders was mostly due to DRB1*01~DQB1*05 haplotype for PvCS, PfCS, and PmCS. The positive association of DQB1*02 with responders to PfCS was mainly because of the DRB1*07~DQB1*02 haplotype. Among individuals carrying the haplotypes DRB1*04~DQB1*03, there was a significantly higher frequency of responders to PfCS, and DRB1*16~DQB1*03 haplotype for PvCS and PfCS.

Discussion

Malaria elimination is on the agenda of the control program in Brazil, and effective monitoring of disease transmission is crucial. From 2007 to 2017, *P. falciparum* has been decreasing (under 11%), *P. vivax* has become the

predominant species (88%), and only a few cases of *P. malariae* have been reported in Rondônia state. This epidemiological situation gave us the opportunity to investigate whether seroprevalence to the CSPs of *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* is a good tool for monitoring the exposure to and/or evaluating the burden and distribution of these species in a rural area of Porto Velho, Rondônia.

Our results show that antibody responses against the CSP repeats of *P. vivax* and *P. falciparum* were higher than those estimated based on blood analysis and/or PCR, and revealed the presence of anti-CSP antibody to *P. malariae*. This is not surprising as a high prevalence of anti-CSP antibody to *P. malariae* has been reported in five states of the Amazon, including Rondônia [32]. Although we did not detect *P. malariae* infection by PCR, this species seems to be more common than suggested by official data based on microscopy. Studies using nested PCR have found significantly more cases of *P. malariae* infection in patients from Rondônia (10%) and Mato Grosso (11.9%) [4, 5, 32]. In addition, case reports documented that *P. malariae* has the ability to persist in a single host for decades as a chronic, low-



density, asymptomatic infection, and there is a risk of recurrence decades after initial exposure, even when the infected individuals have left the endemic region [40–42]. Even though *P. malariae* reported cases in Rondonia have been rare, the high prevalence of antibodies to the CSP repeats of *P. malariae* in the absence of detected cases during the surveys could be due to the presence of antibodies cross-reacting with *P. vivax*, *P. falciparum* or with the simian *P. brasilianum* antigens [43]. Indeed, *P. malariae* and *P. brasilianum* share identical CS repeat sequences and do not segregate into distinct types in all genomic markers used so far [44].

Overall, production of anti-CSP antibodies was independent of a blood-stage infection. Current or recent blood infections appear to have little impact on seropositivity and do not seem to boost the anti-CSP response, as prevalence and levels of anti-CSP antibodies were not significantly different between parasite-positive and parasite-negative individuals. This is consistent with other studies that showed the absence of anti-CS antibody responses in individuals with confirmed exposure to *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* [24, 45–48]. However, it also important to note that in the case of *P. vivax*, the presence of blood stage infection does not necessarily indicate

a new infection as it may be due to a relapse. It is not known if the presence of hypnozoites/relapses could influence serological profile, especially those against sporozoites.

Numerous studies that evaluated anti-CSP antibody responses in endemic populations showed that an anti-sporozoite humoral immune response was independent of a blood stage infection, but correlates with exposure and increases with age [49–51]. We were unable to establish a correlation between specific anti-CSP responses and age, time of residence in endemic area, number of previous malaria infections, and time elapsed since the last malaria infection, corroborating with previous observations that anti-CSP antibodies do not necessarily correlate with recent exposure [17, 46, 47]. However, seroprevalence indicates ongoing exposure to all three *Plasmodium* species in the area.

As infection and exposure refer to infective bites by a mosquito regardless whether it results in a blood-stage infection, it is difficult to obtain data that reflect individual natural exposure to infective bites. On the other hand, several studies showed that anti-CSP antibody responses change with seasonal or geographical transmission intensity. In low transmission settings, anti-CSP antibodies formed at a slower rate and decayed at a faster rate compared to anti-blood-stage antibodies [21]. In contrast, half-life of antibodies against CSP has been reported as long as several years in a malaria outbreak in Brazil and in Africa, and as short as 27 days in Thailand [25, 52, 53].

Although we were unable to establish a correlation between time since the last malaria infection and specific anti-CSP responses, the prevalence of antibodies to PvCS and PfCS was higher in individuals for whom the time elapsed since the last malaria infection was more than one year ago.

One major limitation of our study is that serological measures were performed from a single cross-sectional survey at the malaria transmission season and changes in prevalences and the persistence of antibodies to the CSP after the end of the transmission was not evaluated. Interestingly, in our study, a proportion of naturally exposed individuals remained unresponsive to all CSP repeats (28%), even after a history of repeated malaria exposures and current *P. falciparum* and *P. vivax* infection. Non-responsiveness to CSP in a proportion of individuals living in endemic areas is a well-documented finding and several studies have reported an association between specific HLA alleles and immune response to malaria antigen [28, 54]. In the current study, HLA-DRB1*01 and HLA-DQB1*05 allelic groups were associated with a lack of antibodies to PvCS and PfCS, and the haplotype DRB1*01~DQB1*05 was also associated with non-responders, including non-responders to *P. malariae*.

Interestingly, according to the Brazilian National Registry of Bone Marrow Voluntary Donors, the allelic frequency of DRB1*01 in the Amazon region is 19.73% and in Rondônia, it is 19.79% [55]. In addition, in 99.3% and 98.9% of times (Amazon region and Rondônia, respectively) that both DRB1 and DQB1 were typed, the presence of DRB1*01 was associated with DQB1*05 allele, indicating a total linkage disequilibrium. Considering that the DRB1*01 allele is frequent in the studied population and in the Amazon region, although the ethnicity of the population may impact the frequency of HLA, a great number of individuals could be non-responders. HLA-DRB1*01 was also negatively associated with repetitive regions of *P. vivax* MSP-9 antigen in the Brazilian Amazon, and HLA-DQB1*05 along with HLA-DRB1*13 has been associated with a reduced susceptibility to severe malaria in Gambian children [28, 51, 54].

In contrast, we observed a higher frequency of DRB1*07~DQB1*02 and DRB1*04~DQB1*03 haplotypes in responders to PfCS, and DRB1*16~DQB1*03 haplotype for both PfCS and PvCS. These antibody responses did not seem to be related to exposure as no difference was observed between time of residence, number of previous malaria infection, and time since the last malaria infection, and the presence of these alleles.

Conclusions

Our results show that in a low transmission setting, naturally acquired antibody responses against the CSP repeats of *P. vivax*, *P. falciparum*, and *P. vivax* measured in a single cross-sectional study may not represent a valuable marker for monitoring recent malaria exposure, especially in an area with a high prevalence of *P. vivax*. Furthermore, HLA class II alleles (HLA-DRB1*01, HLA-DQB1*02, and HLA-DQB1*05) were associated with antibody response for CSP of *P. vivax* and *P. falciparum*, and it will be of interest to consider a HLA analysis when using serosurveillance among genetically diverse populations. In the context of malaria elimination, factors affecting the acquisition and maintenance of antimalarial antibodies are important for the development of serosurveillance tools.

Additional file

Additional file 1: Multilingual abstracts in the six official working languages of the United Nations. (PDF 666 kb)

Abbreviations

CS: Circumsporozoite; CSP: Circumsporozoite protein; EIR: Entomological inoculation rate; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; HLA: Human leukocyte antigen; IgG: Immunoglobulin G; OD: Optical density; PCR: Polymerase chain reaction; PfCS: Circumsporozoite protein repeats of *P. falciparum*; PmCS: Circumsporozoite protein repeats of *P. malariae*; PvCS: Circumsporozoite protein repeats of *P. vivax*; RDT: Rapid diagnostic test; RI: Reactivity index; SD: Standard deviation

Acknowledgments

We thank the Secretary of Health of Rondônia state and the Laboratório Central – LACEN of Rondônia for fieldwork support. We are grateful to all individuals who participated for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible.

Funding

This work was supported by grants from PRONEX Rede Malaria, Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) (5555659/2009-7) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (E-26/170.003/2010). JO-F is a recipient of research productivity fellowships from the CNPq (307659/2016-0). VAP is the recipient of a CNPq fellowship (142104/2014-0). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the paper.

Authors' contributions

JO-F conceived the study, participated in its design, coordinated the field survey and sample collection, and helped to draft and revise the paper. VAP participated in the study design, carried out the ELISA assays, performed the statistical analysis, and wrote the paper. JCS-A and MPAV collected the data during the field surveys and laboratory processed field-collected samples. MPAV, AT, DP-d-S, DMB, and JO-F conducted the fieldwork and sample collection. DP-d-S, DMB, and LIdC performed the parasitological diagnosis by microscopy and PCR. LCdMSP, MTQM, and ARF performed the HLA experiments. VAP, JCS-A, and LdSV performed the antibody assays. VAP analysed the data, with support from JCS-A and JO-F. All authors read and approved the final version of this paper for publication.

Ethics approval and consent to participate

The protocol of this study was reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee (CEP/FIOCRUZ, 492/08). Informed consent was obtained from all participants.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ²Institute of Infectology Emilio Ribas, São Paulo, São Paulo, Brazil. ³Laboratory of Immunodiagnosis, Department of Biological Sciences, National School of Public Health/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Laboratory of Clinical Immunology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Laboratory of Histocompatibility and Cryopreservation – HLA of DHE/IBRAG/UFERJ, Rio de Janeiro, Brazil. ⁶Molecular Biology and Malaria Immunology Research Group, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Received: 11 July 2017 Accepted: 19 April 2018

Published online: 14 May 2018

References

- Organization WH. World malaria report 2016. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>. Accessed 24 Apr 2017.
- Pan American Health Organization. Report on the situation of Malaria in the Americas, 2014. Washington, D.C.: PAHO; 2016. ISBN: 978-92-75-11928-0.
- Saúde Md. Governo lança Plano de Eliminação da Malária no Brasil. Available at: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/11/governo-lanca-plano-de-eliminacao-da-malaria>. Accessed 26 Apr 2017.
- Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacas-Mato Grosso state) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop*. 2004;90:61–4.
- Cavasin MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33:489–92.
- Siqueira AM, Mesones-Lapouble O, Marchesini P, et al. *Plasmodium vivax* landscape in Brazil: scenario and challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:87–96.
- Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:555–66.
- Jimenez A, Rees-Channer RR, Perera R, et al. Analytical sensitivity of current best-in-class malaria rapid diagnostic tests. *Malar J*. 2017;16:128.
- Drakeley C, Schellenberg D, Kihonda J, et al. An estimation of the entomological inoculation rate for Ifakara: a semi-urban area in a region of intense malaria transmission in Tanzania. *Tropical Med Int Health*. 2003;8:767–74.
- Oesterholt MJ, Bousema JT, Mwerinde OK, et al. Spatial and temporal variation in malaria transmission in a low endemicity area in northern Tanzania. *Malar J*. 2006;5:98.
- Hanscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol*. 2002;18:395–8.
- Kagan IG, Mathews H, Sulzer AJ. The serology of malaria: recent applications. *Bull N Y Acad Med*. 1969;45:1027–42.
- Bruce-Chwatt LJ. Seroepidemiology of malaria. *J Parasitol*. 1970;56:552–5.
- Bruce-Chwatt LJ, Draper CC, Konforton P. Seroepidemiological evidence of eradication of malaria from Mauritius. *Lancet*. 1973;2:547–51.
- Cunha MG, Silva ES, Sepulveda N, et al. Serologically defined variations in malaria endemicity in Para state. *Brazil PLoS One*. 2014;9:e113357.
- Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5108–13.
- Dewasurendra RL, Dias JN, Sepulveda N, et al. Effectiveness of a serological tool to predict malaria transmission intensity in an elimination setting. *BMC Infect Dis*. 2017;17:49.
- Bousema T, Drakeley C, Gesase S, et al. Identification of hot spots of malaria transmission for targeted malaria control. *J Infect Dis*. 2010;201:1764–74.
- Bwire R, Sloomman EJ, Verhave JP, Bruins J, Doctors van Leeuwen WM. Malaria anticircumsporozoite antibodies in Dutch soldiers returning from sub-Saharan Africa. *Tropical Med Int Health*. 1998;3:66–9.
- Kusi KA, Bosomprah S, Dodoo D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malar J*. 2014;13:103.
- Kusi KA, Bosomprah S, Kyei-Baafour E, et al. Seroprevalence of antibodies against *Plasmodium falciparum* Sporozoite antigens as predictive disease transmission markers in an area of Ghana with seasonal malaria transmission. *PLoS One*. 2016;11:e0167175.
- Nothdurft HD, Jelinek T, Bluml A, von Sonnenburg F, Loscher T. Seroconversion to circumsporozoite antigen of *Plasmodium falciparum* demonstrates a high risk of malaria transmission in travelers to East Africa. *Clin Infect Dis*. 1999;28:641–2.
- Webster HK, Gingrich JB, Wongsrichanalai C, et al. Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47:489–97.
- Braga EM, Fontes CJ, Kretzli AU. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis*. 1998;177:1132–5.
- Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, et al. Acquisition and longevity of antibodies to *Plasmodium vivax* Preerythrocytic antigens in western Thailand. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;23:117–24.
- Johnson AH, Leke RG, Mendell NR, et al. Human leukocyte antigen class II alleles influence levels of antibodies to the *Plasmodium falciparum* asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 2004;72:2762–71.
- Lima Junior JC, Rodrigues da Silva RN, Banic DM, et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3alpha and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS One*. 2012;7:e36419.
- Storti-Melo LM, da Costa DR, Souza-Neiras WC, et al. Influence of HLA-DRB1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. *Acta Trop*. 2012;121:152–5.
- Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. Vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop*. 2004;92:63–9.
- Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, et al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *J Infect Dis*. 2000;182:1486–96.
- Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human

- malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:367–71.
33. Lourenço-de-Oliveira RGA, Arlé M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondônia state, Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989;84:501–14.
 34. Deane LM, Daniel Ribeiro C, Lourenço de Oliveira R, Oliveira-Ferreira J, Guimarães AE. Study on the natural history of malaria in areas of the Rondonia state-Brazil and problems related to its control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1988;30:153–6.
 35. Tadei WP, Dutary TB. Malaria vectors in the Brazilian amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:87–94.
 36. National Programme for malaria Prevention and Control MoHoBA. Available at: <http://portalm.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria/acoes-do-programa-de-malaria>. Accessed 24 Apr 2017.
 37. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315–20.
 38. Nardin EH, Nussenzweig RS, Altszuler R, et al. Cellular and humoral immune responses to a recombinant *P. falciparum* CS protein in sporozoite-immunized rodents and human volunteers. *Bull World Health Organ*. 1990;68(Suppl):85–7.
 39. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. <http://www.R-project.org/>.
 40. Chadee DD, Tilluckdharry CC, Maharaj P, Sinanan C. Reactivation of *Plasmodium malariae* infection in a Trinidadian man after neurosurgery. *N Engl J Med*. 2000;342:1924.
 41. Chadee DD, Beier JC, Doon R. Re-emergence of *Plasmodium malariae* in Trinidad, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93:467–75.
 42. Siala E, Khalfaoui M, Bouratbine A, Hamdi S, Hilli K, Aoun K. Relapse of *Plasmodium malariae* malaria 20 years after living in an endemic area. *Presse Med*. 2005;34:371–2.
 43. Nahrendorf W, Scholzen A, Sauerwein RW, Langhorne J. Cross-stage immunity for malaria vaccine development. *Vaccine*. 2015;33:7513–7.
 44. Guimarães LO, Bajaj MM, Wunderlich G, et al. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Trop*. 2012;124:27–32.
 45. Del Giudice G, Engers HD, Toungne C, et al. Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;36:203–12.
 46. Burkot TR, Graves PM, Wirtz RA, et al. Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* circumsporozoite proteins in a human population. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1346–51.
 47. Project KM. The level of anti-sporozoite antibodies in a highly endemic malaria area and its relationship with exposure to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86:499–504.
 48. Campo JJ, Whitman TJ, Frelich D, Burgess TH, Martin GJ, Doolan DL. Toward a surrogate marker of malaria exposure: modeling longitudinal antibody measurements under outbreak conditions. *PLoS One*. 2011;6:e21826.
 49. Del Giudice G, Lambert PH, Mendis K, Pessi A, Tanner M. Antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites in areas with stable and unstable malaria. *Bull World Health Organ*. 1990;68(Suppl):191–6.
 50. Esposito F, Lombardi S, Modiano D, et al. Immunity to *Plasmodium* sporozoites: recent advances and applications to field research. *Parassitologia*. 1986;28:101–5.
 51. Tapchaisri P, Asavanich A, Limsuwan S, Tharavanij S, Harinasuta KT. Antibodies against malaria sporozoites in patients with acute uncomplicated malaria and patients with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34:831–6.
 52. Drulhe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun*. 1986;53:393–7.
 53. Webster HK, Boudreau EF, Pang LW, Permpanch B, Sookto P, Wirtz RA. Development of immunity in natural *Plasmodium falciparum* malaria: antibodies to the falciparum sporozoite vaccine 1 antigen (R32tet32). *J Clin Microbiol*. 1987;25:1002–8.
 54. Hill AW, Allsopp CE, Kwiatkowski D, et al. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 1991;352:595–600.
 55. REDOME. Available at: <http://redome.inca.gov.br/o-redome/>. Accessed 30 Aug 2017.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3.2 Artigo 2

PEREIRA, V.A.; SÁNCHEZ-ARCILA, J.C.; TEVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D.S.; VASCONCELOS, M.P.; LIMA, C.A.; APRÍGIO, C.J.; RODRIGUES-DA-SILVA, R.N.; SANTOS, D.O.; BANIC, D.M.; BONECINI-ALMEIDA, M.G.; LIMA-JÚNIOR, J.C.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon. **Malar J.** 2015; 14:30. doi: 10.1186/s12936-015-0548-z.

Este trabalho investiga a presença dos polimorfismos nos genes das citocinas interferon gama (IFNG) e interleucina 10 (IL10A), e da enzima óxido nítrico sintase induzida e sua influência nos níveis plasmáticos e na susceptibilidade à malária em uma população da Amazônia brasileira exposta à infecção.

RESEARCH

Open Access

IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon

Virginia A Pereira¹, Juan C Sánchez-Arcila¹, Antonio Teva², Daiana S Perce-da-Silva³, Mariana PA Vasconcelos⁴, Cleoni AM Lima⁵, Cesarino JL Aprígio⁶, Rodrigo N Rodrigues-da-Silva¹, Davi O Santos⁷, Dalma M Banic³, Maria G Bonecini-Almeida⁷, Josué C Lima-Júnior¹ and Joseli Oliveira-Ferreira^{1*}

Abstract

Background: Cytokines play an important role in human immune responses to malaria and variation in their production may influence the course of infection and determine the outcome of the disease. The differential production of cytokines has been linked to single nucleotide polymorphisms in gene promoter regions, signal sequences, and gene introns. Although some polymorphisms play significant roles in susceptibility to malaria, gene polymorphism studies in Brazil are scarce.

Methods: A population of 267 individuals from Brazilian Amazon exposed to malaria was genotyped for five single nucleotide polymorphisms (SNPs), *IFNG* + 874 T/A, *IL10A-1082G/A*, *IL10A-592A/C*, *IL10A-819 T/C* and *NOS2A-954G/C*. Specific DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction, allowing the detection of the polymorphism genotypes. The polymorphisms *IL10A-592A/C* and *IL10A-819 T/C* were estimated by a single analysis due to the complete linkage disequilibrium between the two SNPs with $D' = 0.99$. Plasma was used to measure the levels of IFN- γ and IL-10 cytokines by Luminex and nitrogen radicals by Griess reaction.

Results: No differences were observed in genotype and allelic frequency of *IFNG* + 874 T/A and *NOS2A-954G/C* between positive and negative subjects for malaria infection. Interesting, the genotype *NOS2A-954C/C* was not identified in the study population. Significant differences were found in *IL10A-592A/C* and *IL10A-819 T/C* genotypes distribution, carriers of *IL10A-592A/-819 T* alleles (genotypes AA/TT + AC/TC) were more frequent among subjects with malaria than in negative subjects that presented a higher frequency of the variant C allele ($p < 0.0001$). The presence of the allele C was associated with low producer of IL-10 and low parasitaemia. In addition, the GTA haplotypes formed from combinations of investigated polymorphisms in *IL10A* were significantly associated with malaria (+) and the CCA haplotype with malaria (-) groups. The *IL10A-1082G/A* polymorphism showed high frequency of heterozygous AG genotype in the population, but it was not possible to infer any association of the polymorphism because their distribution was not in Hardy Weinberg equilibrium.

Conclusion: This study shows that the *IL10A-592A/C* and *IL10A-819 T/C* polymorphisms were associated with malaria and decreased IL-10 levels and low parasite density suggesting that this polymorphism influence IL-10 levels and may influence in the susceptibility to clinical malaria.

Keywords: Malaria disease, Cytokines, Nitric oxide synthase, Polymorphism

* Correspondence: lila@ioc.fiocruz.br

¹Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Pereira et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Malaria is an infectious disease that affects millions of people each year worldwide. The species of *Plasmodium* that affect humans have different pathogenic potential. However, beyond the pathogenic potential of the parasite, there are environmental factors, host genetics and parasite virulence associated to susceptibility and resistance to malaria [1,2]. The identification of host factors may increase the understanding of the interactions between the parasite and host, as well as the mechanisms involved in the pathology and immunity. In human malaria, a link between enhanced IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10 and nitric oxide (NO) levels and severity of the disease have long been reported [3-7], although this is not a consistent finding [8-10]. In recent years, several studies have demonstrated that the presence of polymorphisms in IFN- γ , IL-10 and NO gene have been associated with susceptibility or resistance to various diseases [11-15].

The main polymorphism in the gene encoding IFN- γ (*IFNG* + 874 T/A polymorphism) is located in its first intron at position +874 and studies have reported only weak associations between *IFNG* SNPs and susceptibility to severe malaria [16,17]. In Brazil, there is one study showing that *IFNG* + 874 T/A polymorphism are associated with reduced levels of IFN- γ in patients with the homozygote mutant AA genotype while carriers of the wild alleles (AT and TT) were associated with higher levels of this cytokine [18].

IL-10 cytokine has an important regulatory role and polymorphisms in the promoter region of *IL10A* impair the production of this cytokine [19,20], and may contribute to the pathogenesis of diseases. In malaria, the role of IL-10 in regulating the inflammatory response remain conflicting since several studies suggest that enhanced IL-10 is associated with increased pathogenesis while others associate with protection [10,21-23]. The coding gene of IL-10 cytokine contains a promoter region with at least 5 kb, which were described over 27 polymorphisms [19]. In malaria, polymorphisms in the promoter region (*IL-10A*-1082A/G, -819 T/C and -592A/C) were associated with reduced IL-10 plasma levels and with the development of acute anaemia in Kenyan children with *P. falciparum* malaria in holoendemic areas [20].

Nitric oxide synthase 2 is the critical enzyme involved in the synthesis of nitric oxide (NO), a molecule with diverse functions. There has been much speculation about the part played by nitric oxide in malaria, both as an antiparasitic agent and as a potential cause of cerebral malaria [24-27]. A report from Gabon suggests that a single nucleotide polymorphism in the inducible nitric oxide synthase (*NOS2A*) promoter is associated with protection from all forms of severe malaria, including susceptibility to reinfection while other study report an association with the risk of fatal cerebral malaria [28].

Recently, an association was found between mutation of a nucleotide at position 84 in the gene of the enzyme, *NOS2A* and a higher risk of cerebral malaria [29]. Moreover, associations between protection against severe malaria and polymorphic forms of the promoter region in African children have also been described [26]. However, few studies evaluate the effect of the gene polymorphism in the promoter of the *NOS2A* gene in NO production. Although some polymorphisms play significant roles in susceptibility to malaria, several findings are inconclusive and contradictory and studies that explore the influence of these polymorphisms in Brazil is scarce [18,30-32]. Thus, cytokine gene polymorphisms have an unquestionable role in the orchestration of the immune response, leading to different functional scenario, which in turn influence the outcome of disease establishment and evolution.

The hypothesis is that SNP polymorphisms may result in changes in recognition sites of some transcription factors that influence the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in malaria infection and may lead to imbalance between these molecules that could favor the host susceptibility to *Plasmodium* and increase the risk for clinical malaria in individuals naturally exposed to infections. Therefore, this study examined the SNPs polymorphisms that affect the expression of genes encoding IFN- γ (-874 T/A), IL-10 (-1082A/G, -819 T/C and -592A/C) and iNOS (-954G/C) from a Brazilian Amazonian population living in malaria endemic area of Brazil.

Methods

Subjects and methods

The present study included 267 individuals (malaria-exposed group) from Porto Velho, Rondônia State, malaria endemic area in the southwestern Brazilian Amazon. Among these individuals 73 (27.3%) were positive for malaria infection (malaria (+) group) and 194 (72.7%) individuals living in the same area were negative for malaria infection (malaria (-) group). Malaria diagnosis was performed in Giemsa-stained thin and thick blood smears and parasitological evaluation was done by examination of 200 fields at 1,000X magnification under oil-immersion. The parasitaemia was expressed as the number of parasites/ μ l of blood in the thick blood smear. The number of parasites/ μ l of blood was calculated by multiplying the number of parasites counted against 500 leucocytes, and the number of leukocytes of the subject and dividing the product by 500. A researcher expert in malaria diagnosis examined all slides. To confirm the parasitological diagnosis, molecular analyses of all samples was performed using primers specific for genus (*Plasmodium* sp.) and species (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*). The amplification protocols were described previously by Snounou *et al.* [33]. Subjects were considered to have malaria if they were positive in the thick blood smear and/or

polymerase chain reaction (PCR). Positive volunteers for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health [34]. Written informed consent was obtained from all volunteers and the study was reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee and the Brazilian National Ethical Committee. All volunteers were clinically evaluated and answered an epidemiological questionnaire, including data as age, gender, time of residence in endemic area, number of past infections, past and last *Plasmodium* species infection and time since last infection.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted using the kit QIAamp[®] DNA Blood Midi/Maxi (QIAGEN, Hilden, Germany), quantified using the NanoDrop ND-1000 and stored at -20°C until use. Amplification Refractory Mutation System (ARMS-PCR), first described by Newton et al. [35], analysed single nucleotide polymorphisms (SNPs) for the *IFNG* + 874 T/A, *IL-10A*-1082A/G, *IL10A*-819 T/C and *IL10A*-592A/C, and *NOS2A*-954G/C polymorphism by Restriction fragment length polymorphism (RFLP) [26]. The polymorphisms *IL10A*-592A/C and *IL10A*-819 T/C were estimated by a single analysis due to the complete linkage disequilibrium between the two SNPs with $D' = 0.99$. Amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) using 2.5UI for *IFNG* and *IL10A* and 1.5UI for *NOS2A* of Taq DNA polymerase (5U/ μ L, Invitrogen). Cycling PCR conditions for *IFNG* + 874 T/A were 95°C (3 minutes), 10 - cycles of 95°C (15 seconds), 65°C (50 seconds), 72°C (40 seconds) followed by 20 cycles of 95°C (20 seconds), 55°C (50 seconds) and 72°C (50 seconds), 72°C (7 minutes) 4°C until use. Cycling PCR conditions for *IL10A* polymorphisms were 95°C (1 minute), 10 cycles of 95°C (15 seconds), 65°C (50 seconds), 72°C (40 seconds) followed by 20 cycles of 95°C (20 seconds), 59°C (50 seconds) and 72°C (50 seconds), 4°C until use. Cycling PCR conditions for *NOS2A*-954G/C were 95°C (3 minutes), 30 cycles of 94°C (10 seconds), 60°C (30 seconds), 72°C (30 seconds); 72°C (7 minutes) and 4°C until use. The *NOS2A*-954G/C amplified product was subsequently digested with BSAI restriction enzyme in the following condition: 50°C (60 minutes), 65°C (20 minutes) and 4°C until use. All amplified products were evaluated by electrophoresis on a 1.5% (*IFNG* and *IL10A*) and 2.5% (*NOS2A*) agarose gel containing ethidium bromide (0.5 μ g/mL). After electrophoresis, the fragments were displayed and the images were photographed on a transilluminator Multi Doc-It[™] Digital Imaging System (UVP, Upland, CA) (Figure 1).

Analysis of plasma cytokines concentration

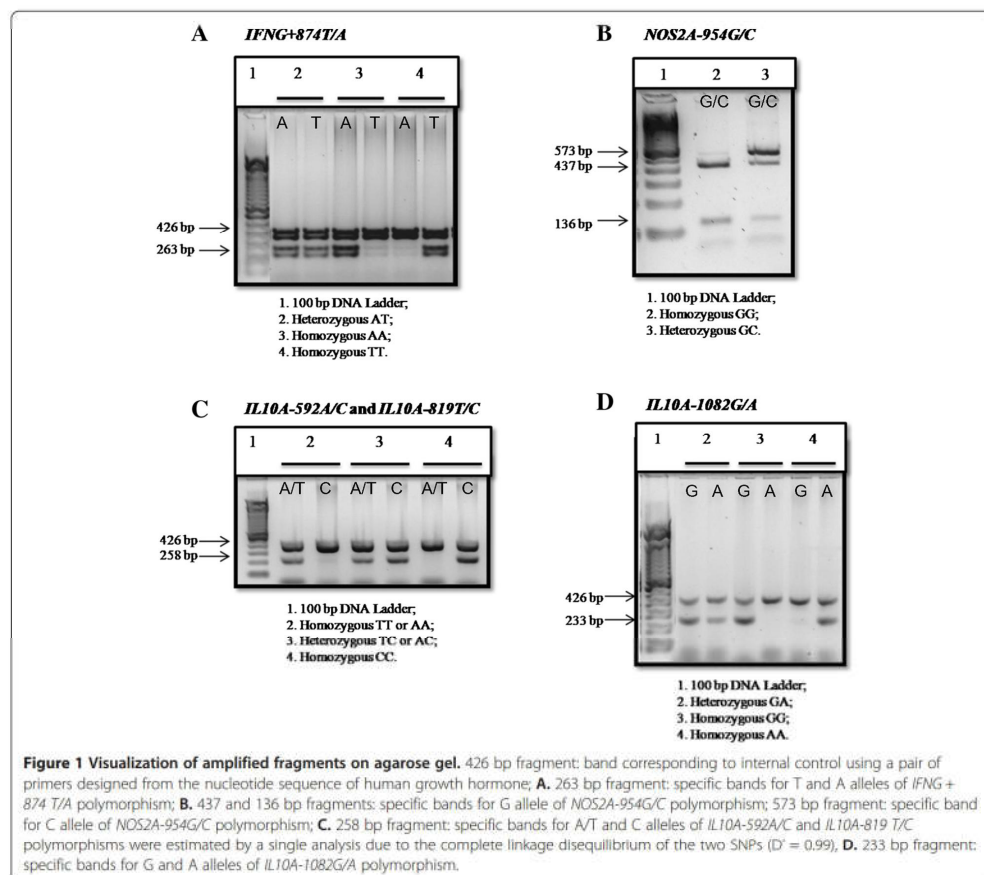
Levels of IFN- γ and IL-10 were detected in plasma samples by a multiplex assay (Bio-Plex assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions using the Luminex system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) and analysed with a Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad Laboratories). Fluorescence intensity was transformed into cytokine concentration using the Bio-Plex manager software (version 3.0). A minimum of 100 beads per region were analysed. A curve fit was applied to each standard curve according to the manufacturer's manual and sample concentrations were interpolated from the standard curves. The limit of detection was 0.79 pg/mL for IFN- γ and 2 pg/mL for IL-10.

Griess microassay detection of nitrite and nitrate

A modified Griess reaction was used to detect nitrite and nitrate [36,37]. The NO levels in samples were indirectly measured after first converting nitrates to nitrites with a nitrate reductase treatment (*Aspergillus* species NAD [P] H, Sigma, UK) and NADPH β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). Griess reagent [5% phosphoric acid, 1% sulphanilic acid and 0.1% N-(1-naphthyl-1)-ethylenediaminedihydrochloride, all from Sigma, UK, dissolved in 100 mL deionized water] was added and proteins were subsequently precipitated by trichloroacetic acid (BDH, England). The tube contents were mixed and centrifuged (Eppendorf centrifuge 5415 C, Germany); two samples of each supernatant were transferred to a flat-bottomed microplate and their absorbances were read at 520 nm using a microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Inc). NO values were calculated from standard calibration plots.

Statistical analysis

Epidemiological and experimental data were stored in the Epi-Info 3.5.1 (CDC, Atlanta, USA). Allele and genotype frequencies were estimated by gene counting and differences between groups by χ^2 test. The risk of malaria associated with polymorphisms was estimated using odds ratios (OR) and confidence interval of 95% (CI) with and without adjustment by age, gender, length of residence in an endemic area and number of previous episodes of malaria. Differences between malaria (+) and malaria (-) groups were estimated by Mann-Whitney and t tests. Relationships between epidemiological factors and cytokine levels were assessed by Spearman's correlation. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was assessed by χ^2 test and Fisher Person. The genetic analyses correspond to codominant logistic regression model (homozygous major allele VS. Heterozygote + homozygote secondary). The linkage disequilibrium



was calculated by D statistic and frequency haplotypes by calculating the maximum likelihood estimator via the EM algorithm (Expectation Maximization) using two-step, step "E" (Hope) and step "M" (max) until convergence is achieved. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism software and SNPstats 5.0 (San Diego, California, USA). Statistically significant values of $p < 0.05$ was considered.

Results

Description of the studied population

The epidemiological surveillance shows that a significant proportion (93.16%) of the inhabitants reported a prior infection with *P. vivax* and/or *P. falciparum* indicating that the majority of the individuals were exposed to malaria parasite throughout the years.

Among studied participants, 55.4% were male and the mean age was 30.99 ± 14.37 years. Comparing both groups, a higher frequency of males was observed in malaria (+) group. However, no statistical differences were identified regarding age, the length of residence in an endemic area and number of previous episodes of malaria between groups. Yet, the time since last infection was higher in malaria (-) group (Table 1). In malaria (+) group, 53 (72.6%) individuals were infected with *P. vivax* and 20 (27.4%) with *P. falciparum*, consistent with *Plasmodium* species distribution reported by the Brazilian Ministry of Health [34]. No cases of severe malaria were seen and fever and headache were the main reported symptoms in all patients. Parasitaemia and symptoms were similar in patients infected with both plasmodial species (Table 2).

Table 1 Characteristics of the study participants

	Malaria diagnosis		Total N = 267	*P value
	Positive N = 73	Negative N = 194		
Gender n (%)				
♀	21 (28.8%)	98 (50.5%)	119 (44.6%)	0.001
♂	52 (71.2%)	96 (49.5%)	148 (55.4%)	0.001
Age	28 (9-54)	30 (4-71)	29 (4-71)	0.531
TREA (years)	25 (1-33)	24 (2-32)	24 (1-63)	0.079
NPE	5 (0-50)	5 (0-99)	5 (0-99)	0.072
TLI (Months)	6 (0-360)	12.5 (0-420)	12 (0-420)	0.016

Data expressed as n (%) of patients; Time of Residence in years TREA; Number of Previous Episodes NPE; Time since Last Infection TLI; Age, TREA, NPE and TLI expressed as median (minimum-maximum); *Statistical significance determined by Mann Whitney U and Chi-square tests.

IFN- γ , IL-10 and NO plasma levels

The means levels of IFN- γ (66.71 pg/mL [2.00-3629.00]) and IL-10 (795.34 pg/mL [1.15-16782.93]), were higher in plasma of malaria (+) when compared with malaria (-) group (IFN- γ 19.44 pg/mL [1.46-3919.00] and IL-10 1.29 pg/mL [0.40-989.00]). The levels of NO did not differ significantly when the groups were compared (malaria (+) 25.49 μ M [11.65-75.85] and malaria (-) 35.41 μ M [0.52-110.95]) (Figure 2A). No differences were observed in the levels of IFN- γ (58.96 pg/mL [2-3629]), IL-10 (627.39 pg/mL [1.15-16782.9]) and NO levels (23.98 μ M [11.65-75.85]) in *P. vivax* (n = 53) infected individuals when compared with the levels of IFN- γ (98.40 pg/mL [2.00-548.15]), IL-10 (1149.88 pg/mL [3.02-6540.45]) and NO levels (28.49 μ M [12.99-40.31]) in *P. falciparum* (n = 20) infected individuals (Figure 2B). Although both IL-10 and IFN- γ were higher in malaria (+) group, Figure 3 shows that the correlation between cytokine levels and parasite density were only observed for IL-10 ($\rho = 0.58$ $p < 0.0001$).

Alleles, genotypes and haplotypes frequencies obtained for IFNG, IL10A and NOS2A genes

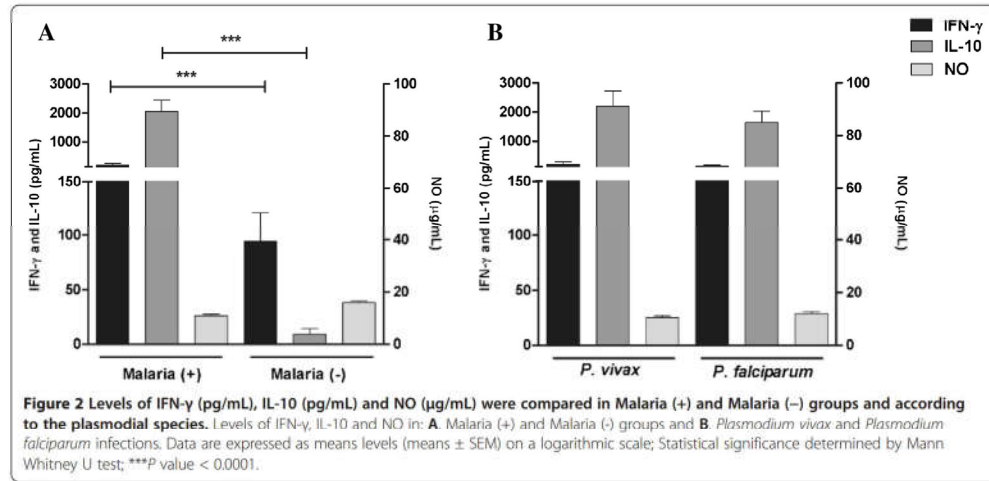
The SNPs investigated, their location in the gene, the genotype and allele frequencies observed in malaria (+)

and malaria (-) groups are presented in Table 3. The groups fell within Hardy-Weinberg equilibrium with non-significant values by χ^2 test for the genotype observed and expected for all polymorphism except for the *IL10A-1082G/A* ($\chi^2 = 41.76$, $p < 0.0001$, $\chi^2 = 32.33$, $p < 0.0001$). The *IFNG + 874 T/A* genotype and allelic frequencies did not differ between malaria (+) and malaria (-) groups. In both groups, the most frequent genotype for *IFNG + 874 T/A* was the homozygous mutant AA followed by AT heterozygous and homozygous wild T allele. The variant allele +874 A was more frequent than wild T. In contrast, the distribution of the *IL10A-1082G/A* genotype differed between malaria (+) and malaria (-) groups while allelic frequencies were similar in both groups. Although the heterozygous AG genotype were more frequent in both groups, this genotype was significantly higher in malaria (+) ($p < 0.001$). The polymorphisms *IL10A-592A/C* and *IL10A-819 T/C* were estimated by a single analysis due to the complete linkage disequilibrium between the two SNPs with $D' = 0.99$. The A allele of *IL10A-592A/C* was always linked with the T allele of and *IL10A-819 T/C* and C with C. *IL10A-592A/A* and *IL10A-819 T/T* genotypes were more frequently observed in malaria (+) compared with malaria (-) group ($p < 0.001$), even when adjusted by sex and age. Similarly

Table 2 Malaria symptoms and parasitaemia according to plasmodial species

Plasmodial species (n = 73)				*P value
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Total	
Number of infected n (%)	53 (72.6%)	20 (27.4%)	73	<0.0001
Parasitaemia	2286 (50-17933)	1214 (52-12623)	2097 (50-17933)	0.334
Days since the onset of symptoms	2 (1-5)	3 (1-10)	3 (1-10)	
Fever	38 (71.7%)	15 (75%)	53 (72.6%)	0.779
Headache	40 (75.5%)	15 (75%)	55 (75.3%)	0.968
Chill	32 (60.4%)	13 (65%)	45 (61.6%)	0.719
Myalgia	31 (58.5%)	14 (70%)	45 (61.6%)	0.368
Nausea	20 (37.7%)	11 (55%)	31 (42.5%)	0.184

Data expressed as n (%) of patients; Parasitaemia (number of parasites/ μ L of blood) and onset of symptoms expressed as median (minimum-maximum); *Statistical significance determined by Mann Whitney U and Chi-square tests.



the wild alleles A/T were more frequent in malaria (+) than malaria (-) groups (OR = 0.45; $p < 0.0001$). Stratification of the individuals into haplotypic groups based on the tree promoter *IL10A* polymorphisms at positions -592/-819/-1082 yielded the following haplotypes distribution: Hap1 (CCG), Hap2 (ATA), Hap3 (CCA) and Hap4 (ATG) with frequencies that varied from 7% to 38% in both malaria (+) and malaria (-) groups. As shown in Table 4, Hap1 and Hap2 were the most frequent haplotypes with similar distribution in the groups. The distribution of the haplotypes Hap3 and Hap4 were significantly different between malaria (+) and malaria (-) groups, while the Hap1 and Hap2 were similar between the groups. The Hap3 haplotype was more frequent in malaria (-) while the Hap4 were more frequent in malaria (+) group. The

distribution of *NOS2A-954G/C* genotype in the population showed that the homozygous GG was more frequent in both groups and the genotype *NOS2A-954C/C* was not identified in the study population. The G allele was also the most frequent allele with similar distribution in both groups.

Association between IFNG, IL-10 and NOS2A genotypes and their products

No association was observed between *IFNG-874 T/A*, *NOS2A-954G/C* and *IL10A-1082G/A* SNPs and the levels of their products in plasma (Figure 4A-C). However, individuals with *IL10A-592A/C* and *IL10A-819 T/C* genotypes were strongly associated with the plasma levels of IL-10. The IL-10 levels were lower in subjects who carried the

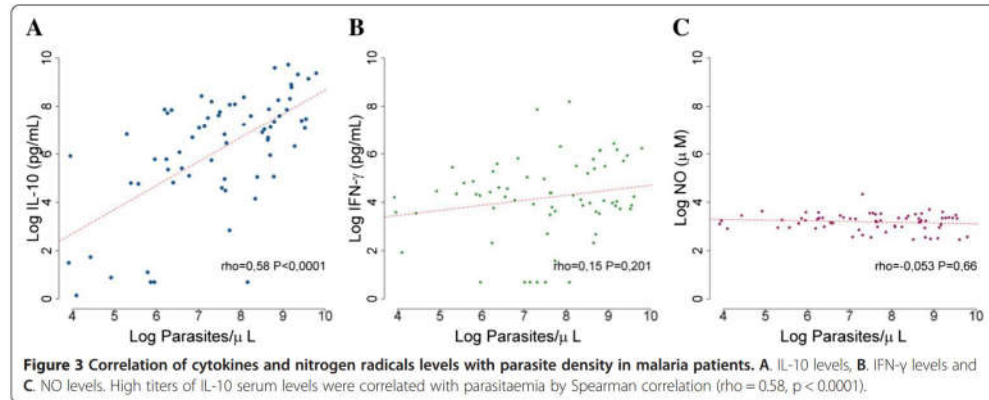


Table 3 Genotypic and allelic frequencies of single nucleotide polymorphisms in malaria (+) and malaria (-) groups

Studied polymorphisms		Malaria (+) (n = 73)	Malaria (-) (n = 194)	OR (95% CI)	*P value
IFNG + 874 T/A					
Genotypes	A/A	38 (52%)	101 (52.1%)	1.00	0.92
	A/T	30 (41.1%)	77 (39.7%)	0.97 (0.55-1.70)	
	T/T	5 (6.8%)	16 (8.2%)	1.20 (0.41-3.51)	
Alleles	A	106 (73%)	279 (72%)	0.16 (0.68 - 1.58)	0.87
	T	40 (27%)	109 (28%)		
NOS2A-952G/C					
Genotypes	G/G	70 (95.9%)	183 (94.3%)	1.00	0.6
	G/C	3 (4.1%)	11 (5.7%)	1.40 (0.38-5.18)	
	C/C	-	-	-	
Alleles	G	143 (98%)	377 (97%)	1.39 (0.38 - 5.05)	0.6
	C	3 (2%)	11 (3%)		
IL10A-1082G/A					
Genotypes	A/A	3 (4.1%)	40 (20.6%)	1.00	0.0009
	G/A	64 (87.7%)	135 (69.6%)	0.16 (0.05-0.53)	
	G/G	6 (8.2%)	19 (9.8%)	0.24 (0.05-1.05)	
Alleles	A	70 (48%)	215 (62%)	0.74 (0.50 - 1.08)	0.12
	G	76 (52%)	173 (45%)		
IL10A-592A/C and IL10A-819 T/C					
Genotypes	C/C	13 (17.8%)	70 (36.1%)	1.00	0.0002
	A/C; T/C	36 (49.3%)	100 (51.1%)	0.52 (0.26-1.04)	
	A/A; T/T	24 (32.9%)	24 (12.4%)	0.19 (0.08-0.42)	
Alleles	C	62 (42%)	240 (62%)	0.45 (0.30 - 0.67)	0.0001
	A/T	84 (58%)	148 (38%)		

IFNG + 874 T/A, NOS2A-954G/C, IL10A-1082G/A, IL10A-592A/C and IL10A-819 T/C polymorphisms: Alleles, n (%); Genotypes n (%); OR (95% CI), calculating odds ratios with confidence interval (CI) of 95%; *Analysis by χ^2 test using the Fisher model codominance.

homozygous variant IL10A-592CC and -819CC (1.19 pg/mL [0.4-2241]) compared to subjects with IL10A-592 AC and -819TC (2.3 pg/mL [0.4-11233]) and wild homozygous individuals with IL10A-592AA/-819TT (18.4 pg/mL [0.4-16782]) ($p < 0.0001$). Wild homozygous individuals with IL10A-592AA/-819TT presented IL-10 levels three times higher than individuals carrying variant allele C, indicating an association between the AA/TT genotypes with clinical malaria risk (Figure 4D).

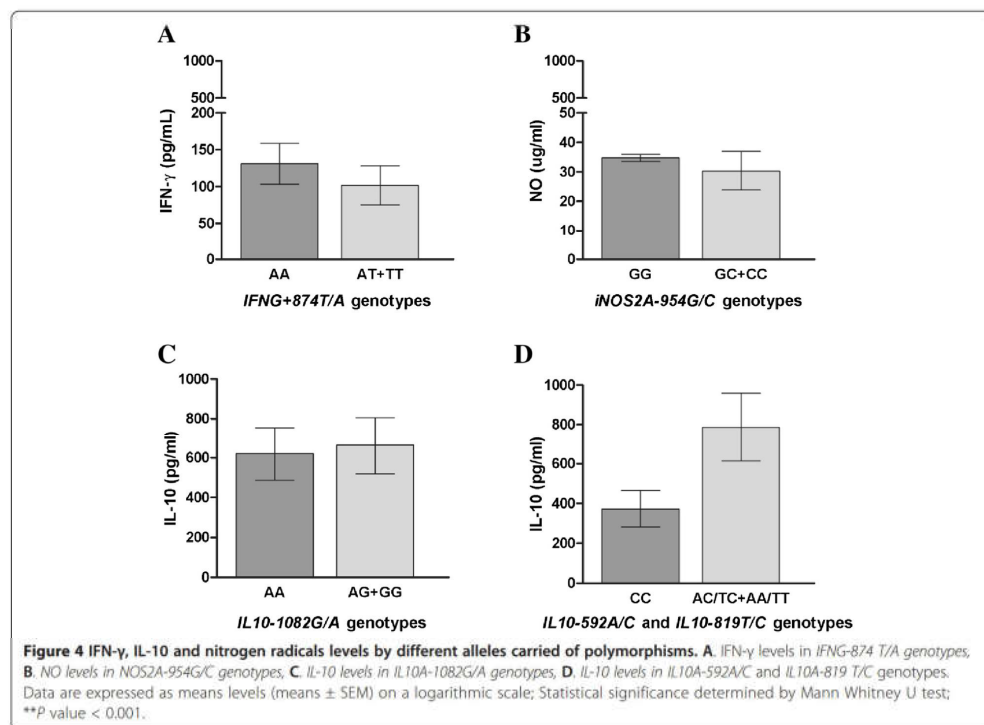
Polymorphisms and parasitaemia levels association

The parasite densities among the different genotypes and carried alleles were evaluated and the parasitaemia was not influenced by the *IFNG + 874 T/A*, *NOS2A-954G/C* and *IL10A-1082G/A* polymorphisms (Figure 5). Among the *IFNG + 874 T/A* genotypes, the median parasitaemia was 37.85 (50-17933) parasites/ μ L for heterozygous genotype AT, 11.72 (199-6518) parasites/ μ L for homozygous wild TT and 1861 (52-11546) parasites/

Table 4 Haplotypes frequencies of IL10A in malaria (+) and malaria (-) groups

Haplotypes frequencies	-592	-819	-1082	Malaria (+)	Malaria (-)	OR (95% CI)	*P value
Hap1	C	C	G	0.3257	0.37	1.00	-
Hap2	A	T	A	0.3805	0.3056	0.85 (0.40 - 1.77)	0.66
Hap3	C	C	A	0.0989	0.2486	0.36 (0.14 - 0.93)	0.036
Hap4	A	T	G	0.1948	0.0759	3.83 (1.40 - 10.45)	0.009

-592/-819/-1082: Positions of polymorphisms in the promoter region of the interleukin 10 gene; OR (95% CI), calculating odds ratios with confidence interval (CI) of 95%; *Analysis by calculating EMV via EM algorithm using a logistic regression model.



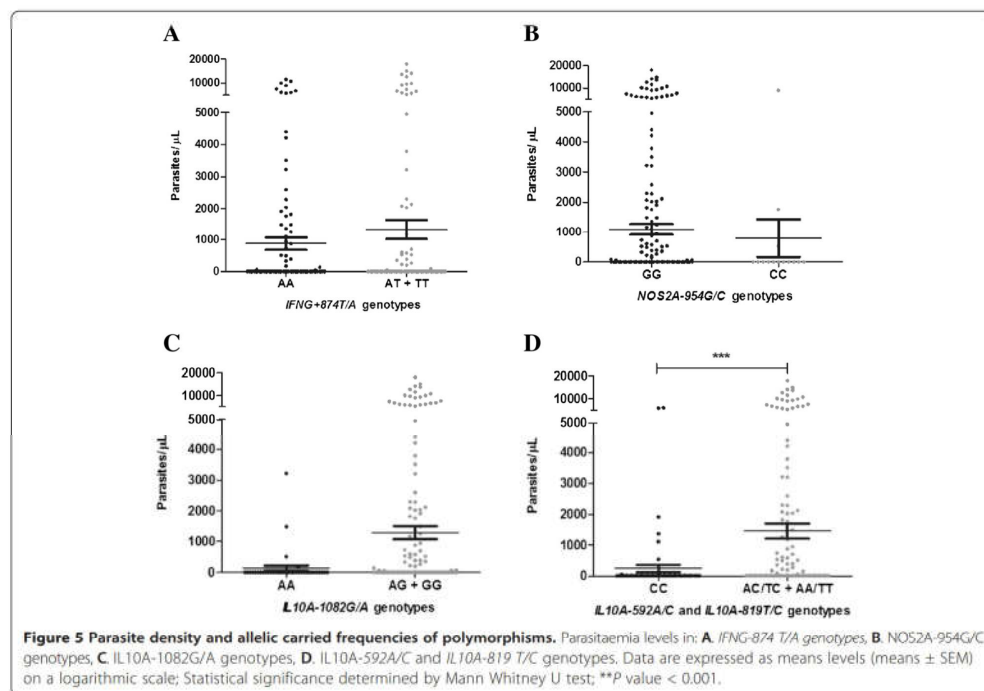
μ L for homozygous variant AA (Figure 5A). Among the *NOS2A*-954G/C polymorphism, the homozygous CC variant was not detected and the median parasite density was 1758 (524–8888) parasites/ μ L for GC genotype and 2120 (50–17933) parasites/ μ L for homozygous GG (Figure 5B). The *IL10A*-1082G/A genotypes, the median parasitaemia was 1485 (510–3210) parasites/ μ L for the homozygous AA variant, 2200 (50–17933) parasites/ μ L for the heterozygous AG and 1906 (84–6000) parasites/ μ L for homozygous GG wild (Figure 5C). The *IL10A*-592AA and *IL10A*-819TT genotypes presented 2440 (52–17933) parasites/ μ L while the heterozygous *IL10A*-592 AC and *IL10A*-819TC presented 2280 (84–14891) parasites/ μ L (Figure 5D). These genotypes (carriers of the wild type) presented higher parasites densities when compared with the homozygous variant *IL10A*-592CC and *IL10A*-819CC 1108 (50–6000) parasites/ μ L.

Discussion

Human populations display differences in susceptibility to many diseases and the basis for this differential susceptibility is, at least in part, genetically determined [38,39]. Significant associations between cytokine polymorphism

and diseases support that cytokine gene polymorphisms have an unquestionable role in the orchestration of the immune response, leading to different functional scenarios, which in turn influence the outcome of disease establishment and evolution [38,40]. Thus, the present study aimed at exploring cytokine and NO polymorphism in populations naturally exposed to malaria, residents in Rondônia State, southwestern of Brazilian Amazon in order to establish the possible implications of these polymorphisms in malaria infection as well as analysing whether the alleles and genotypes are associated with their expression. In recent years, evaluation of SNPs have been considered a common approach for testing human genetic variation [37].

The SNPs investigated include *IFNG* (-874 T/A), *IL10A* (-1082A/G, -819 T/C and -592A/C) and *NOS2A* (-954G/C). Firstly, genotypic and allelic frequencies of the *IFNG* +874 T/A polymorphism showed that the variant allele A was more common in the population as well as the corresponding homozygous AA genotype. The frequencies found in the study population, are in agreement with previous studies conducted in other Brazilian [18] and Colombian Amazon regions populations



[41]. However, studies conducted in Brazil in non-Amazonian areas the homozygous AA genotype was predominant in patients with tuberculosis, while the control group of individuals from the same region had the heterozygous genotype predominantly AT, demonstrating a heterogeneous composition in different geographic region of Brazil, beyond the significant association of this polymorphism with tuberculosis [11,13].

In the study population, no difference in the allelic and genotypic distribution of *IFNG* + 874 T/A polymorphism was observed between malaria (+) or malaria (-) groups. Few studies find associations between severe malaria and *IFNG* + 874 T/A polymorphism and these associations were weak and not significant after correction for multiple comparisons [42,43]. In malaria-infected individuals, the relationships between *IFNG* + 874 T/A polymorphism and IFN- γ serum levels were not observed in this study, although high levels of IFN- γ were detected in malaria (+) subjects. The results of this study were different from Medina *et al.* that reported in a population of an endemic area in Brazil, a concentration of IFN- γ significantly lower in the serum of patients with AA individuals compared with T wild allele carriers [18]. The possibility that there exist functional *IFNG* polymorphisms that were not effectively tagged by this

marker cannot be excluded, and further studies of the locus are warranted.

In the *IL10A* gene, investigation of three polymorphisms at positions -592, -819 and 1082 of the promoter region, were associated with the actual production of IL-10, which has an important role in the immune response to malaria infection [21,44,45]. The *IL10A* gene polymorphism at position -1082, have been associated with decreased production of IL-10 and clinical and severe malaria [7,20,46]. However, no association was found between this polymorphism and the levels of IL-10 nor with the occurrence of the disease and this polymorphism were not in Hardy-Weinberg equilibrium in the studied population, demonstrating the need for a representative sample to verify a possible association of this polymorphism with IL-10 levels in malaria patients. In the studied population the heterozygous GA was the most frequent genotype in both malaria (+) and malaria (-) groups. Medina *et al.* [18] reported the homozygous AA variant as the most common genotype in the population of Belem (Para state) but showed weak association between IL-10 concentration and parasite density [18], while a study in the Amazonas state revealed an association between *IL-10A*-1082G/A polymorphism with reduced risk to clinical malaria [32]. Some studies that have addressed this polymorphism

showed variation in the allele and genotype distribution according to ethnicity [18,20,47]. In the case of the *IL10A*-592A/C and -819 T/C polymorphisms, it was observed association with IL-10 production and parasite density. Interestingly, a high prevalence of the C alleles and homozygous variant -592CC/-819CC was found in malaria (-) group while a higher prevalence of wild alleles A/T and homozygous genotype -592AA/-819TT in malaria (+), suggesting that the C allele were at lower risk to have malaria due to its prevalence in the malaria (-) group. The homozygous genotype -592CC/-819CC was associated with a reduced IL-10 levels and low parasite density compared to other genotypes. Indeed, carriers of the C allele variant were low producers of IL-10 and presented low parasite density while carriers of A/T wild alleles were high producer of IL-10 and presented high parasite density. The presence of the CC genotype may create site for enhanced binding of repressor that favor reduced IL-10 production.

Considering the haplotypes of *IL10A* at positions -592/-819/-1082, no association was observed between the most frequent haplotypes CCG and ATA with the risk of having malaria. However, carriers of the less frequent haplotype GTA were more prevalent in malaria (+) group while carriers of the ACC haplotype were more prevalent in malaria (-) group. The haplotype analysis of these three polymorphism in the Amazonas state, the GCT allelic combination were associated with low risk of any form of malaria, this haplotype was not present in the study population in Rondônia State neither in Para State, both Amazonian endemic areas [31]. The differences in haplotypes distribution in the same region are consistent with the heterogeneous genetic profile of Brazilian population [48]. Study in Kenia reported relationship between common Africa *IL10A* promoter variants and protection against severe malarial anaemia and increased production of IL-10 [20]. However, other studies have shown no evidence of association between the polymorphisms in the IL-10 gene and malaria severity [18]. A study in Gambia showed an association between the haplotype of five SNPs (+4949G, +919C, -627G, -1117C, -3585 T), not evaluated in this study, and resistance to cerebral malaria and severe anaemia [49]. In Brazil, this is the first report that investigate the frequency of the promoter region haplotypes in *IL10A* gene associated with malaria infection, IL-10 levels and parasite density. Similar *IL10A* haplotypes distribution were reported in a population from the State of Para another malaria endemic area in Brazil. However, the authors did not evaluate the IL-10 levels and did not find any influence of these haplotypes in susceptibility to malaria [31].

Finally, it was not found association between *NOS2A*-954G/C polymorphism and susceptibility to malaria, NO

levels or parasitaemia. Indeed, the G-954-C C allele was present in less than 4% of the study population, it is absent in Caucasian and is found at low frequency in Asia. [26]. In contrast, in African population this genotype is present in high frequency where most of the associations with malaria outcome were reported. Even though, there has been much speculation about the role played by nitric oxide (NO) in malaria, both as an antiparasitic agent and as a potential cause of cerebral malaria [37]. In Brazil, the *NOS2A*-954G/C polymorphism have been reported in studies with tuberculosis and leprosy. In both studies, the allelic and genotypic frequencies were similar to the one found in this study, even though their population were from South and Southeast region [50,51]. Although no association has been found, this study is the first to report *NOS2A*-954G/C polymorphism and NO levels in malaria exposed individuals in endemic region of Brazil. Indeed, the *NOS2A* gene polymorphism have been associated with susceptibility to *P. falciparum* malaria and conflicting results have been obtained in studies that associate the presence of the G-954-C C allele and either risk of cerebral malaria or NO production [26,52]. It should be noted that individual differences in the levels of the cytokines and NO measured at a specific moment may not only result from host genetic factors predisposing to high or low production, but also for a great part from the physiological condition at that time, as well as from general immunity. The present findings reinforce the role of mediators of inflammation in malaria susceptibility and future studies in different setting with large samples numbers are warranted. Furthermore, it should be observed that not merely one genetic alteration but rather the combination of a set of genetic factors might influence the susceptibility or resistance to malaria.

Conclusions

This study shows that *IFNG* + 874 T/A, *IL10A*-1082G/A and *NOS2A*-954G/C polymorphisms was not associated with the occurrence of malaria or with the production of its respective cytokine and nitric oxide products. The *IL10A*-592A/C and *IL10A*-819 T/C polymorphisms were associated with malaria and decreased IL-10 levels and low parasite density suggesting that this polymorphism influence IL-10 levels and may influence in the susceptibility to clinical malaria in Amazonian population.

Abbreviations

SNP: Single nucleotide polymorphism; PCR: Polymerase chain reaction; DNA: Deoxyribonucleic acid; IFN- γ : Interferon-gamma; NO: Nitric oxide; TNF: Tumour necrosis factor; IL-10: Interleukin 10; iNOS: Enzyme nitric oxide synthase; NADPH: β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; HWE: Hardy Weinberg equilibrium; EM: Expectation Maximization; E: Hope; M: Max.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JOF conceived the idea for this study. JOF, MGBA and JCLJ designed the study. Fieldwork and sample collection was done by JCSA, DSPS, MPAV, CAML, CJLA, DMB and AT. VAP, JCSA, DSPS, RNRS and DOS performed the experiments. Data was collected and analysed by VAP with support from JCSA, MGBA, JOF and JCLJ. The first draft of this manuscript was written by VAP and JOF and MGBA critically read and advised on the manuscript. All authors read and approved the final version.

Acknowledgements

This work was supported by PRONEX Malaria/CNPq/FAPERJ. JOF is recipient of Research Productivity Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). VAR and JCSA are recipients of a fellowship from CNPq and Instituto Oswaldo Cruz, respectively. We thank the Secretary of Health of Rondônia State, the Laboratório Central – LACEN of Rondônia for fieldwork support. We are grateful to all individuals that participated in this study for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible.

Author details

¹Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ²Laboratório de Imunodiagnóstico /Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ³Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil. ⁶Laboratório de Quimioterapia/Fiocruz, Porto Velho, Rondônia, Brazil and Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil. ⁷Laboratório de Imunologia e Imunogenética, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPC)/Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 8 August 2014 Accepted: 6 January 2015

Published online: 28 January 2015

References

- Luzzatto L. Genetic factors in malaria. *Bull World Health Organ.* 1974;50:195–202.
- Driss A, Hibbert JM, Wilson NO, Iqbal SA, Adamkiewicz TV, Stiles JK. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. *Malar J.* 2011;10:271.
- Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* 2006;5:85.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarenco J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 2010;9:13.
- Akanmori BD, Kurtzhals JA, Goka BQ, Adabayeri V, Ofori MF, Nkrumah FK, et al. Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11:113–8.
- Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Med.* 1989;87:139–43.
- Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Bjorkman A. Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. *Parasite Immunol.* 2004;26:111–7.
- Lopansri BK, Anstey NM, Weinberg JB, Stoddard GJ, Hobbs MR, Levesque MC, et al. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet.* 2003;361:676–8.
- Wilson NO, Bythwood T, Solomon W, Jolly P, Yatch N, Jiang Y, Shualb F, Adjei AA, Anderson W, Stiles JK. Elevated levels of IL-10 and G-CSF associated with asymptomatic malaria in pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2010;2010.
- Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior J d C, Fonseca BP, Antas PR, Baldez A, Storer FL, et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:154–62.
- Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874 T/A, IL10-1082G/A and TNF-308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet.* 2008;123:477–84.
- Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, et al. IFNG +874 T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis.* 2007;7:33.
- Vallinoto AC, Graca ES, Araujo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LF, et al. IFNG +874 T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol.* 2010;71:692–6.
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T > A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet.* 2010;128:481–90.
- Ribeiro CS, Visentainer JE, Moliterno RA. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:435–40.
- Koch O, Rockett K, Jallow M, Pinder M, Sisay-Joof F, Kwiatkowski D. Investigation of malaria susceptibility determinants in the IFNG/IL26/IL22 genomic region. *Genes Immun.* 2005;6:312–8.
- Cabantous S, Poudioucou B, Traore A, Keita M, Cisse MB, Doumbo O, et al. Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2005;192:854–60.
- Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J.* 2011;10:264.
- Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Diella Ragione F, et al. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem.* 2003;49:1664–7.
- Ouma C, Davenport GC, Were T, Otieno MF, Hittner JB, Vulule JM, et al. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. *Hum Genet.* 2008;124:515–24.
- Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Lamed J, et al. Cytokines and malaria parasitemia. *Clin Immunol.* 2001;100:208–18.
- Keller CC, Davenport GC, Dickman KR, Hittner JB, Kaplan SS, Weinberg JB, et al. Suppression of prostaglandin E2 by malaria parasite products and antipyretics promotes overproduction of tumor necrosis factor-alpha: association with the pathogenesis of childhood malarial anemia. *J Infect Dis.* 2006;193:1384–93.
- May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. HLA-DQB1*0501-restricted Th1 type immune responses to *Plasmodium falciparum* liver stage antigen 1 protect against malaria anemia and reinfections. *J Infect Dis.* 2001;183:168–72.
- Clark IA, Cowden WB, Rockett KA. Nitric oxide in cerebral malaria. *J Infect Dis.* 1995;171:1068–9.
- el-Nashar TM, el-Kholy HM, el-Shiety AG, Al-Zahaby AA. Correlation of plasma levels of tumor necrosis factor, interleukin-6 and nitric oxide with the severity of human malaria. *J Egypt Soc Parasitol.* 2002;32:525–35.
- Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Pujalon O, Alpers M, et al. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis.* 2001;184:330–6.
- Anstey NM, Granger DL, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Duffy PE, Weinberg JB. Nitric oxide, malaria, and anemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:249–52.
- Kun JF, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kremsner PG. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet.* 1998;351:265–6.
- Dhangadamajhi G, Mohapatra BN, Kar SK, Panjit MR. A new allele (eNOS4e) in the intron 4 (VNTR) of eNOS gene in malaria infected individuals of the population of Orissa (an eastern Indian state). *Nitric Oxide.* 2010;22:58–9.
- Jha AN, Singh VK, Kumari N, Singh A, Antony J, van Tong H, et al. IL-4 haplotype -590 T, -34 T and intron-3 VNTR R2 is associated with reduced malaria risk among ancestral Indian tribal populations. *PLoS One.* 2012;7:e48136.
- Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MD, Souza JM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Santos NP, et al. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. *Malar J.* 2012;11:409.
- Santos SD, Clark TG, Campino S, Suarez-Mutis MC, Rockett KA, Kwiatkowski DP, et al. Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. *PLoS One.* 2012;7:e36692.

33. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;61:315–20.
34. Saúde MD, Saúde SV. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Brasília-DF: Annual Report; 2010.
35. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17:2503–16.
36. Rockett KA, Auburn MM, Rockett EJ, Clark IA. Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:735–42.
37. Nahrevanian H, Dascombe MJ. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. *Parasite Immunol.* 2001;23:491–501.
38. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun.* 2001;2:61–70.
39. Rodriguez Lopez R. [Human susceptibility to complex diseases. Genetic analysis in large populations](in Portuguese). *Rev Derecho Genoma Hum.* 2004;227–239.
40. Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet.* 2006;40:469–86.
41. Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez A, Gonzalez CI, et al. Role of the IFNG +874 T/A polymorphism in chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol.* 2010;10:682–5.
42. Mangano VD, Clark TG, Auburn S, Campino S, Diakite M, Fry AE, et al. Lack of association of interferon regulatory factor 1 with severe malaria in affected child-parental trio studies across three African populations. *PLoS One.* 2009;4:e4206.
43. Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Tokunaga K, Tsuchiya N, Ohashi J. IFNGR1 polymorphisms in Thai malaria patients. *Infect Genet Evol.* 2009;9:1406–9.
44. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997;24:1–8.
45. Kariuki SM, Rockett K, Clark TG, Reyburn H, Agbenyega T, Taylor TE, et al. The genetic risk of acute seizures in African children with falciparum malaria. *Epilepsia.* 2013;54:990–1001.
46. Zhang G, Manaca MN, McNamara-Smith M, Mayor A, Nhabomba A, Berthoud TK, et al. Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infect Immun.* 2012;80:2316–22.
47. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K. Lack of association between interleukin-10 gene promoter polymorphism, –1082G/A, and severe malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002;33 Suppl 3:5–7.
48. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol.* 2010;22:187–92.
49. Wilson JN, Rockett K, Jallow M, Pinder M, Sisay-Joof F, Newport M, et al. Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. *Genes Immun.* 2005;6:462–6.
50. Leandro AC, Rocha MA, Lamoglia-Souza A, VandeBerg JL, Rolla VC, Bonecini-Almeida Mda G. No association of IFNG + 874 T/A SNP and NOS2A-954G/C SNP variants with nitric oxide radical serum levels or susceptibility to tuberculosis in a Brazilian population subset. *Biomed Res Int.* 2013;2013:901740.
51. Messias-Reason IJT, van Tong H, Velavan TP. Analysis of polymorphic sites in the promoter of the nitric oxide synthase 2 gene in Brazilian patients with leprosy. *Int J Immunogenet.* 2014;41:231–5.
52. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K. Significant association of longer forms of CCTTT Microsatellite repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter with severe malaria in Thailand. *J Infect Dis.* 2002;186:578–81.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4 RESULTADOS COMPLEMENTARES

Estes dados farão parte do terceiro artigo, ainda em preparação, e tem como objetivo avaliar a resposta imune humoral naturalmente adquirida para as proteínas CS, AMA-1 e MSP-1₁₉ de *P. vivax* assim como a influência dos polimorfismos das citocinas IFN- γ (*IFNG+874T/A*) e IL-10 (*IL10A-819T/C* e *IL10A-592A/C*), e da enzima iNOS (*NOS2A-954G/C*) nesta resposta.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 População de Estudo

A população de estudo já foi descrita nos artigos 1 e 2 que compõem esta tese. Brevemente, a área selecionada foi o município de Porto Velho, onde os participantes foram recrutados através de visitas às suas casas, selecionadas aleatoriamente, e através da procura ao atendimento médico na Policlínica Dra Ana Adelaide. Todos os voluntários incluídos neste estudo foram avaliados clinicamente e responderam a um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e um questionário epidemiológico (Apêndice B), antes da coleta da amostra de sangue. O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEP / FIOCRUZ, 024/09) (Anexo 1).

4.1.2 Sequenciamento genômico para o diagnóstico das variantes de *P. vivax*

As amostras de DNA foram extraídas de acordo com o protocolo do fabricante utilizando o kit QIAmp (Qiagen, Hilden, Alemanha). O segmento genômico correspondente à região central da CSP de *P. vivax* foi amplificado pela técnica de PCR. As reações de amplificação foram realizadas num volume total de 50 μ L contendo 5 μ L de tampão de PCR 10X, 1,5mM de MgCl₂, 0,2 nmol de cada dNTP, 2,5 U de AmpliTaq Gold DNA Polimerase, H₂O q.s.p. e 0,2 mM de cada primer. Foram utilizados dois pares de iniciadores AL60 (GTCGGAATTCATGAAGAACTTC-ATTCTC) e AL61 (CAGCGGATCCTTAATTGAATAATGCTAGG) e PVCSP1 (AGG-CAGAGGACTTGGTGAGA) e PVCSP2 (CCACAGGTTACTGTCATGG) nas seguintes condições: par AL60/61 – 94°C/10', 94°C/01', 48°C/01', 72°C/01' e 72°C/10'; par PVCSP1/2 - 94°C/10', 94°C/01', 60°C/01', 72°C/01' e 72°C/10'. Os

produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de agarose 2%, e os tamanhos dos produtos de PCR foram estimados utilizando uma escala de DNA de 100bp e 1kb. Após a visualização, os produtos amplificados foram concentrados e purificados em gel de agarose a 2% com baixo ponto de fusão e tampão TAE 1X com 0,5µg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos obtidos foram cortados e purificados novamente utilizando o kit Wizard SV Gel e o sistema PCR Clean-UP (Promega, Wisconsin, EUA) e quantificados com kit Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, Califórnia, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras de DNA foram preparadas de acordo com o protocolo de reação de sequenciamento do Big Dye Terminator Cycle Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) previamente padronizado pela Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS/ FIOCRUZ). A reação do sequenciamento foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com as seguintes condições de ciclagem (40 ciclos: 94°C/10", 50°C/05" e 60°C/04'). Depois, o DNA foi precipitado com isopropanol a 75% e etanol e o sedimento obtido foi levado para a plataforma de sequenciamento capilar automático de DNA (ABI Prism® DNA Analyzer 3730-PDTIS/ FIOCRUZ). As sequências nucleotídicas obtidas (senso e anti-senso) para cada amostra foram analisadas utilizando SeqMan 7.0.0, MegAlign 7.0.0, EditSeq 7.0.0 (Software DNASTAR/ Lasergene Madison, WI) e BLAST (Ferramenta de procura de alinhamento local básico - NCBI).

O diagnóstico parasitológico de gênero e espécie plasmodial foi realizado por microscopia e confirmado por PCR de acordo com protocolos previamente descritos nos artigos publicados, 1 e 2.

4.1.3 Dosagem de anticorpos IgG

Os níveis de anticorpos IgG totais contra as proteínas de *P. vivax* CS (PvCS), AMA-1 (PvAMA-1), MSP-1₁₉ (PvMSP-1₁₉) foram estimados em amostras de plasma usando a técnica de ELISA. Para a PvCS foram utilizados peptídeos sintéticos representando a região repetitiva da proteína, e para PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉ foram utilizadas proteínas recombinantes. Placas de 96 poços (Nunc/Maxicorp) foram sensibilizadas com 500ng de peptídeos PvCS e 200 ng dos antígenos de PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉ diluídos em PBS, e incubadas overnight a 4°C. Após lavagem com PBS-0,05%Tween 20, as placas foram bloqueadas com PBS-0,05%Tween20-5% BSA para PvCS e PBS-0,05%Tween20-5%Molico (leite desnatado com baixo teor

de gordura) para PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉, e incubadas por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas e incubadas por 1 hora a 37°C com plasma diluído 1:100 em PBS-0,05%Tween20-5%Molico (PBS 0,05% Tween 20 2,5% BSA para PvCS). Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 1 hora a 37°C com anticorpo de cabra anti-IgG humano conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:1.000 em PBS-0,05%Tween20-5%Molico (diluição 1: 5.000 em PBS-0,05%Tween20-2,5 %BSA para PvCS). Após outra lavagem, as placas foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente com solução reveladora (cloridrato de o-fenilenodiamino- + tampão citrato-fosfato + peróxido de hidrogénio) e a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram lidas a 490 nm e o índice de reatividade (IR) para a positividade foi calculado usando a média da densidade óptica (DO) de cada amostra dividida pela média da DO mais três vezes o desvio padrão de cinco amostras controle negativo por experimento (indivíduos que nunca foram expostos à transmissão da malária). Indivíduos com valores de IR superiores a 1 foram considerados como respondedores. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

As subclasses de IgG anti-PvCS, anti-PvAMA1 e anti-PvMSP-1₁₉ foram medidas para indivíduos com resposta positiva no ELISA para IgG total. O método para subclasses foi o mesmo descrito acima para o total de IgG nas etapas de sensibilização, bloqueio e adição de amostras de plasma. Além disso, após a lavagem, as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C com mAbs de camundongo para subclasses de IgG humana diluídos 1:1.000 em PBS-0,05%Tween20-5%Molico e em PBS-0,05%Tween20-2,5%BSA para PvCS. Os mAbs foram dos clones HP-6001 para IgG1, HP-6002 para IgG2, HP-6050 para IgG3 e HP-6023 para IgG4 (Sigma). As placas foram lavadas novamente e incubadas durante 1 hora a 37°C com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (KPL) diluído 1:1.000 em PBS-0,05%Tween20-5%Molico. Após a incubação, a etapa de revelação, a medida de DO e o índice de reatividade (IR) foram realizados conforme descrito em ELISA para IgG total.

4.1.4 Dosagem de citocinas e óxido nítrico e Detecção dos polimorfismos

As concentrações de citocina e óxido nítrico (NO) foram determinadas utilizando o ensaio BioPlex e reação de Griess modificada, respectivamente. Para a detecção dos polimorfismos nos genes *IFNG* na posição +874T/A, e *IL10A* nas posições -1082G/A, -819T/C e -592A/C foi utilizada a técnica de ARMS-PCR

(*Amplification Refractory Mutation System*). A técnica PCR-RFLP – Polimorfismos de comprimentos dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi utilizada para a detecção do polimorfismo da iNOS na posição -954 do gene (*NOS2A*). Os protocolos estão descritos detalhadamente no Artigo 2.

4.1.5 Análise estatística dos dados

Os dados epidemiológicos e experimentais foram armazenados no banco de dados Epi-Info 3.5.1 (CDC, Atlanta, USA). As análises foram feitas utilizando SNPStats software, GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) e R versão 3.4.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria). Diferenças entre as frequências de respondedores foram estimadas usando intervalo de confiança de 95% (IC). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas foi utilizado para calcular diferenças nos índices de reatividade dos anticorpos IgG entre os grupos. As frequências alélicas e genóticas foram comparadas entre os indivíduos e avaliadas utilizando o teste χ^2 . O risco para malária associado aos polimorfismos foi estimado utilizando o *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95% (CI). Também foi realizada análises de interações, cruzando pares de variáveis e estimando a associação pelo OR e 95% IC (172). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi calculado com o teste χ^2 de Person e de Fisher. Foi considerado estatisticamente significativo os valores de $p < 0.05$. As análises genéticas correspondem ao modelo de regressão logística codominante (alelo principal homocigoto VS. heterocigoto + homocigoto secundário).

4.2 Resultados

4.2.1 Caracterização da população de estudo

O estudo envolveu 353 indivíduos de uma coorte transversal realizada em região endêmica de malária em Porto Velho, Rondônia. A epidemiologia da malária dessa coorte já foi descrita anteriormente (173). A genotipagem dos SNPs incluiu 332 voluntários, mesma população apresentada no Artigo 2 acrescida de 65 indivíduos genotipados posteriormente. No momento da amostragem, 96 (27,2%) indivíduos foram positivos no diagnóstico de malária (71 por *P. vivax* e 25 por *P. falciparum*) e 257 (72,8%) indivíduos negativos. Todos os indivíduos diagnosticados com malária foram positivos por microscopia e PCR, exceto 5 indivíduos que foram

detectados infectados apenas pelo teste de PCR. Dos 71 indivíduos infectados com *P. vivax*, a variante genotípica foi determinada em 54 por sequenciamento. A maioria dos indivíduos (n=49) estava infectada com a variante *P. vivax*-VK210, 3 com *P. vivax*-VK247 e 2 com infecção mista (VK210 e VK247). Nenhuma infecção por *P. vivax-like* foi detectada.

4.2.2 Prevalência e níveis de IgG contra as proteínas PvAMA-1, PvMSP-1₁₉ e PvCS

A prevalência de anticorpos IgG e subclasses específicos para os antígenos PvMSP-1₁₉, PvAMA-1 e PvCS foi determinada no plasma de 353 indivíduos (Tabela 4). A frequência de indivíduos positivos para as três proteínas foi similar, 66,6% para PvMSP-1₁₉, 64,0% para PvAMA-1 e 61,8% para PvCS. Comparando o perfil das subclasses de IgG, os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 foram os mais frequentes. Apesar dos anticorpos não-citofílicos terem sido menos prevalentes, IgG4 foi mais frequente para PvMSP-1₁₉ (46%) e IgG2 para PvAMA-1 (37,6%) quando comparados com os anticorpos não citofílicos específicos para a PvCS (IgG2- 25,2% e IgG4- 22,0%). Dentre os respondedores, a maioria dos indivíduos apresentou anticorpos para as três proteínas (38%) e apenas 12% dos indivíduos não responderam para nenhuma das proteínas.

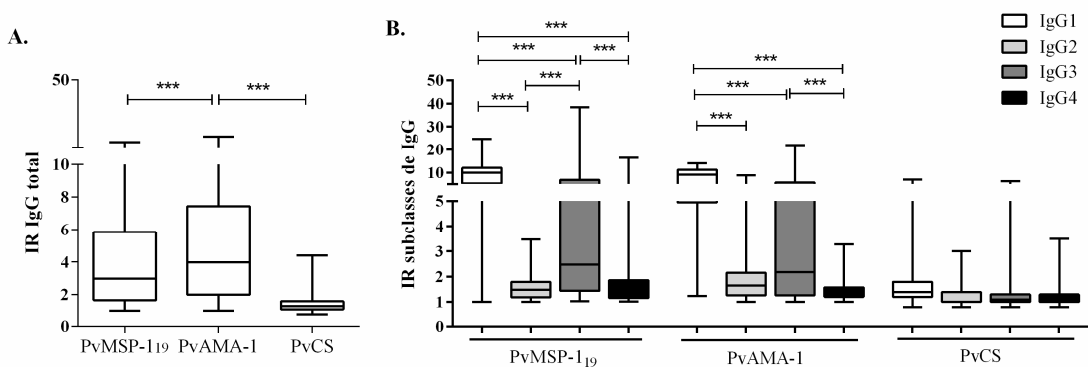
Tabela 4. Prevalência de IgG e subclasses para PvMSP-1₁₉, PvAMA-1 e PvCS.

Antígeno	Anticorpos	%	95%IC		
PvMSP-1₁₉	IgG total:	66.6	61.4	71.5	
	<i>Subclasses:</i>	IgG1	97.9	95.1	99.3
		IgG2	25.1	19.7	31.1
		IgG3	63.8	57.3	70.0
		IgG4	46.0	39.5	52.6
PvAMA-1	IgG total:	64.0	58.8	69.0	
	<i>Subclasses:</i>	IgG1	96.5	93.1	98.5
		IgG2	37.6	31.3	44.3
		IgG3	73.0	66.7	78.7
		IgG4	32.3	26.3	38.8
PvCS	IgG total:	61.8	56.5	66.9	
	<i>Subclasses:</i>	IgG1	54.6	47.6	61.3
		IgG2	25.2	19.6	31.5
		IgG3	47.7	40.9	54.6

IC= Intervalo de confiança

A frequência de anticorpos IgG positivos não mostrou diferença significativa, mas os níveis de anticorpos, quantificados pelo índice de reatividade (IR), foram significativamente diferentes entre os três antígenos (Figura 9). Os níveis de IgG específicos para PvAMA-1 foram maiores quando comparados com os níveis de anticorpos para PvMSP-1₁₉ e a PvCS ($p < 0,0001$) (Figura 9.A). Observamos uma correlação positiva entre os níveis de IgG específicos para PvCS com os níveis de anticorpos para PvMSP-1₁₉ ($r = 0,113$, $p = 0,032$) e PvAMA-1 ($r = 0,153$, $p = 0,004$). Avaliando os níveis de subclasses de IgG, os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 para PvMSP-1₁₉ e PvAMA-1 foram mais altos quando comparados aos anticorpos não citofílicos. Entretanto, para PvCS não houve diferença entre os níveis das subclasses de IgG (Figura 9.B).

Figura 9. Níveis de anticorpos IgG específicos e de subclasses de IgG contra PvMSP-1₁₉, PvAMA-1 e PvCS.



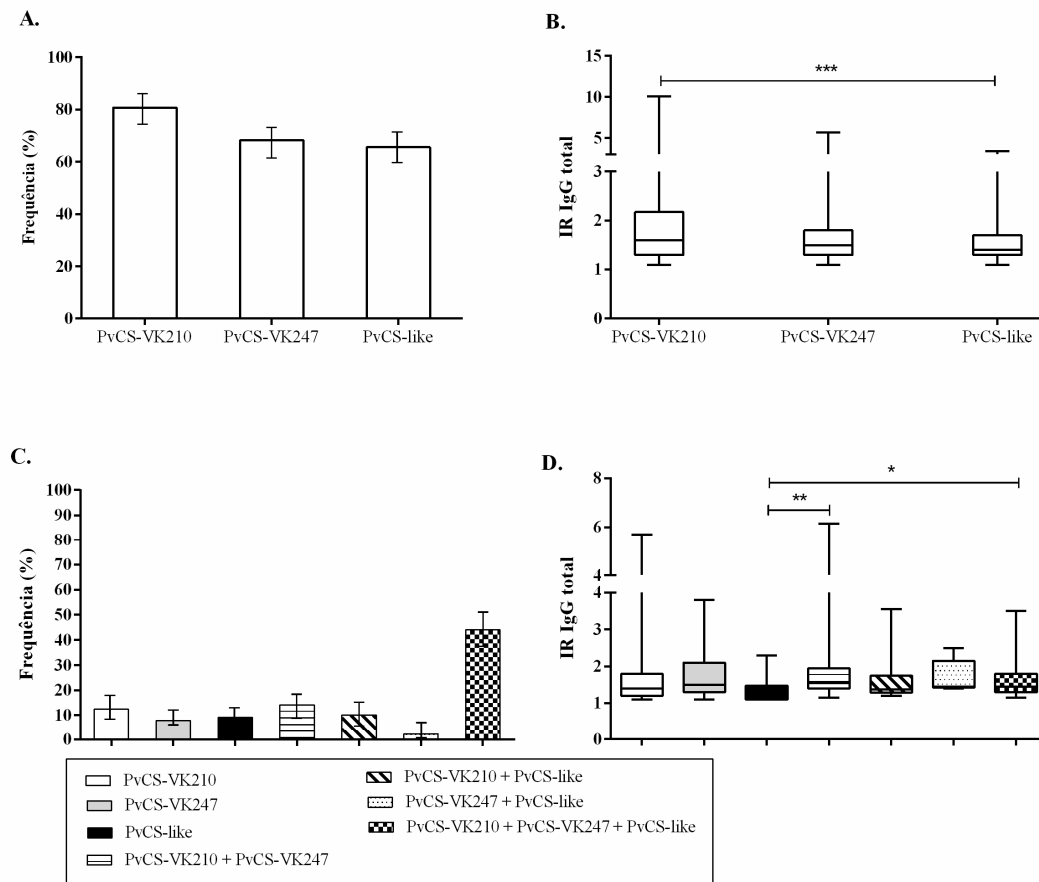
Boxplots dos níveis de IgG total (A) e subclasses (B) contra PvMSP-1₁₉ (n= 235), PvAMA-1 (n= 226) e PvCS (n= 218). Diferenças estatisticamente significativas são representadas nas barras e o nível de significância é expresso como *** $p < 0,0001$.

4.2.3 Prevalência e níveis de IgG e subclasses contra a CS das variantes de P. vivax

Entre os indivíduos IgG positivos para a CS de *P. vivax* (61,8%), a prevalência de anticorpos específicos para as variantes da proteína CS de *P. vivax* foram similares, 80,7% para PvCS-VK210; 68,3% para PvCS-VK247 e 65,6% para PvCS-like (Figura 10A). Já na magnitude da resposta, foram observados níveis de IgG

aumentados para *PvCS-VK210* quando comparados a *PvCS-like* (Figura 10.B). Dentre os respondedores para a CS, a maioria dos indivíduos respondeu para as três variantes (44%), não havendo diferença na frequência de indivíduos que respondem para apenas uma ou duas variantes (Figura 10.C). Entretanto, os níveis de anticorpos foram maiores nos indivíduos que respondiam para *PvCS-VK210* + *PvCS-VK247* quando comparados aos que respondiam para as três proteínas (*PvCS-VK210* + *PvCS-VK247* + *PvCS-like*) e para apenas *PvCS-like* (Figura 10.D). Não observamos nenhuma correlação nos níveis de anticorpos entre as variantes da *PvCS* ($p > 0,05$). Entretanto, observamos uma correlação positiva entre os níveis de IgG específicos para *PvCS-VK210* e *PvMSP-1₁₉* ($r = 0,169$, $p = 0,001$), e *PvAMA-1* ($r = 0,186$, $p = 0,0004$); *PvCS-VK247* e *PvMSP-1₁₉* ($r = 0,170$, $p = 0,001$), e *PvAMA-1* ($r = 0,138$, $p = 0,009$); e *PvCS-like* e *PvMSP-1₁₉* ($r = 0,189$, $p = 0,0003$), e *PvAMA-1₁₉* ($r = 0,140$, $p = 0,008$).

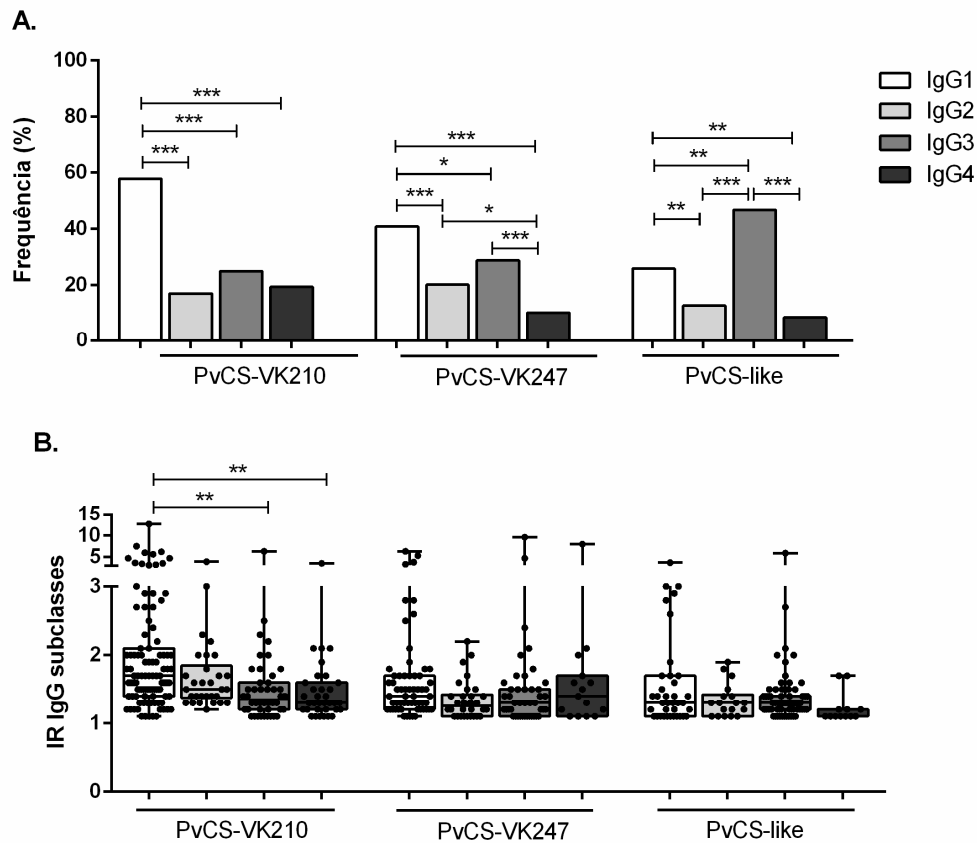
Figura 10. Prevalência e índices de reatividade de anticorpos IgG adquiridos naturalmente contra as repetições da CS das variantes de *P. vivax*.



Prevalência (A e C) e níveis de anticorpos IgG (B e D) para as repetições da PvCSVK210 (n= 176), PvCSVK247 (n= 149) e PvCS- (n= 143). Diferenças estatisticamente significativas são representadas nas barras e o nível de significância expresso como * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

O perfil das subclasses de IgG para as variantes mostrou que o anticorpo citofílico IgG1 foi mais frequente para PvCS-VK210 e PvCS-VK247, enquanto que para PvCS-like a subclasse IgG3 foi a mais frequente (Figura 11. A). Comparando os níveis de subclasses de IgG, os respondedores para PvCS-VK210 apresentaram níveis mais elevados de IgG1 quando comparados a IgG3 e IgG4 e não houve diferença nos níveis das subclasses para PvCS-VK247 e PvCS-like (Figura 11.B)

Figura 11. Prevalência e índices de reatividade de subclasses de IgG adquiridos naturalmente contra as repetições da CS das variantes de *P. vivax*.

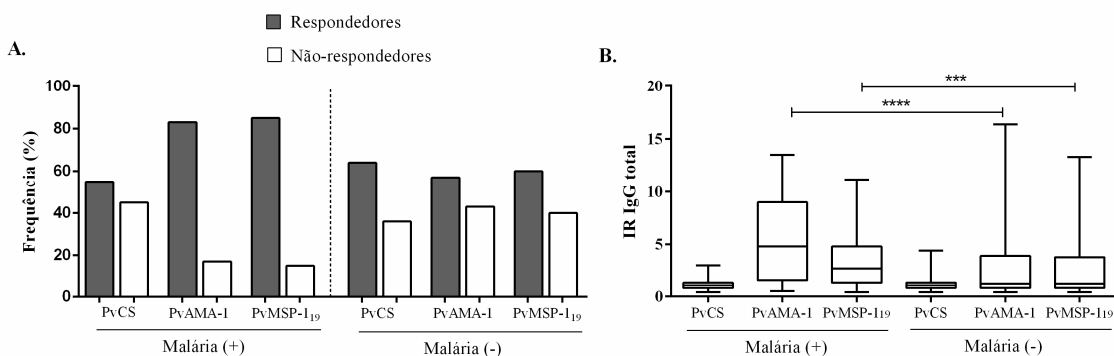


Prevalência (A) e níveis de subclasses de IgG (B) para as repetições da CS de PvCSVK210 (n= 176), PvCSVK247 (n= 149) e PvCS-like (n= 143). Diferenças estatisticamente significativas são representadas nas barras e o nível de significância expresso como * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

4.2.4 Associação do diagnóstico da malária e a resposta humoral

No momento da coleta 27,2% dos indivíduos se encontravam com malária. A prevalência de anticorpos entre os indivíduos com e sem diagnóstico de malária também foi comparada. Para as proteínas PvMSP-1₁₉ e PvAMA-1, a frequência de respondedores foi significativamente maior no grupo de indivíduos positivos para malária [Malária (+)]. Nos indivíduos negativos não houve diferença na prevalência de anticorpos entre respondedores e não respondedores (Figura 12.A). Para a PvCS não houve diferença na frequência de respondedores e não respondedores, tanto no grupo de indivíduos com malária quanto nos sem malária. Assim como os dados de prevalência, os níveis de IgG contra as proteínas, PvMSP-1₁₉ e PvAMA-1, foram superiores no grupo com malária ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Para a proteína PvCS os IR dos anticorpos foram inferiores e não houve diferença entre os indivíduos com e sem malária (Figura 12.B).

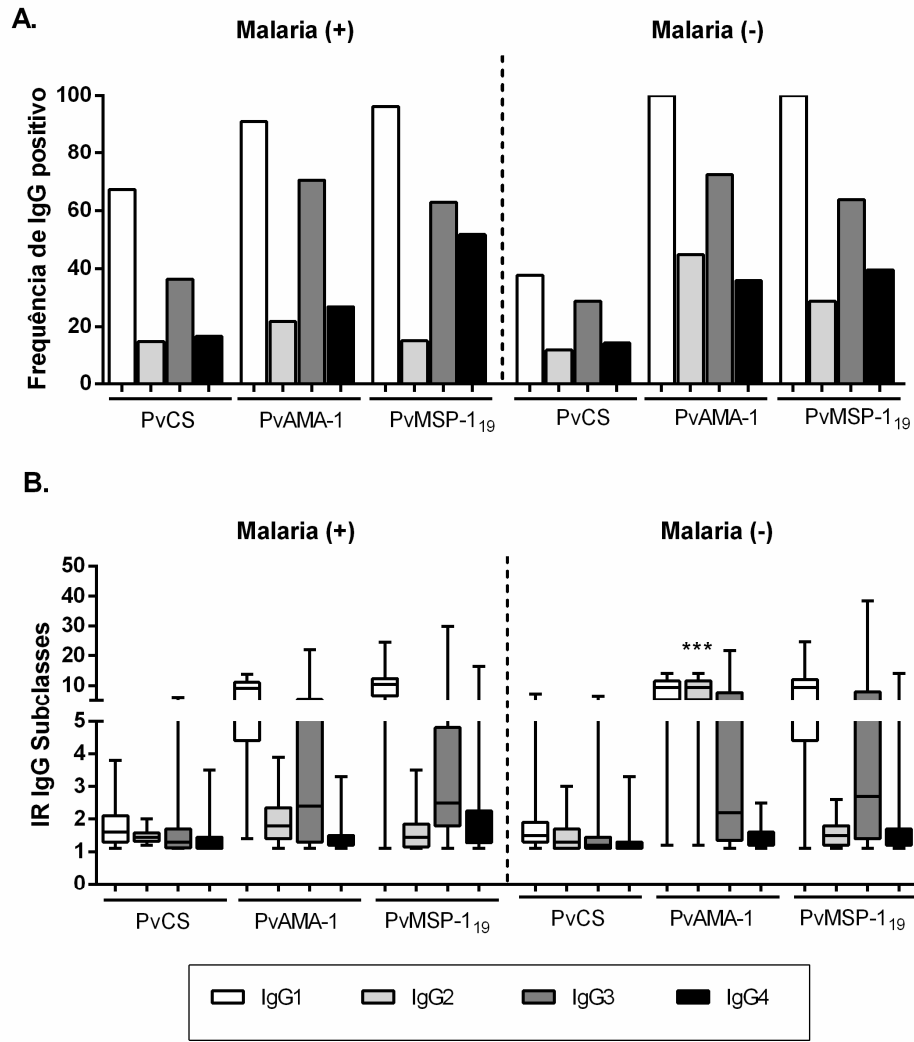
Figura 12. Frequência e níveis de IgG nos grupos Malária (+) e Malária (-).



Malária (+): indivíduos com diagnóstico positivo para malária (n= 96); Malária (-): indivíduos com diagnóstico negativo para malária (n= 257). Respondedores: indivíduos IgG positivos; Não-respondedores: indivíduos IgG negativos. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Avaliando as subclasses de IgG, foi observado uma predominância de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 PvCS, PvMSP-119 e PvAMA-1 independente do diagnóstico de malária (Figura 13.A). Já para as subclasses, não observamos nenhuma diferença nos IR em nenhuma das 3 proteínas testadas, com exceção de IgG2, que se encontrava aumentada para AMA-1 no grupo de indivíduos sem malária (Figura 13.B).

Figura 13. Prevalência e índice de reatividade das subclasses de IgG para as proteínas de *P. vivax* nos grupos Malária (+) e Malária (-).



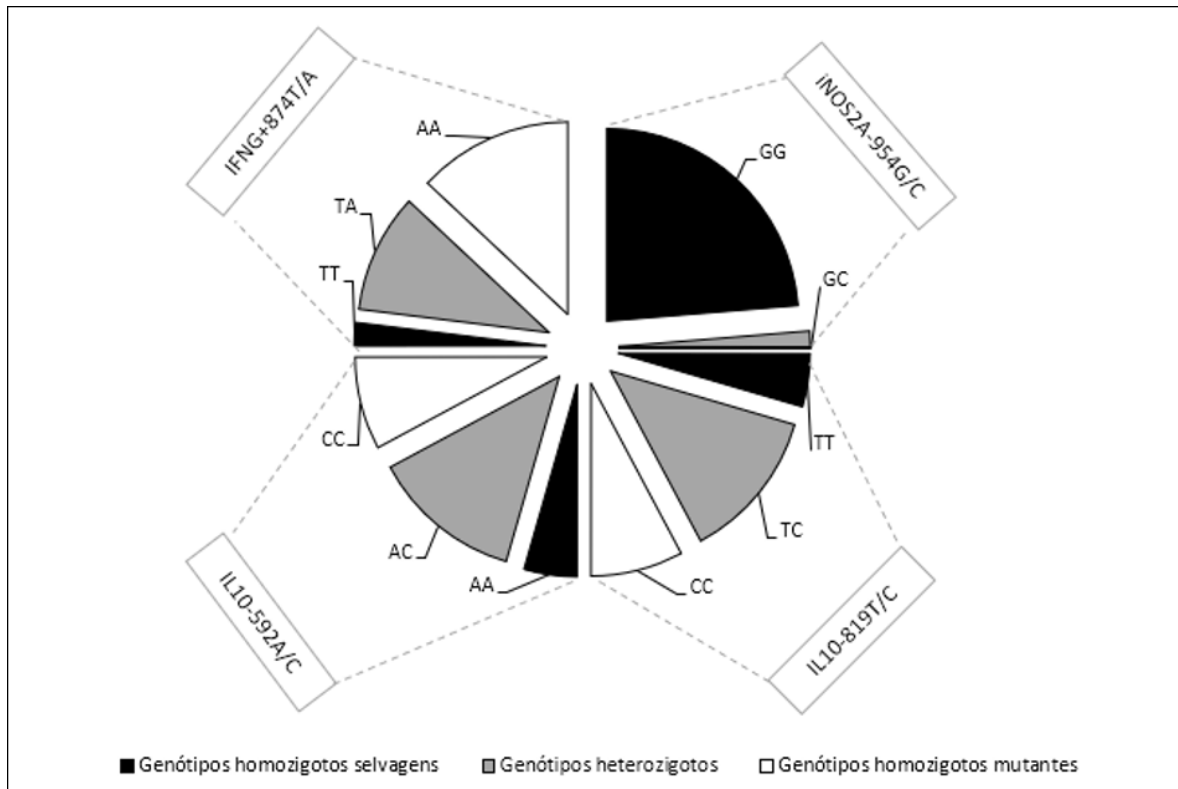
Prevalência (A) e níveis de subclasses de IgG (B) para a PvCS, PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉ nos grupos Malária (+), indivíduos com diagnóstico positivo para malária (n= 96), e Malária (-), indivíduos com diagnóstico negativo para malária (n= 257). Nível de significância expresso como * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Entre os indivíduos infectados com a variante *P. vivax* VK210 a prevalência de anticorpos para PvCS-VK210 foi de 48%, nos indivíduos com *P. vivax*-VK247 todos apresentaram anticorpos para PvCSVK247 e nos indivíduos com infecção mista (*P. vivax* VK210 e VK247) 50% apresentaram anticorpos para as regiões repetitivas correspondentes (dados não apresentados).

4.2.5 Frequência dos polimorfismos

Aproveitando os dados de genotipagem do trabalho 2, com o acréscimo de mais 64 indivíduos, a distribuição dos polimorfismos na população foi mantida (Figura 14). Os polimorfismos no gene da IL-10 (*IL10A*) nas posições -592A/C e -819T/C mostraram que os indivíduos portadores dos genótipos heterozigotos AC e TC (48,5%), assim como do alelo variante C, eram mais frequentes. Além disso, esses polimorfismos apresentaram forte desequilíbrio de ligação, indicando que a ocorrência dos dois SNPs é associada, com mesmas frequências de genótipos e alelos para os dois. No caso do polimorfismo *IFNG+874T/A* o genótipo homozigoto mutante AA foi o mais frequente na população (52,7%), seguido pelo heterozigoto (38,6%) e uma menor frequência do homozigoto selvagem (8,7%). Para o polimorfismo *NOS2A-954G/C*, mais de 90% da população apresentou o genótipo homozigoto selvagem GG, não tendo sido encontrado nenhum indivíduo carregando o genótipo homozigoto variante CC. Quando aplicado o teste de Qui-quadrado (χ^2), foi observado que apenas o polimorfismo *IL10A-1082G/A* não se encontra em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($\chi^2= 26,8$; $p= 0,000$), invalidando possíveis associações com a resposta aos antígenos testados a esse polimorfismo.

Figura 14. Distribuição dos SNPs na população de estudo.



4.2.6 Influência dos SNPs na resposta contra a PvMSP-1₁₉, PvAMA-1 e PvCS

A resposta de anticorpos IgG contra as proteínas CS, MSP-1₁₉ e AMA-1 de *P. vivax* foi relacionada com os polimorfismos das citocinas IFN- γ e IL-10 e da enzima iNOS numa associação de codominância (Tabela 5).

Utilizando o modelo recessivo para a análise de χ^2 , encontramos associação da presença do alelo T selvagem dos polimorfismos *IFNG+874T/A* com maior frequência de respondedores de IgG para a proteína PvMSP-1₁₉, com OR= 1,58 (95% CI= 1,00-2,50) e $p= 0,049$. Para a PvAMA-1, as frequências alélicas foram semelhantes em ambos os grupos, com alelos variantes mais frequentes para os polimorfismos *IFNG+874T/A* e *IL10A-592A/C* e *-819T/C*. A distribuição dos genótipos nos grupos estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p > 0,05$).

Nos grupos de indivíduos respondedores para a CS de *P. vivax* [PvCS (+)] e o de indivíduos não-respondedores [PvCS (-)] não foi observada diferença entre os genótipos dos polimorfismos das citocinas IFN- γ e IL-10 e da enzima iNOS ($p > 0,05$). A distribuição dos genótipos nos grupos estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p > 0,05$).

Tabela 5. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos grupos respondedores e não-respondedores para as proteínas PvCS, PvMSP-1₁₉ e PvAMA-1.

Polimorfismo		PvCS		OR (95% IC)	Valor P	PvAMA-1		OR (95% IC)	Valor P	PvMSP-1 ₁₉		OR (95% IC)	Valor P
		R (N=167)	NR (N= 165)			R (N=209)	NR (N=123)			R (N=216)	NR (N=116)		
IFNG+874T/A Genótipos	T/T	10 (6%)	19 (11,5%)	1,00		18 (8,6%)	11 (8,9%)	1,00		20 (9,3%)	9 (7,8%)	1,00	
	T/A	65 (38,9%)	63 (38,2%)	0,51 (0,22-1,18)	0,19	85 (40,7%)	43 (35%)	1,21 (0,52-2,78)	0,58	90 (41,7%)	37 (31,9%)	0,91 (0,38-2,19)	0,14
	A/A	92 (55,1%)	83 (50,3%)	0,47 (0,21-1,08)		106 (50,7%)	60 (56,1%)	0,94 (0,42-2,11)		106 (49,1%)	70 (60,3%)	1,47 (0,63-3,41)	
IL10A-592A/C e IL10A-819T/C Genótipos	A/A; T/T	26 (15,6%)	35 (21,2%)	1,00		42 (20,1%)	19 (15,4%)	1,00		47 (21,8%)	14 (12,1%)	1,00	
	A/C; T/C	82 (49,1%)	79 (47,9%)	0,72 (0,40-1,30)	0,38	103 (49,3%)	58 (47,1%)	0,80 (0,43-1,51)	0,36	103 (47,7%)	58 (50%)	1,89 (0,96-3,72)	0,06
	C/C	59 (35,3%)	51 (30,9%)	0,64 (0,34-1,21)		64 (30,6%)	46 (37,4%)	0,63 (0,32-1,22)		66 (30,6%)	44 (37,9%)	2,24 (1,10-4,54)	
NOS2A-952G/C Genótipos	G/G	156 (93,4%)	159 (96,4%)	1,00		197 (94,3%)	118 (95,9%)	1,00		204 (94,4%)	111 (95,7%)	1,00	
	G/C	11 (6,6%)	6 (3,6%)	0,54 (0,19-1,48)	0,22	12 (5,7%)	5 (4,1%)	1,44 (0,49-4,18)	0,5	12 (5,6%)	5 (4,3%)	0,77 (0,26-2,23)	0,62
	C/C	-	-	-		-	-	-		-	-	-	

IFNG: gene interferon gama; IL10A: gene interleucina 10; NOS2A: gene óxido nítrico sintase indutase; Genótipos, n (%); OR (95% ci), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; Análise pelo teste χ^2 utilizando o modelo de codominância.

4.2.7 Influência dos SNPs na resposta contra as variantes de *P. vivax*

A tabela 6 mostra as análises das frequências genóticas dos polimorfismos das citocinas IFN- γ e IL-10 e da iNOS nos grupos de respondedores e não-respondedores para as repetições da CS das três variantes genóticas de *P. vivax*. A distribuição dos genótipos nos grupos estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p > 0,05$). Para os grupos de indivíduos respondedores e não-respondedores para a repetição da variante VK210 [PvVK210 (+) e PvVK210 (-)] não foi observada nenhuma associação com os diferentes genótipos. Contudo, a variável gênero parece ter uma influência no genótipo AA e TT dos polimorfismos do gene *IL10A*, que apresentou maior frequência de respondedores do gênero masculino após ajuste da análise por idade e espécie plasmodial infectante ($p = 0,0025$).

Para os grupos de indivíduos respondedores e não-respondedores para a repetição da variante VK247 [PvVK247 (+) e PvVK247 (-)] também não foi encontrada associação com os polimorfismos e nem com outras variáveis epidemiológicas ($p > 0,05$).

Na análise dos grupos de indivíduos respondedores e não-respondedores para a repetição da variante *P. vivax-like* [Pvlike (+) e Pvlike (-)] foi encontrada associação entre a presença dos genótipos AC-TC e CC dos polimorfismos IL10A-592A/C e -819T/C e a resposta específica de IgG para Pvlike. Indivíduos carregando esses genótipos tiveram maior frequência de respondedores tanto no modelo de codominância quanto no de dominância para as análises de χ^2 ($p = 0,038$ e $p = 0,011$, respectivamente). Para os polimorfismos *IFNG+874T/A* e *NOS2A-954G/C* não foi encontrada associação com a resposta para Pvlike, assim como com as interações com variáveis epidemiológicas.

Tabela 6. Distribuição dos SNPs para os indivíduos respondedores e não-respondedores para a CS das variantes de *P. vivax*

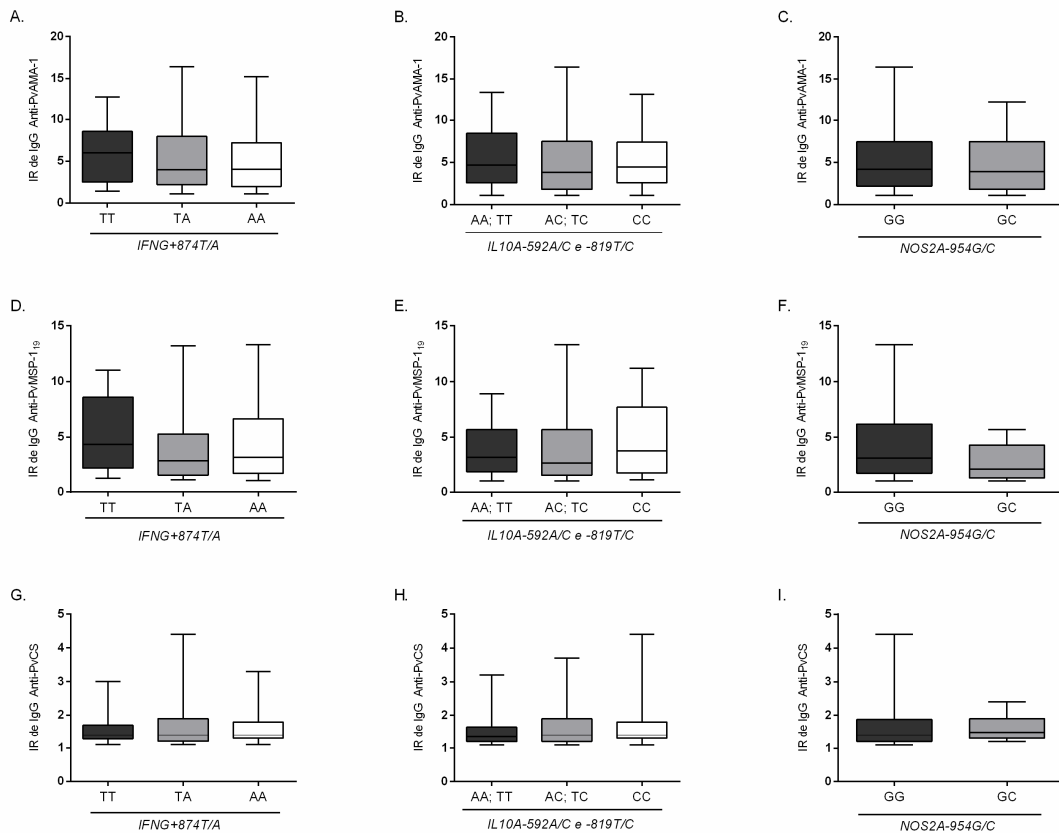
Polimorfismo		PvCS-VK210		OR (95% IC)	Valor P	PvCS-VK247		OR (95% IC)	Valor P	PvCS-like		OR (95% IC)	Valor P
		R (N=165)	NR (N= 167)			R (N=141)	NR (N=191)			R (N=134)	NR (N=198)		
IFNG+874T/A Genótipos	T/T	11 (6,7%)	18 (10,8%)	1,00	0,41	11 (7,8%)	18 (9,4%)	1,00	0,85	8 (6%)	21 (10,6%)	1,00	0,28
	T/A	65 (39,4%)	63 (37,7%)	0,59 (0,26-1,35)		56 (39,7%)	72 (37,7%)	0,79 (0,34-1,80)		51 (38,1%)	77 (38,9%)	0,58 (0,24-1,40)	
	A/A	89 (53,9%)	86 (51,5%)	0,59 (0,26-1,32)		74 (52,5%)	101 (52,9%)	0,83 (0,37-1,87)		75 (56%)	100 (50,5%)	0,51 (0,21-1,21)	
IL10A-592A/C e IL10A-819T/C Genótipos	A/A; T/T	26 (15,8%)	35 (21%)	1,00	0,47	23 (16,3%)	38 (19,9%)	1,00	0,52	16 (11,9%)	45 (22,7%)	1,00	0,038
	A/C; T/C	83 (50,3%)	78 (46,7%)	0,70 (0,39-1,26)		67 (47,5%)	94 (49,2%)	0,85 (0,46-1,56)		71 (53%)	90 (45,5%)	0,45 (0,24-0,86)	
	C/C	56 (33,9%)	54 (32,3%)	0,72 (0,38-1,35)		51 (36,2%)	59 (30,9%)	0,70 (0,37-1,33)		47 (35,1%)	63 (31,8%)	0,48 (0,24-0,94)	
NOS2A-952G/C Genótipos	G/G	155 (93,9%)	160 (95,8%)	1,00	0,44	131 (92,9%)	184 (96,3%)	1,00	0,16	124 (92,5%)	191 (96,5%)	1,00	0,12
	G/C	10 (6,1%)	7 (4,2%)	0,68 (0,25-1,83)		10 (7,1%)	7 (3,7%)	0,50 (0,18-1,34)		10 (7,5%)	7 (3,5%)	0,45 (0,17-1,23)	
	C/C	-	-	-		-	-	-		-	-	-	

IFNG: gene interferon gama; IL10A: gene interleucina 10; NOS2A: gene óxido nítrico sintase indutase; Genótipos, n (%); OR (95% ci), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; Análise pelo teste χ^2 utilizando o modelo de codominância.

Com o objetivo de verificar se a ocorrência dos SNPs investigados influenciava na frequência e magnitude da resposta para as proteínas PvMSP-1₁₉, PvAMA-1 e PvCS comparamos os níveis de IgG, medidos através do índice de reatividade (IR), com os genótipos encontrados na população estudada (Figuras 15 a 16).

Na análise funcional dos polimorfismos investigados, *IFNG+874T/A*, *IL10A-592A/C*, *IL10A-819T/C* e *NOS2A-954G/C*, os níveis de IgG para os antígenos PvAMA-1, PvMSP-1₁₉ e PvCS foram semelhantes para os diferentes genótipos carregados na população estudada (Figura 15.A-I).

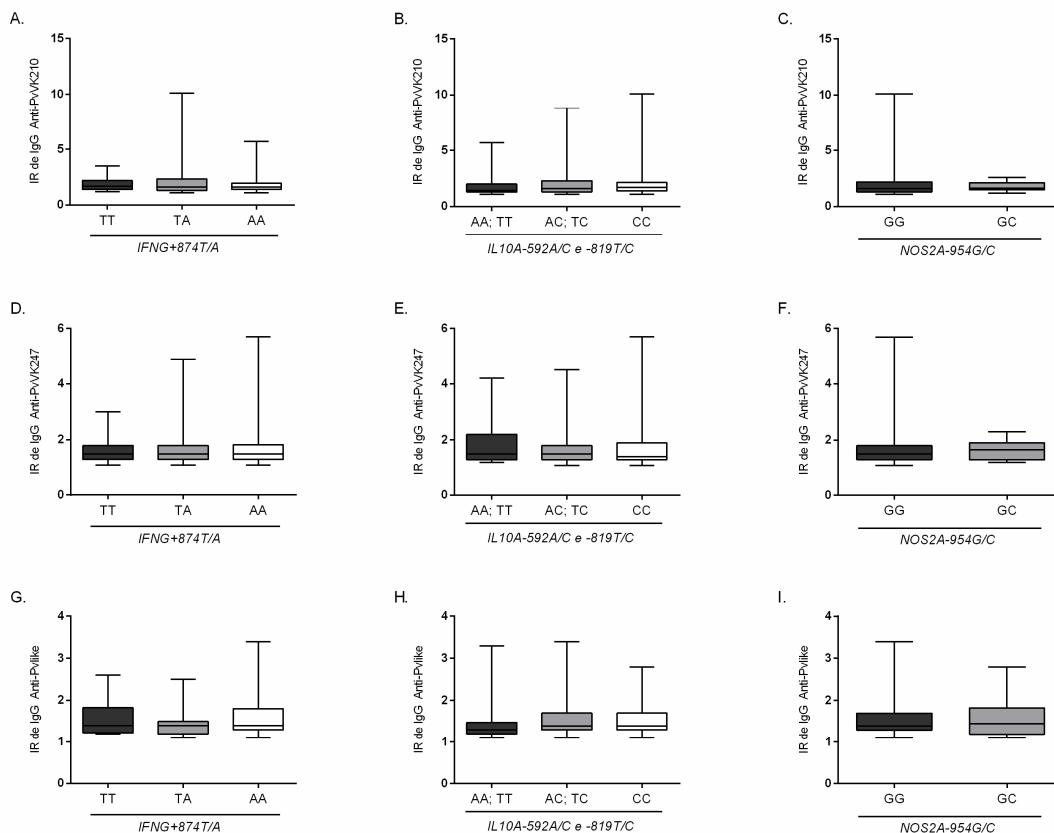
Figura 15. Níveis de IgG contra os antígenos de *P. vivax* de acordo com os genótipos encontrados na população.



IR, índice de reatividade de IgG contra cada proteína de *P. vivax*; Anti-PvAMA-1, IgG específico para a proteína AMA-1 de *P. vivax*; Anti-PvMSP-1₁₉, IgG específico para a proteína MSP-1₁₉ de *P. vivax*; Anti-PvCS, IgG específico para a proteína CS de *P. vivax*; IFNG, gene interferon gama; IL10A, gene interleucina 10; NOS2A, gene óxido nítrico sintase indutase.

A análise funcional dos polimorfismos também foi conduzida para os níveis de IgG específicos para as variantes genotípicas de *P. vivax*. Assim como demonstrado nas análises para a CS de *P. vivax* acima, os níveis de IgG para as repetições das variantes de *P. vivax* também apresentaram níveis semelhantes entre os genótipos encontrados para os polimorfismos *IFNG*+874T/A (Figura 16 A, D e G), *IL10A*-592A/C, *IL10A*-819T/C (Figura 16 B, E e H) e *NOS2A*-954G/C (Figuras 16 C, F e I).

Figura 16. Níveis de IgG contra as variantes de *P. vivax* de acordo com os genótipos encontrados na população.



IR, índice de reatividade de IgG contra cada variante de *P. vivax*; Anti-PvVK210, IgG específico para a repetição da CS de *P. vivax*-VK210; Anti-PvVK247, IgG específico para a repetição da CS de *P. vivax*-VK247; Anti-Pvlike, IgG específico para a repetição da CS de *P. vivax*-like; *IFNG*, gene interferon gama; *IL10A*, gene interleucina 10; *NOS2A*, gene óxido nítrico sintase indutase.

5 DISCUSSÃO

A resposta humoral a antígenos plasmodiais tem sido utilizada para medir a intensidade de transmissão da malária e está sendo cada vez mais incorporada em estudos transversais e longitudinais para monitorar mudanças na transmissão, identificar *hot spots* de transmissão e grupos de alto risco em áreas da África, Ásia e na região Amazônica (174–182). Entretanto, a utilidade dos marcadores sorológicos para avaliar a endemicidade em condições de baixa transmissão e seu potencial de uso como evidência para a eliminação da malária, ainda é controverso (71,183–186).

Com o Brasil lançando o plano de eliminação de malária por *P. falciparum* em 2015, achamos oportuno verificar se a prevalência e os níveis de anticorpos para a proteína circumsporozoíta (CS) de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* poderia ser utilizada como ferramenta para monitorar a presença e o grau de exposição da população a essas espécies plasmodiais (**Artigo 1**). Dentro desse contexto, Rondônia tinha uma situação epidemiológica favorável a esse estudo. Nos últimos 10 anos, o estado experimentou um declínio grande na proporção de casos de *P. falciparum* para quase 11%, um aumento progressivo na proporção de *P. vivax* para 88% e raros casos notificados de *P. malariae*.

Nossos resultados mostraram que a prevalência de anticorpos para as repetições da CS de *P. vivax* (62%) e *P. falciparum* (49%) foram maiores do que as estimadas com base na análise do diagnóstico parasitológico e/ou PCR e revelou a presença de anticorpos para a CS de *P. malariae* (46%) mesmo sem termos diagnosticado essa espécie. Entretanto, este dado não nos surpreendeu, já que anticorpos para a CS de *P. malariae* já foram relatados em 5 estados da região da Amazônia, incluindo Rondônia, tanto por testes sorológicos quanto por moleculares (76,187,188). Já é bem documentado que o *P. malariae* tem a habilidade de permanecer no hospedeiro como infecção crônica assintomática, de baixa densidade e podendo recrudescer décadas após a exposição inicial mesmo depois de anos fora da área endêmica (189–191). Portanto, as baixas parasitemias podem ter dificultado a detecção do *P. malariae* nos testes parasitológico e molecular ou então a presença de anticorpos anti-CS de *P. malariae*, na ausência de diagnóstico positivo, seja resultante de reações cruzadas com a CS do *P. brasilianum* (192,193).

No geral, a prevalência de anticorpos anti-CS não teve relação com a infecções atuais, comprovadas na gota espessa/PCR, ou com história pregressa de infecções recentes relatadas pelos indivíduos, e parece ter pouco impacto na soropositividade e na intensidade da resposta para CS, visto que a prevalência e os níveis de anticorpos anti-CS não foram significativamente diferentes entre os indivíduos com diagnóstico positivo e negativo para malária. Isso é consistente com outros estudos que mostraram a ausência de resposta de anticorpos anti-CS em indivíduos com exposição confirmada (194–197). É importante notar que, no caso da baixa resposta para a CS de *P. vivax* mesmo em indivíduos com diagnóstico positivo, a presença de infecção no sangue não indica necessariamente uma nova infecção, mas pode ser decorrente de uma recaída ou falha do tratamento. Em uma coorte na Papua Nova Guiné, estimou-se que 80% das infecções em crianças por *P. vivax* foram atribuídas a recidivas (198). No município de Porto Velho, Rondônia, também foi mostrado que 23% dos pacientes com *P. vivax* apresentaram de 1 a 11 recidivas por ano, sugerindo que as recidivas também são frequentes em áreas endêmicas brasileiras (199). Não sabemos se a presença de hipnozoítos influenciam na manutenção e intensidade da resposta imune humoral, principalmente ao esporozoíto.

Numerosos estudos associam a resposta imune humoral anti-esporozoíta, principalmente para a CS de *P. falciparum*, com o efeito cumulativo de infecções repetidas e com a idade (200–202). No nosso estudo não observamos nenhuma correlação entre a resposta IgG específica à CS e idade, tempo de residência em área endêmica, número de infecções anteriores por malária e tempo decorrido desde a última infecção. A presença de anticorpos anti-CS para as três espécies plasmodiais parece indicar apenas exposição da população a essas espécies (196,197,203). Por outro lado, observamos ausência de resposta humoral para a CS em 28% dos indivíduos com diagnóstico positivo para *P. falciparum* ou para *P. vivax*, incluindo indivíduos com história pregressa de exposição à malária.

Considerando que as moléculas do HLA Classe II têm um papel importante na resposta imune humoral a antígenos plasmodiais, incluímos também estas análises no nosso estudo (104,204). De fato, os grupos alélicos HLADRB1*01 e HLA-DQB1*05 foram associados à ausência de resposta para PvCS e PfCS, e o haplótipo DRB1*01~DQB1*05 também foi associado ao grupo não respondedor, incluindo os que não respondem ao *P. malariae*. Vale ressaltar que segundo o Registro Nacional Brasileiro dos Doadores Voluntários da Medula Óssea, a

frequência alélica de DRB1*01 na região amazônica é de 19,73%, semelhante a Rondônia que é de 19,79% (205). Além disso, nas vezes em que ambos DRB1 e DQB1 foram tipados tanto na região Amazônica (99,3%) como em Rondônia (98,9%), a presença de DRB1*01 esteve associada ao alelo DQB1*05, indicando um desequilíbrio de ligação. HLA-DRB1*01 também foi associado negativamente com regiões repetitivas do antígeno MSP-9 de *P. vivax* na Amazônia brasileira, e o HLA-DQB1*05 juntamente com o HLA-DRB1*13 foi associado a uma suscetibilidade reduzida a malária em crianças da Gâmbia (104,206). Em contraste, observamos uma maior frequência dos haplótipos DRB1*07~DQB1*02 e DRB1*04~DQB1*03 em respondedores para a PfCS e haplótipo DRB1*16~DQB1*03 para PfCS e PvCS. Os dados do **artigo 1** mostram que em áreas de baixa transmissão de malária, a sorologia para a CS de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, medidas em um único estudo transversal, não é um bom indicador de intensidade de transmissão e nem de exposição recente à malária, especialmente em área com alta prevalência de *P. vivax*. Além disso, no contexto da eliminação da malária, fatores que afetam a aquisição e a manutenção de anticorpos antimaláricos são importantes para o desenvolvimento de ferramentas de vigilância sorológica.

A susceptibilidade a doenças é pelo menos em parte geneticamente determinada. Assim como observado na associação entre a resposta humoral à CS e os alelos de HLA, polimorfismos nos genes de citocinas também influenciam na resposta imune (207–210). Na malária, as citocinas são responsáveis pelos sintomas, pelas alterações patológicas, pelo desfecho da infecção e dependem da regulação das respostas pró e anti-inflamatórias. IFN- γ , IL-10 e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) são capazes de mediar estes processos, e sua produção pode ser afetada por polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes dessas citocinas. No **artigo 2**, a relação entre os níveis das citocinas IFN- γ , IL-10 e da iNOS e seus polimorfismos foi examinada em indivíduos infectados por *P. vivax* e *P. falciparum* e nos expostos a infecção.

Ao verificar as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *IFNG+874T/A* observamos que o alelo variante A foi mais comum na população, bem como o genótipo homocigoto AA correspondente. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados nas regiões amazônicas brasileira e colombiana. Em outras regiões do Brasil o genótipo homocigoto AA é predominante, e esse polimorfismo tem uma importante associação com tuberculose (140,211–213). Não observamos nenhuma diferença na distribuição dos genótipos e alelos no

polimorfismo *IFNG+874T/A* entre os indivíduos com diagnóstico positivo e negativo para a malária. Nos poucos trabalhos que encontraram associações entre a malária e o polimorfismo *IFNG+874T/A*, estas associações foram fracas ou não significativas (214,215). Embora tenhamos encontrado altos níveis da citocina IFN- γ nos indivíduos com malária, não foi observada relação entre o polimorfismo *IFNG+874T/A* e os níveis séricos de IFN- γ . Contrário aos nossos resultados, Medina e colaboradores relataram uma concentração menor de IFN- γ em pacientes carregando o genótipo AA (140).

A investigação do polimorfismo no gene *IL10A* mostrou que nenhuma associação foi detectada entre o polimorfismo na posição -1082 e os níveis de IL-10 ou com a ocorrência da doença, apesar desse polimorfismo ter sido associado com baixa produção de IL-10, malária aguda ou grave e com níveis de IgG específicos para proteínas do plasmódio (153,154,216–218). Entretanto, na nossa população este polimorfismo não estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, impossibilitando a análise deste polimorfismo com os níveis desta citocina nos pacientes com malária. No caso dos polimorfismos nas posições 592A/C e -819T/C do gene *IL10A*, foi possível demonstrar associação entre a produção da IL-10 e densidade parasitária. Uma alta prevalência dos alelos C e da variante homozigótica -592CC/-819CC foi encontrada nos indivíduos sem malária, enquanto que uma maior prevalência de alelos selvagens A/T e genótipo homozigótico -592AA/-819TT foi constatada nos indivíduos com malária, sugerindo que a presença do alelo C propicie um menor risco de contrair malária. A presença do genótipo CC pode criar um sítio de ligação desfavorável a produção da IL-10 (219). De fato, portadores do alelo C variante foram baixos produtores de IL-10 e apresentaram baixa densidade de parasitos, enquanto que os portadores de alelos A/T foram alto produtores de IL-10 e apresentaram alta densidade parasitária. Nos haplótipos de *IL10A* nas posições -592/ -819/ -1082, não observamos nenhuma associação entre os haplótipos mais frequentes, CCG e ATA, com o risco de ter malária. No entanto, os portadores do haplótipo GTA foram mais prevalentes no grupo de indivíduos com malária enquanto que os portadores do haplótipo ACC foram mais prevalentes no grupo sem malária. A combinação alélica GCT dos três polimorfismos foi associada com baixo risco de infecções por *P. vivax* no Amazonas (220), porém este haplótipo não foi encontrado na população aqui estudada (Rondônia), nem no estado do Pará (140), ambas áreas endêmicas da Amazônia. A relação entre estes SNPs comuns da região promotora

do gene *IL10A* e a gravidade da malária apresentou resultados contraditórios em diferentes regiões (140,153,218).

Para o polimorfismo *NOS2A-954G/C* as frequências alélicas e genótípicas encontradas foram semelhantes as relatadas em populações da região sul e sudeste do Brasil (162,221) e não observamos nenhuma associação com a suscetibilidade à malária, níveis de NO ou a parasitemia. Vale ressaltar que o alelo C estava presente em menos de 4% da população estudada. Este alelo está ausente em caucasianos e é encontrado em baixa frequência na Ásia (169), porém na população africana apresenta alta frequência e está associado com a malária (222). Embora nenhuma associação tenha sido encontrada, este estudo é o primeiro a relatar o polimorfismo *NOS2A-954G/C* e os níveis de NO em indivíduos expostos à malária em região endêmica do Brasil. Esse polimorfismo tem sido associado à susceptibilidade à malária por *P. falciparum*, mas o papel desempenhado pela molécula de NO na malária ainda é controverso. Alguns estudos associam a presença do alelo C ao risco de malária cerebral e a maior produção de NO (167,169).

Os **resultados complementares** apresentados nesta tese, além de descrever a resposta imune humoral para as proteínas de forma sanguínea e para as variantes de *P. vivax*, também investigou a influência dos polimorfismos de citocinas na resposta humoral específica para antígenos plasmodiais. Os nossos resultados mostraram que a população estudada apresentou prevalências similares de anticorpos para as três proteínas de *P. vivax* testadas (PvCS, PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉), demonstrando que essas proteínas foram imunogênicas. Estudos conduzidos em diferentes áreas endêmicas brasileiras relataram uma importante prevalência de anticorpos para essas proteínas no estado de Rondônia, Pará, Amazonas, Acre e Amapá (112,223–227). Para as subclasses de IgG, observamos que na população estudada estes anticorpos eram predominantemente IgG1 e IgG3 para todos os antígenos testados, com níveis mais elevados para PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉, em comparação à resposta contra a PvCS. O papel das subclasses de IgG na proteção à malária ainda apresenta dados controversos, porém foi sugerido que apenas os anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, têm papel protetor (228). Na Ásia Ocidental e na África a predominância dos anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 foi demonstrada na resposta contra a CS, MSP-1₁₉ e AMA-1 e foram correlacionadas com proteção à malária (229,230). No geral, a produção de anticorpos contra a CS foi independente da infecção detectada no sangue, uma vez que a prevalência e os níveis de anticorpos foram semelhantes nos indivíduos com exposição confirmada a

P. falciparum, *P. vivax* e *P. malariae* (68,195–197,231). Kusi e colaboradores demonstraram que os anticorpos anti-CS de *P. falciparum* se formaram em uma taxa mais lenta e decaíram em uma taxa mais rápida em comparação com os anticorpos contra os estágios sanguíneos do soro de indivíduos de áreas de baixa transmissão acompanhados por 6 meses no Gana (70). Essa observação também foi relatada na aquisição natural de anticorpos IgG para a CS de *P. falciparum* em crianças da Papua Nova Guiné (229). Na população aqui estudada, a presença da infecção malárica parece aumentar a prevalência e os níveis de IgG para os antígenos PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉, sugerindo que anticorpos IgG específicos aumentados para essas proteínas podem ser um indicativo de infecção recente. A observação é consistente com outros estudos que mostraram um aumento na prevalência de anticorpos para AMA-1 e MSP-1 após episódio agudo de malária em área de alta transmissão e confirmaram a alta imunogenicidade da PvMSP-1₁₉ em indivíduos com exposição recente à infecções por *P. vivax* (232,233). Além disso, o “boosting” de resposta humoral específica às proteínas AMA-1 e MSP-1 foi observado em estudos de imunizações (234–236). Reforçando a relação da PvMSP-1₁₉ com a exposição recente, neste estudo os títulos de IgG foram superiores nos indivíduos com menor tempo decorrido desde a última infecção e decaíram ao longo do tempo. Para a resposta humoral específica para a CS de *P. vivax* estudos relataram de 20 a 100% dos indivíduos apresentando manutenção de anticorpos IgG específicos por até 7 anos na ausência de exposição à infecção em área de baixa transmissão da malária na Tailândia (237) e em área livre de transmissão no Brasil (238).

Na avaliação das variantes genótípicas de *P. vivax* foi visto que a maioria da população do estudo estava infectada pela variante VK210, 5 indivíduos pela VK247 (2 com infecção mista VK210+VK247) e nenhum infectado por *P. vivax-like*. Um estudo molecular realizado em Rondônia demonstrou alta frequência da variante V210 de *P. vivax* e as outras duas variantes ocorreram apenas em infecções mistas (72). De fato, a ocorrência global de variantes do *P. vivax* VK247 e do *P. vivax-like* tem sido frequentemente encontrada em infecções mistas (239,240). Neste estudo, os dados sorológicos indicam que os indivíduos da área de estudo estão expostos às três variantes genótípicas de *P. vivax*. Em pesquisas sorológicas também no estado de Rondônia, a frequência de anticorpos IgG para as repetições da CS de todas as três variantes de *P. vivax* apresenta resultados contraditórios, com prevalência variando de 50 a 70% e de 24 a 34% (77,240). Na população observamos maior frequência de indivíduos IgG positivo para a variante VK210 e

frequências similares para VK247 e *P. vivax-like*. Estudos anteriores também demonstraram maior prevalência de anticorpos naturalmente adquiridos para a VK210 na Tailândia (75), Peru (74), Colômbia (241) e Brasil e Índia (239), demonstrando a predominância da variante clássica mesmo em países tão distantes uns dos outros. Além disso, os níveis de IgG estavam significativamente aumentados para VK210 quando comparados aos níveis de *P. vivax-like*, e na avaliação das subclasses de IgG, o anticorpo citofílico IgG1 foi o mais frequente para PvCS-VK210 e PvCS-VK247, enquanto que para PvCS-like a subclasse IgG3 foi a mais frequente. Ao nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a verificar a resposta humoral das subclasses de IgG para as variantes de *P. vivax*.

Nossos resultados mostraram que a resposta humoral específica para os antígenos testados parece sofrer influência dos SNPs nos genes das citocinas. Para o polimorfismo *IFNG+874T/A*, indivíduos carregando o alelo T selvagem, parecem apresentar maior frequência de resposta de IgG para PvMSP-1₁₉, porém essa diferença não foi significativa. Ainda em área endêmica brasileira, Furini e colaboradores também relataram uma possível associação do alelo T com a resposta de IgG para PvMSP-1₁₉ em uma população do Pará (242). Para os polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C*, indivíduos carregando o alelo C variante apresentaram maior frequência de respondedores para a CS de *P. vivax-like*. Visto que a IL-10 promove a ativação e diferenciação de células B, e a síntese de anticorpos, é esperado que a associação encontrada do alelo C com baixos níveis da IL-10 levasse a níveis reduzidos de IgG, porém surpreendentemente encontramos dados controversos para a resposta da CS de Pvlike, necessitando de maiores investigações acerca dos mecanismos envolvidos. Além disso, os alelos A e T dos SNPs nas posições -592 e -819, altos produtores de IL-10, já foram relacionados com alta produção de IgE em indivíduos com *Schistosoma mansoni* no Brasil, corroborando com a associação positiva esperada entre a IL-10 e a produção de anticorpos (243). No Brasil, dois estudos realizados em uma população do Pará observaram uma distribuição genotípica semelhante para os polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* entre os grupos de indivíduos infectados e não-infectados, não encontrando associação dos portadores deste polimorfismo com a ocorrência da malária ou com os níveis de IgG para as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉ (215,242). Estudos que avaliaram o efeito dos SNPs nas posições -592 e -819 na resposta à antígenos de *P. falciparum*, encontraram associação entre estes SNPs e os níveis de IgG anti-NANP e IgG4 e IgE para extrato antigênico de formas sanguíneas de *P.*

falciparum (217,244). O polimorfismo NOS2A-954G/C foi relatado pela primeira vez em uma área endêmica de malária no Gabão (169), sugerindo uma pressão seletiva exercida pelo *Plasmodium*, contudo o alelo C variante foi pouco frequente na população estudada e não observamos nenhuma associação entre a distribuição alélica e genotípica deste SNP e a resposta humoral naturalmente desenvolvida aos antígenos de *P. vivax*.

Considerando os achados deste estudo, foi possível demonstrar a influência do HLA na resposta específica contra a CS, que se mostrou não ser um bom marcador de transmissão da doença na área de estudo. Ao contrário do encontrado para a CS, observamos associação entre a resposta de IgG específicos para as proteínas de estágios sanguíneos com a infecção recente. Verificamos que a presença do alelo C mutante dos polimorfismos do gene da IL-10 parece ter um papel na modulação da resposta à infecção malárica, reduzindo os níveis da IL-10 e da parasitemia. Além disso, a resposta específica para a CS da variante *P. vivax-like* é aumentada em indivíduos carreadores deste alelo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

❖ A população estudada está exposta as 3 espécies plasmodiais, como indicado pela presença de indivíduos com anticorpos específicos para a região repetitiva da proteína CS de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*.

❖ A alta prevalência de anticorpos para *P. malariae* confirma que essa espécie ocorre no estado de Rondônia apesar de ser raramente notificada.

❖ A prevalência e os níveis de anticorpos para a proteína CS de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* não é uma boa ferramenta para monitorar a presença e o grau de exposição da população a essas espécies plasmodiais em áreas endêmicas brasileiras.

❖ Dentre as variantes de *P. vivax*, a VK210 é predominante no diagnóstico molecular, porém a sorologia para a CS de *P. vivax* mostra que a população está exposta aos três genótipos (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) no estado de Rondônia.

❖ A presença de infecção recente influencia a resposta de IgG específica para as proteínas AMA-1 e MSP-1₁₉ de *P. vivax*, enquanto para a CS de *P. vivax* não há associação. Para as três proteínas testadas a resposta é predominantemente de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3).

❖ A resposta de IgG para a proteína CS de *P. falciparum* está associada com a presença dos haplótipos de HLADRB1*07~DQB1*02 e HLADRB1*04~DQB1*03, e para a CS de *P. vivax* e *P. falciparum* com o haplótipo HLADRB1*16~DQB1*03. Em contraste, a ausência de resposta para a CS de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* está associada à presença do haplótipo HLADRB1*01HLA~DQB1*05.

❖ A presença dos polimorfismos no gene da enzima óxido nítrico sintase induzida e da citocina interferon gama não influenciam nos níveis plasmáticos, na susceptibilidade à malária e nem na prevalência de anticorpos contra as proteínas CS, AMA-1 e MSP-1₁₉ de *P. vivax*.

❖ Para o polimorfismo no gene da citocina interleucina-10, a presença do alelo C dos SNPs IL10A-592A/C e -819T/C está associada com baixos níveis de IL-10 e de parasitemia, e com aumento de resposta de IgG para a CS da variante *P. vivax-like*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):165–84.
2. Garcia LS. Malaria. Clinics in Laboratory Medicine. 2010. p. 93–129.
3. World Health Organization. World Malaria Report 2017 [Internet]. World Health Organization. 2017. 196 p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>
4. Poinar G. *Plasmodium dominicana* n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. Syst Parasitol. 2005;61(1):47–52.
5. Camargo EP. Malária , maleita , paludismo. Ciência e Cult - Soc Bras para o Prog da Ciência. 2003;vol.55(2317-6660):26–9.
6. Cunha CB, Cunha BA. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: From hippocrates to Osler. Journal of Vector Borne Diseases. 2008. p. 194–9.
7. Santamaria L. Camillo Golgi as clinical pathologist: epicritical reading of Golgi's works on malaria. Med Secoli. 1994;6:581–608.
8. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasit Vectors. 2010;3(1):5.
9. Gachelin G, Garner P, Ferroni E, Verhave JP, Opinel A. Evidence and strategies for malaria prevention and control: A historical analysis. Malar J. BioMed Central; 2018;17(1):1–18.
10. Wagner-Jauregg J. The history of the malaria treatment of general paralysis. 1946. Am J Psychiatry. 1994;151(6 Suppl):231–5.
11. Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. Nature Medicine. 2011. p. 1217–20.
12. Gunalan K, Niangaly A, Thera MA, Doumbo OK, Miller LH. *Plasmodium vivax* Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? Trends in Parasitology. 2018;
13. Pan American Health Organization. Actualización Epidemiológica. Aumento de malaria en las Américas. 2018;5.
14. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil PP, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CCT. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010;9:115.
15. Portela G. Agência Fiocruz de Notícias [Internet]. 2018 [cited 2018 Jun 16].

Available from: <https://agencia.fiocruz.br/vigilancia-da-malaria-nas-fronteiras-e-tema-da-serie-clima-e-saude>

16. DATASUS - SIVEP-MALARIA 2017.
17. Brasil P, De Pina Costa A, Pedro RS, Da Silveira Bressan C, Da Silva S, Tauil PL, et al. Unexpectedly long incubation period of *Plasmodium vivax* malaria, in the absence of chemoprophylaxis, in patients diagnosed outside the transmission area in Brazil. *Malar J. BioMed Central Ltd*; 2011;10(1):122.
18. Lorenz C, Virginio F, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malar J. BioMed Central*; 2015;14(1):1–13.
19. de Pina-Costa A, Brasil P, di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e. S, et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):618–33.
20. Lourenço-de-Oliveira R, Guimarães AE, Arlé M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, et al. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondônia State, Amazon region of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1989. p. 501–14.
21. Lorenz C, Virginio F, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malar J*. 2015 Dec 15;14(1):408.
22. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver. *Cell Host Microbe*. 2008;3(2):88–96.
23. Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: The *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology*. 2006. p. 849–56.
24. Yamauchi Lucy M. LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*. 2007;9(5):1215–22.
25. Sibley LD. Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science*. 2004. p. 248–53.
26. Carrolo M, Giordano S, Cabrita-Santos L, Corso S, Vigário AM, Silva S, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med*. 2003;9(11):1363–9.
27. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002. p. 673–9.
28. Dembélé L, Franetich JF, Lorthois A, Gego A, Zeeman AM, Kocken CHM, et

- al. Persistence and activation of malaria hypnozoites in long-term primary hepatocyte cultures. *Nat Med.* 2014;20(3):307–12.
29. Sturm A, Amino R, Van De Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* (80-). 2006;313(5791):1287–90.
 30. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006;124(4):755–66.
 31. Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: Who cares? *Malaria Journal.* 2008.
 32. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc.; 2011;9(1):9–20.
 33. Tuteja R, Pradhan A, Sharma S. *Plasmodium falciparum* signal peptidase is regulated by phosphorylation and required for intra-erythrocytic growth. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;157(2):137–47.
 34. Meibalan E, Marti M. Biology of malaria transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3).
 35. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):13–36.
 36. Ayieko C, Ogola BS, Ochola L, Ngwená GAM, Ayodo G, Hodges JS, et al. Interferon- γ responses to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens decrease in the absence of malaria transmission. *PeerJ.* PeerJ, Inc; 2017;5:e2855.
 37. Almeida APMM, Dias MO, Vieira C de AF, Chávez-Olórtegui C, Gazzineli RT, Rodrigues MM, et al. Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine.* 2014 Apr 17;32(19):2181–7.
 38. Schwenk RJ, Richie TL. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends in Parasitology.* 2011. p. 306–14.
 39. Malu DT, Belanger B, Desautels F, Kelendji K, Dalko E, Sanchez-Dardon J, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Downregulator of Early T Cell-Dependent IFN- Responses in *Plasmodium chabaudi adami* (556 KA)-Infected Mice. *J Immunol.* 2011;186(11):6271–9.
 40. Belnoue E, Potter SM, Rosa DS, Mauduit M, Grüner AC, Kayibanda M, et al.

- Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN- γ during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 2008;30(10):544–53.
41. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. DEVELOPMENT AND REGULATION OF CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES TO THE BLOOD STAGES OF MALARIA: Implications for Vaccine Research. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):69–99.
 42. López C, Yepes-Pérez Y, Hincapié-Escobar N, Díaz-Arévalo D, Patarroyo MA. What is known about the immune response induced by *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates? *Front Immunol.* 2017;8(FEB).
 43. Goldberg DE, Cowman AF. Moving in and renovating: Exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes. *Nature Reviews Microbiology.* 2010. p. 617–21.
 44. Porto LC de MS, Pontes LF de S. Estudos de associação HLA x doenças: extratos do II Simpósio Brasileiro. EdUERJ; 2009. 243 p.
 45. MCGREGOR IA. THE PASSIVE TRANSFER OF HUMAN MALARIAL IMMUNITY. *Am J Trop Med Hyg.* 1964 Jan;13:SUPPL 237–9.
 46. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(3):297–308.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Lazarou M, Guevara Patiño JA, Jennings RM, McIntosh RS, Shi J, Howell S, et al. Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. *Infect Immun.* 2009 Dec 1;77(12):5659–67.
 50. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet.* 2002;360(9333):610–7.

51. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: Immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003. p. 145–52.
52. Overstreet MG, Cockburn IA, Chen Y-C, Zavala F. Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an “unnatural” immune response. *Immunol Rev*. 2008 Oct;225(1):272–83.
53. Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Collins WE, Harinasuta KT, Tapchaisri P, et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *J Exp Med*. 1982;156(1):20–30.
54. Jones TR, Hoffman SL. Malaria vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Jul;7(3):303–10.
55. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Valencia AZ, Cifuentes C, Hurtado S, et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol*. 2004 Dec;34(13-14):1535–46.
56. Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antisporozoite vaccine for malaria: experimental basis and current status. *Rev Infect Dis*. 1989;11 Suppl 3:S579–85.
57. Aragam NR, Thayer KM, Nge N, Hoffman I, Martinson F, Kamwendo D, et al. Diversity of T Cell Epitopes in *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Likely Due to Protein-Protein Interactions. Kumar N, editor. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62427.
58. Kaba SA, McCoy ME, Doll TAPF, Brando C, Guo Q, Dasgupta D, et al. Protective Antibody and CD8+ T-Cell Responses to the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Induced by a Nanoparticle Vaccine. Kumar N, editor. *PLoS One*. 2012 Oct 29;7(10):e48304.
59. Anot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science*. 1985 Nov 15;230(4727):815–8.
60. Rosenberg R, Wirtz R a, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters a P, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science (80-)*. 1989;245(4921):973–6.
61. Qari SH, Shi VP, Povoas MM, Alpers MP, Deloron P, Murphy GS, et al. Global

- Occurrence of *Plasmodium vivax-like* Human Malaria Parasite. J Infect Dis. 1993;168(6):1485–9.
62. Doud MB, Koksai AC, Mi L-Z, Song G, Lu C, Springer TA. Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences; 2012 May 15;109(20):7817–22.
 63. Yadava A, Sattabongkot J, Washington MA, Ware LA, Majam V, Zheng H, et al. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. Infect Immun. 2007;75(3):1177–85.
 64. Vanloubbeeck Y, Pichyangkul S, Bayat B, Yongvanitchit K, Bennett JW, Sattabongkot J, et al. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. Vaccine. 2013;31(52):6216–24.
 65. Bennett JW, Yadava A, Tosh D, Sattabongkot J, Komisar J, Ware LA, et al. Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. Sinnis P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Feb 26;10(2):e0004423.
 66. Arévalo-Herrera M, Vásquez-Jiménez JM, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Amado-Garavito AB, Céspedes N, et al. Protective Efficacy of *Plasmodium vivax* Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. Diemert DJ, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 19;10(10):e0005070.
 67. Salas ML, Romero JF, Solarte Y, Olano V, Herrera MA, Herrera S. Development of sporogonic cycle of *Plasmodium vivax* in experimentally infected *Anopheles albimanus* mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89 Suppl 2:115–9.
 68. Webster HK, Gingrich JB, Wongsrichanalai C, Tulyayon S, Suvarnamani A, Sookto P, et al. Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. Am J Trop Med Hyg. 1992;47(4):489–97.
 69. Bwire R, Slotman EJH, Verhave JP, Bruins J, Docters Van Leeuwen WM. Malaria anticircumsporozoite antibodies in Dutch soldiers returning from sub-Saharan Africa. Trop Med Int Heal. 1998;3(1):66–9.
 70. Kusi KA, Bosomprah S, Doodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, Mensah D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. Malar J. 2014;13(1):1–10.

71. Kusi KA, Bosomprah S, Kyei-Baafour E, Dickson EK, Tornyigah B, Angov E, et al. Seroprevalence of antibodies against plasmodium falciparum sporozoite antigens as predictive disease transmission markers in an area of Ghana with seasonal malaria transmission. PLoS One. 2016;11(11):1–16.
72. Machado RLD, Póvoa MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax-like*) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(4):377–81.
73. Cochrane AH, Nardin EH, Dearruda M, Maracic M, Clavuo P, Collins WE, et al. WIDESPREAD REACTIVITY OF HUMAN SERA WITH A VARIANT REPEAT OF THE CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN OF *PLASMODIUM VIVAX*. Am J Trop Med Hyg. 1990;43(451):446–90.
74. Franke ED, Lucas CM, San Roman E, Wirtz RA. Prevalence of antibody to the variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Peru. Am J Trop Med Hyg. 1992 Jun;46(6):708–10.
75. Wirtz RA, Rosenberg R, Sattabongkot J, Webster HK. Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand. Lancet (London, England). 1990 Sep 8;336(8715):593–5.
76. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;
77. Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Daniel Ribeiro CT, Carla Golberg A, et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax-like*) in individuals naturally exposed to malaria. Acta Trop. 2004;92(1):63–9.
78. Storti-Melo LM, de Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Joazeiro ACP, Fontes CJ, Bonini-Domingos CR, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009 Jul;103(7):672–8.
79. da Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RN, Machado RLD, Póvoa MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 Aug;101(5):547–50.
80. Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballou WP, Webster HK. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993;49(4):478–

- 84.
81. Sidjanski S, Mathews G V, Vanderberg JP. Electrophoretic separation and identification of phenoloxidases in hemolymph and midgut of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol.* 1997 Aug;83(4):686–91.
 82. Cerami C, Kwakye-Berko F, Nussenzweig V. Binding of malarial circumsporozoite protein to sulfatides [Gal(3-SO₄)beta 1-Cer] and cholesterol-3-sulfate and its dependence on disulfide bond formation between cysteines in region II. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Aug;54(1):1–12.
 83. Ménard R, Sultan AA, Cortes C, Altszuler R, van Dijk MR, Janse CJ, et al. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature.* 1997 Jan 23;385(6614):336–40.
 84. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med.* 2011;
 85. Ancsin JB, Kisilevsky R. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: Significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *J Biol Chem.* 2004;
 86. Rathore D, Nagarkatti R, Jani D, Chattopadhyay R, La Vega P De, Kumar S, et al. 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;280(21):20524–9.
 87. Bongfen SE, Laroque A, Berghout J, Gros P. Genetic and genomic analyses of host-pathogen interactions in malaria. *Trends in Parasitology.* 2009. p. 417–22.
 88. McCutchan TF, de la Cruz VF, Good MF, Wellems TE. Antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Prog Allergy.* 1988;41:173–92.
 89. Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8124–9.
 90. Ju H-L, Kang J-M, Moon S-U, Kim J-Y, Lee H-W, Lin K, et al. Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates. *Malar J.* 2012;11:60.
 91. Ribeiro B de P, Cassiano GC, de Souza RM, Cysne DN, Grisotto MAG, de Azevedo dos Santos APS, et al. Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine

- Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3).
92. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Genética de populações. Introdução à genética. 2002;667–92.
 93. Kwiatkowski DP. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. Am J Hum Genet. 2005;77(2):171–92.
 94. Lederberg J. J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. Genetics. 1999. p. 1–3.
 95. Min-Oo G, Gros P. Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. Cellular Microbiology. 2005. p. 753–63.
 96. Williams TN. Human red blood cell polymorphisms and malaria. Current Opinion in Microbiology. 2006. p. 388–94.
 97. Machado P, Mendes C, Rosário VE do, Arez AP. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. Rev Pan-Amazônica Saúde. 2010;1(4):85–96.
 98. Goel S, Palmkvist M, Moll K, Joannin N, Lara P, R Akhouri R, et al. RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. Nat Med. 2015;21(4):314–21.
 99. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The major histocompatibility complex and its functions. 5th ed. New York: Garland Science; 2001.
 100. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. Einstein (São Paulo). 2015;13(1):153–6.
 101. Todd JR, West BC, McDonald JC. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. Rev Infect Dis. 1990;12(1):63–74.
 102. Petzl-Erler ML, Belich MP, Queiroz-Telles F. Association of Mucosal Leishmaniasis with HLA. Hum Immunol. 1991;32(4):254–60.
 103. Duarte R, Carvalho C, Pereira C, Bettencourt A, Carvalho A, Villar M, et al. HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance. Rev Port Pneumol. 2011;17(1):15–9.
 104. Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature. 1991 Aug 15;352(6336):595–600.
 105. Jepson a, Sisay-Joof F, Banya W, Hassan-King M, Frodsham a, Bennett S, et

- al. Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of affected sibling pairs. *BMJ*. 1997;315(7100):96–7.
106. Riley EM, Olerup O, Bennett S, Rowe P, Allen SJ, Blackman MJ, et al. MHC and malaria: the relationship between HLA class II alleles and immune responses to *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol*. 1992;4(9):1055–63.
107. Shankarkumar U, Devaraj JP, Ghosh K, Karnad D, Anand K, Mohanty D. HLA associations in *P. falciparum* malaria patients from Mumbai, western India. *Indian J Malariol*. 2002;39(3-4):76–82.
108. Osafo-Addo AD, Koram KA, Oduro AR, Wilson M, Hodgson A, Rogers WO. HLA-DRB1*04 allele is associated with severe malaria in Northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(2):251–5.
109. Johnson A, Leke R, Harun L, Ginsberg C, Ngogang J, Stowers A, et al. Interaction of HLA and age on levels of antibody to *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated proteins 1 and 2. *Infect Immun*. 2000;68(4):2231–6.
110. Martinez P, Lopez C, Saravia C, Vanegas M, Patarroyo MA. Evaluation of the antigenicity of universal epitopes from PvDBPII in individuals exposed to *Plasmodium vivax* malaria. *Microbes Infect*. 2010 Dec;12(14-15):1188–97.
111. Storti-Melo LM, da Costa DR, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Couto VSCDA, Póvoa MM, et al. Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. *Acta Trop*. Elsevier B.V.; 2012;121(2):152–5.
112. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Jiang J, Singh B, Fabrício-Silva GM, et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS One*. 2012;7(5):1–10.
113. Ferreira AR, Singh B, Cabrera-Mora M, Magri De Souza AC, Queiroz Marques MT, Sobrino Porto LC, et al. Evaluation of naturally acquired IgG antibodies to a chimeric and non-chimeric recombinant species of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-1: Lack of association with HLA-DRB1*/DQB1* in malaria exposed individuals from the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014;9(8):1–13.
114. Aidoo M, Lalvani A, Gilbert SC, Hu JT, Daubersies P, Hurt N, et al. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infect Immun*. 2000 Jan;68(1):227–32.
115. Migot-Nabias F, Luty AJF, Minh TN, Fajardy I, Tamouza R, Marzais F, et al.

- HLA alleles in relation to specific immunity to Liver Stage Antigen-1 from *Plasmodium falciparum* in Gabon. *Genes Immun.* 2001;2(1):4–10.
116. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Castro ZR, Nussenzweig RS, Schmeckpeper B, et al. Synthetic Malaria Peptide Vaccine Elicits High Levels of Antibodies in Vaccinees of Defined HLA Genotypes. *J Infect Dis.* 2000;182(5):1486–96.
 117. Kwiatkowski D, Bate C. Inhibition of tumour necrosis factor (TNF) production by antimalarial drugs used in cerebral malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89(2):215–6.
 118. Gentile DA, Doyle WJ, Zeevi A, Piltcher O, Skoner DP. Cytokine gene polymorphisms moderate responses to respiratory syncytial virus in adults. *Hum Immunol.* 2003;64(1):93–8.
 119. Henao MI, Montes C, París SC, García LF. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis.* 2006;86(1):11–9.
 120. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):177–86.
 121. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 2010 Jan 13;9(1):13.
 122. Trent JM, Olson S, Lawn RM. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(24):7809–13.
 123. Wen A, Qu X-H, Zhang K-N, Leng E-L, Ren Y, Wu X-M. Evaluation of interferon-gamma release assays in extrasanguinous body fluids for diagnosing tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Life Sci.* 2018 Mar 15;197:140–6.
 124. Li X, Li T, Liu Y, Zhang L, Bai S, Yan M, et al. Association of IFNG gene polymorphisms with susceptibility to preeclampsia among pregnant woman from Shaanxi. 2017 Oct 10;34(5):726–30.
 125. Krachmarova E, Tileva M, Lilkova E, Petkov P, Maskos K, Ilieva N, et al. His-FLAG tag as a fusion partner of glycosylated human interferon-gamma and its mutant: Gain or loss? *Biomed Res Int. Hindawi;* 2017;2017.
 126. Moen GH, Moen A, Schistad EI, Gjerstad J. Local up-regulation of interferon- γ (IFN- γ) following disc herniation is involved in the inflammatory response underlying acute lumbar radicular pain. *Cytokine.* 2017;97:181–6.

127. Shi Q, Cai C, Xu J, Liu J, Liu H, Huo N. Is there an association between IFN- γ +874A/T polymorphism and periodontitis susceptibility?: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun;96(25):e7288.
128. Bream JH, Carrington M, O'Toole S, Dean M, Gerrard B, Shin HD, et al. Polymorphisms of the human IFNG gene noncoding regions. *Immunogenetics*. 2000;51(1):50–8.
129. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson I V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum Immunol*. 2000 Sep;61(9):863–6.
130. Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG. Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet*. 2003;361(9372):1871–2.
131. Koo GC, Gan YH. The innate interferon gamma response of BALB/c and C57BL/6 mice to in vitro *Burkholderia pseudomallei* infection. *BMC Immunol*. 2006;7.
132. Cheong JY, Cho SW, Chung SG, Lee J a, Yeo M, Wang HJ, et al. Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. *Biochem Genet*. 2006;44(5-6):246–55.
133. Ribeiro F, Lopes RP, Nunes CP, Maito F, Bonorino C, Bauer ME. Dehydroepiandrosterone sulphate enhances IgG and Interferon-gamma production during immunization to tuberculosis in young but not aged mice. *Biogerontology*. 2007 Apr 19;8(2):209–20.
134. Gangwar R, Pandey S, Mittal RD. Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population. *BJOG*. 2009;116(12):1671–7.
135. Albuquerque MC de, Aleixo ALQ do C, Benchimol EI, Leandro ACCS, das Neves LB, Vicente RT, et al. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 May;104(3):451–5.
136. Bendicho MT, Guedes JC, Silva NN, Santana GO, dos Santos RR, Lyra AC, et al. Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2005 May;30(4):333–6.

137. Matos GI, Fernandes Covas C de J, de Cássia Bittar R, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, et al. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN- γ production. *BMC Infect Dis.* 2007;7.
138. Moran LB, Duke DC, Graeber MB. The microglial gene regulatory network activated by interferon-gamma. *J Neuroimmunol.* 2007;183(1-2):1–6.
139. Pereira WF, Guillermo LVC, Ribeiro-Gomes FL, Lopes MF. Inhibition of caspase-8 activity reduces IFN-gamma expression by T cells from *Leishmania major* infection. *An Acad Bras Cienc.* 2008 Mar;80(1):129–36.
140. Medina TS, Costa SPT, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J.* 2011 Sep 14;10(1):264.
141. Furini AAC, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Cunha MG, Cassiano GC, Machado RLD. Cytokine gene polymorphisms are not associated with anti-PvDBP, anti-PvAMA-1 or anti-PvMSP-119 IgG antibody levels in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J. BioMed Central;* 2016;15(1):374.
142. Kock O, Rockett K, Jallow M, Pinder M, Sisay-Joof F, Kwiatkowski D. Investigation of malaria susceptibility determinants in the IFNG/IL26/IL22 genomic region. *Genes Immun.* 2005;6(4):312–8.
143. Upperman JS, Pillage G, Siddiqi MQ, Zeevi A, Kelly N, Ford HR, et al. Dominance of high-producing interleukin 6 and low-producing interleukin 10 and interferon γ alleles in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient trauma patients. *Shock.* 2005;23(3):197–201.
144. MacMurray J, Comings DE, Napolioni V. The gene-immune-behavioral pathway: Gamma-interferon (IFN- γ) simultaneously coordinates susceptibility to infectious disease and harm avoidance behaviors. *Brain Behav Immun.* 2014 Jan;35:169–75.
145. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991 Nov 1;174(5):1209–20.
146. Bouaziz J-D, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev.* 2008 Aug;224(1):201–14.
147. Hummelshoj L, Ryder LP, Poulsen LK. The role of the interleukin-10 subfamily

- members in immunoglobulin production by human B cells. *Scand J Immunol.* 2006;64(1):40–7.
148. Kurtis JD, Lanar DE, Opollo M, Duffy PE. Interleukin-10 responses to liver-stage antigen 1 predict human resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 1999;67(7):3424–9.
 149. Niikura M, Inoue SI, Kobayashi F. Role of interleukin-10 in malaria: Focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011.
 150. Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Ragione F Della, et al. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-?? genes. *Clin Chem.* 2003;49(10):1664–7.
 151. Kingo K, Rätsep R, Kõks S, Karelson M, Silm H, Vasar E. Influence of genetic polymorphisms on interleukin-10 mRNA expression and psoriasis susceptibility [1]. *Journal of Dermatological Science.* 2005. p. 111–3.
 152. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut.* 2000 Apr;46(4):540–5.
 153. Ouma C, Davenport GC, Were T, Otieno MF, Hittner JB, Vulule JM, et al. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. *Hum Genet.* 2008 Dec 30;124(5):515–24.
 154. Lokossou AG, Dechavanne C, Bouraïma A, Courtin D, Le Port A, Ladékpo R, et al. Association of IL-4 and IL-10 maternal haplotypes with immune responses to *P. falciparum* in mothers and newborns. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1).
 155. Carpenter D, Rooth I, Färnert A, Abushama H, Quinnell RJ, Shaw MA. Genetics of susceptibility to malaria related phenotypes. *Infect Genet Evol.* 2009;
 156. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine.* 1994. p. 227–37.
 157. Feldman PL, Griffith OW, Hong H, Stuehr DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J Med Chem.* 1993 Feb 19;36(4):491–6.
 158. Qidwai T, Jamal F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2010;72(5):375–87.

159. Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, Van Der Heyde HC. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol.* 2005;21(9):415–22.
160. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin. *JAMA.* 2005 Apr 6;293(13):1653.
161. Collins JL, Vodovotz Y, Hierholzer C, Villavicencio RT, Liu S, Alber S, et al. Characterization of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat and human liver during hemorrhagic shock. *Shock.* 2003 Feb;19(2):117–22.
162. Sarnelli G, Grosso M, Palumbo I, Pesce M, D'Alessandro A, Zaninotto G, et al. Allele-specific transcriptional activity of the variable number of tandem repeats of the inducible nitric oxide synthase gene is associated with idiopathic achalasia. *United Eur Gastroenterol J.* 2017 Mar 8;5(2):200–7.
163. Chang Y-C, Wu W-M, Huang Y-H, Chung W-H, Tsai H-Y, Hsu L-A. The (CCTTT) n pentanucleotide repeat polymorphism in the inducible nitric oxide synthase gene promoter and the risk of psoriasis in Taiwanese. *Arch Dermatol Res.* 2015 Jul 8;307(5):425–32.
164. Varadé J, Lamas JR, Fernández-Arquero M, Jover JA, de la Concha EG, Martínez A, et al. NO role of NOS2A susceptibility polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Nitric oxide Biol Chem.* 2009 Dec;21(3-4):171–4.
165. HERSBERGER M, BONHOEFFER S, RAMPINI SK, OPRAVIL M, MARTI-JAUN J, TELENTI A, et al. CCTTT-repeat polymorphism of the inducible nitric oxide synthase is not associated with HIV pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2004 Sep;137(3):566–9.
166. Warpeha KM, Xu W, Liu L, Charles IG, Patterson CC, Ah-Fat F, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J.* 1999 Oct;13(13):1825–32.
167. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K. Significant Association of Longer Forms of CCTTT Microsatellite Repeat in the Inducible Nitric Oxide Synthase Promoter with Severe Malaria in Thailand. *J Infect Dis.* 2002 Aug 15;186(4):578–81.
168. Cramer JP, Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Burkhardt J, Otchwemah RN, Dietz E, et al. iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children. *Trop Med Int Heal.* 2004;9(10):1074–80.
169. Kun JF, Mordmüller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, et al. Nitric Oxide Synthase 2^{Lambaréné} (G-954C), Increased Nitric Oxide

- Production, and Protection against Malaria. *J Infect Dis.* 2001 Aug 1;184(3):330–6.
170. Planche T, Macallan DC, Sobande T, Borrmann S, Kun JFJ, Krishna S, et al. Nitric oxide generation in children with malaria and the NOS2G-954C promoter polymorphism. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(5):R1248–53.
 171. Burgner D, Usen S, Rockett K, Jallow M, Ackerman H, Cervino A, et al. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Hum Genet.* 2003 Apr;112(4):379–86.
 172. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. 2006;22(15):1928–9.
 173. Pereira VA, Sánchez-Arcila JC, Teva A, Perce-Da-silva DS, Vasconcelos MPA, Lima CAM, et al. IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2015;14(1):1–12.
 174. Cook J, Reid H, Iavro J, Kuwahata M, Taleo G, Clements A, et al. Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malar J.* 2010 Jun 16;9(1):169.
 175. Sylla K, Clément R, Tine K, Ndiaye M, Sow D, Sarr A, et al. Sero-epidemiological evaluation of *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Malar J.* 2015;14.
 176. Noor AM, Mohamed MB, Mugenyi CK, Osman MA, Guessod HH, Kabaria CW, et al. Establishing the extent of malaria transmission and challenges facing pre-elimination in the Republic of Djibouti. *BMC Infect Dis.* 2011;11:121.
 177. Bousema T, Drakeley C, Gesase S, Hashim R, Magesa S, Mosha F, et al. Identification of Hot Spots of Malaria Transmission for Targeted Malaria Control. *J Infect Dis.* 2010 Jun 1;201(11):1764–74.
 178. Migot F, Chougnet C, Raharimalala L, Astagneau P, Lepers JP, Deloron P. Human immune responses to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) after a decrease in malaria transmission in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):432–9.
 179. Diop F, Richard V, Diouf B, Sokhna C, Diagne N, Trape J-F, et al. Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal. *Malar J.* 2014 Mar 6;13(1):83.
 180. Ceesay SJ, Casals-Pascual C, Nwakanma DC, Walther M, Gomez-Escobar N,

- Fulford AJC, et al. Continued Decline of Malaria in The Gambia with Implications for Elimination. Snounou G, editor. PLoS One. 2010 Aug 18;5(8):e12242.
181. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SLR, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(14):5108–13.
 182. Burattini MN, Massad E, Coutinho FA. Malaria transmission rates estimated from serological data. Epidemiol Infect. Cambridge University Press; 1993 Dec;111(3):503–23.
 183. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Vinícius M, Lacerda G, Drakeley CJ, et al. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. Malar J. 2017;16(16).
 184. Kerkhof K, Sluydts V, Heng S, Kim S, Pareyn M, Willen L, et al. Geographical patterns of malaria transmission based on serological markers for *falciparum* and *vivax* malaria in Ratanakiri, Cambodia. Malar J. 2016;15(15).
 185. Proietti C, Verra F, Bretscher MT, Stone W, Kanoi BN, Balikagala B, et al. Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda. Parasite Immunol. Wiley/Blackwell (10.1111); 2013 May;35(5-6):164–73.
 186. Weber GE, White MT, Babakhanyan A, Sumba PO, Vulule J, Ely D, et al. Sero-catalytic and Antibody Acquisition Models to Estimate Differing Malaria Transmission Intensities in Western Kenya. Sci Rep. 2017;7(1).
 187. Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop. 2000;
 188. Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. Malar J. BioMed Central; 2004 Mar 31;3:8.
 189. Chadee DD, Beier JC, Doon R. Re-emergence of *Plasmodium malariae* in Trinidad, West Indies. Ann Trop Med Parasitol. 1999 Jul;93(5):467–75.
 190. Siala E, Khalfaoui M, Bouratbine A, Hamdi S, Hili K, Aoun K. [Relapse of

- Plasmodium malariae* malaria 20 years after living in an endemic area]. Presse Med. 2005 Mar 12;34(5):371–2.
191. Chadee DD, Tilluckdharry CC, Maharaj P, Sinanan C. Reactivation of *Plasmodium malariae* infection in a Trinidadian man after neurosurgery. N Engl J Med. 2000 Jun 22;342(25):1924.
 192. Nahrendorf W, Scholzen A, Sauerwein RW, Langhorne J. Cross-stage immunity for malaria vaccine development. Vaccine. 2015 Dec 22;33(52):7513–7.
 193. Guimarães LO, Bajay MM, Wunderlich G, Bueno MG, Röhe F, Catão-Dias JL, et al. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. Acta Trop. 2012 Oct;124(1):27–32.
 194. Webster HK, Gingrich JB, Wongsrichanalai C, Tulyayon S, Suvarnamani A, Sookto P, et al. Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. Am J Trop Med Hyg. 1992 Oct;47(4):489–97.
 195. Del Giudice G, Engers HD, Tougne C, Biro SS, Weiss N, Verdini AS, et al. Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children. Am J Trop Med Hyg. 1987 Mar;36(2):203–12.
 196. Burkot TR, Graves PM, Wirtz RA, Brabin BJ, Battistutta D, Cattani JA, et al. Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* circumsporozoite proteins in a human population. J Clin Microbiol. 1989 Jun;27(6):1346–51.
 197. Tanner M. The level of anti-sporozoite antibodies in a highly endemic malaria area and its relationship with exposure to mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86(5):499–504.
 198. Ross A, Koepfli C, Schoepflin S, Timinao L, Siba P, Smith T, et al. The Incidence and Differential Seasonal Patterns of *Plasmodium vivax* Primary Infections and Relapses in a Cohort of Children in Papua New Guinea. Sinnis P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 May 4;10(5):e0004582.
 199. Simões LR, Alves ER, Ribatski-Silva D, Gomes LT, Nery AF, Fontes CJF. Factors associated with recurrent *Plasmodium vivax* malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009. Cad Saude Publica. 2014 Jul;30(7):1403–17.
 200. Del Giudice G, Lambert PH, Mendis K, Pessi A, Tanner M. Antibody responses

- to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites in areas with stable and unstable malaria. Bull World Health Organ. World Health Organization; 1990;68 Suppl(Suppl):191–6.
201. Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Habluetzel A, Del Nero L, Lamizana L, et al. In vitro immune recognition of synthetic peptides from the *Plasmodium falciparum* CS protein by individuals naturally exposed to different sporozoite challenge. Immunol Lett. 1992;33(2):187–99.
 202. Tapchaisri P, Asavanich A, Limsuwan S, Tharavanij S, Harinasuta KT. Antibodies against malaria sporozoites in patients with acute uncomplicated malaria and patients with cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg. 1985 Sep;34(5):831–6.
 203. Drakeley C, Schellenberg D, Kihonda J, Sousa CA, Arez AP, Lopes D, et al. An estimation of the entomological inoculation rate for Ifakara: a semi-urban area in a region of intense malaria transmission in Tanzania. Trop Med Int Health. 2003 Sep;8(9):767–74.
 204. Lima-Junior J da C, Pratt-Riccio LR. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. Front Immunol. 2016 Jan 27;7:13.
 205. Home | REDOME – Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea – Site Oficial [Internet]. [cited 2018 Jun 1]. Available from: <http://redome.inca.gov.br/>
 206. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Jiang J, Singh B, Fabrício-Silva GM, et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. PLoS One. Public Library of Science; 2012;7(5):e36419.
 207. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott M, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 1. Genes Immun. 2001 Apr 18;2(2):61–70.
 208. Cooke GS, Campbell SJ, Sillah J, Gustafson P, Bah B, Sirugo G, et al. Polymorphism within the Interferon- γ /Receptor Complex Is Associated with Pulmonary Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2006 Aug 1;174(3):339–43.
 209. Longhi RMP, Zembrzuski VM, Basta PC, Croda J. Genetic polymorphism and immune response to tuberculosis in indigenous populations: a brief review. Brazilian J Infect Dis. 2013 May;17(3):363–8.

210. Powrózek T, Mlak R, Brzozowska A, Mazurek M, Gołębiowski P, Małecka-Massalska T. Relationship between TNF- α -1031T/C gene polymorphism, plasma level of TNF- α , and risk of cachexia in head and neck cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 May 25
211. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet*. 2008 Jun 15;123(5):477–84.
212. Vallinoto ACR, Graça ES, Araújo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LFA, et al. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol*. 2010;71(7):692–6.
213. Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, et al. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol*. 2010 Jul;10(5):682–5.
214. Mangano VD, Clark TG, Auburn S, Campino S, Diakite M, Fry AE, et al. Lack of association of interferon regulatory factor 1 with severe malaria in affected child-parental trio studies across three African populations. *PLoS One*. Public Library of Science; 2009;4(1):e4206.
215. Furini AA da C, Cassiano GC, Petrolini Capobianco M, Dos Santos SEB, Dantas Machado RL. Frequency of TNFA, INFG, and IL10 Gene Polymorphisms and Their Association with Malaria Vivax and Genomic Ancestry. *Mediators Inflamm*. Hindawi Limited; 2016;2016:5168363.
216. Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Björkman A. Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. *Parasite Immunol*. 2004 Mar;26(3):111–7.
217. Carpenter D, Abushama H, Bereczky S, Färnert A, Rooth I, Troye-Blomberg M, et al. Immunogenetic Control of Antibody Responsiveness in a Malaria Endemic Area. *Hum Immunol*. Elsevier; 2007 Mar 1;68(3):165–9.
218. Zhang G, Manaca MN, McNamara-Smith M, Mayor A, Nhabomba A, Berthoud TK, et al. Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infect Immun*. American Society for Microbiology (ASM); 2012 Jul;80(7):2316–22.
219. Abhimanyu, Mangangcha IR, Jha P, Arora K, Mukerji M, Banavaliker JN, et al. Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. *Infect*

- Genet Evol. Elsevier; 2011 Jul 1;11(5):1015–22.
220. Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MDO, Souza JM, Ribeiro-Dos-Santos ÂK, Santos NP, et al. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. Malar J. 2012;11.
 221. Messias-Reason IJT, van Tong H, Velavan TP. Analysis of polymorphic sites in the promoter of the nitric oxide synthase 2 gene in Brazilian patients with leprosy. Int J Immunogenet. 2014 Jun;41(3):231–5.
 222. Clark IA, Rockett KA, Burgner D. Genes, nitric oxide and malaria in African children. Trends Parasitol. Elsevier; 2003 Aug 1;19(8):335–7.
 223. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, Scopel KKG, Braga ÉM, Bastos MDS, Wunderlich G, et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1 19 and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(8).
 224. de Arruda ME, Aragaki C, Gagliardi F, Haile RW. A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. Ann Trop Med Parasitol. 1996 Apr;90(2):135–43.
 225. Souza-Neiras WC, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VSCA, Couto ÁARA, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: A limited variation or new subspecies with major biological consequences? Malar J. 2010;9(1):1–8.
 226. Sánchez-Arcila JC, de França MM, Pereira VA, Vasconcelos MPA, Têva A, Perce-da-Silva D de S, et al. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-119 and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. Malar J. 2015 Dec 6;14(1):442.
 227. Cunha MG, Silva ES, Sepúlveda N, Costa SPT, Saboia TC, Guerreiro JF, et al. Serologically Defined Variations in Malaria Endemicity in Pará State, Brazil. Braga ÉM, editor. PLoS One. 2014 Nov 24;9(11):e113357.
 228. Pitabut N, Panichakorn J, Mahakunkijcharoen Y, Hirunpetcharat C, Looareesuwan S, Khusmith S. IgG antibody profile to C-terminal region of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in Thai individuals exposed to malaria. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007;38(1):1–7.
 229. Kurtovic L, Behet MC, Feng G, Reiling L, Chelimo K, Dent AE, et al. Human antibodies activate complement against *Plasmodium falciparum* sporozoites, and are associated with protection against malaria in children. BMC Med.

- BioMed Central; 2018 Apr 30;16(1):61.
230. Rouhani M, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. Comparative analysis of the profiles of IgG subclass-specific responses to *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1 in naturally exposed individuals living in malaria hypoendemic settings, Iran. *Malar J. BioMed Central*; 2015 Feb 5;14(1):58.
 231. Campo JJ, Whitman TJ, Freilich D, Burgess TH, Martin GJ, Doolan DL. Toward a Surrogate Marker of Malaria Exposure: Modeling Longitudinal Antibody Measurements under Outbreak Conditions. Sinnis P, editor. *PLoS One*. 2011 Jul 27;6(7):e21826.
 232. Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop*. 1999;72(1):13–24.
 233. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtabe D, et al. The plasmodium falciparum-specific human memory b cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. Langhorne J, editor. *PLoS Pathog*. 2010 May 20;6(5):1–13.
 234. Elias SC, Choudhary P, de Cassan SC, Biswas S, Collins KA, Halstead FD, et al. Analysis of human B-cell responses following ChAd63-MVA MSP1 and AMA1 immunization and controlled malaria infection. *Immunology*. 2014 Apr;141(4):628–44.
 235. Bouillet LÉM, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, et al. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. *Infect Immun. American Society for Microbiology (ASM)*; 2011 Sep;79(9):3642–52.
 236. Nahrendorf W, Scholzen A, Bijker EM, Teirlinck AC, Bastiaens GJH, Schats R, et al. Memory B-cell and antibody responses induced by *Plasmodium falciparum* sporozoite immunization. *J Infect Dis*. 2014;210(12):1981–90.
 237. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Díaz E, Dunachie S, Kumpitak C, Nguitragool W, et al. Acquisition and Longevity of Antibodies to *Plasmodium vivax* Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(2):117–24.
 238. Braga EM, Fontes CJ, Krettli AU. Persistence of humoral response against

- sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. J Infect Dis. 1998 Apr;177(4):1132–5.
239. Cochrane a H, Nardin EH, De Arruda M, Maracic M, Clavijo P, Collins WE, et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 1990;43(5):446–51.
240. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):367–72.
241. Arévalo-Herrera M, Roggero MA, Gonzalez JM, Vergara J, Corradin G, López JA, et al. Mapping and comparison of the B-cell epitopes recognized on the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein by immune Colombians and immunized Aotus monkeys. Ann Trop Med Parasitol. Taylor & Francis; 1998 Jul 15;92(5):539–51.
242. Furini AAC, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Cunha MG, Cassiano GC, Machado RLD. Cytokine gene polymorphisms are not associated with anti-PvDBP, anti-PvAMA-1 or anti-PvMSP-119 IgG antibody levels in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. Malar J. BioMed Central; 2016;15(1):374.
243. Grant A, Araujo M, Ponte E, Oliveira R, Cruz A, Barnes K, et al. Polymorphisms in IL10 are associated with total Immunoglobulin E levels and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian population. Genes Immun. 2010;12(10):46–50.
244. Dewasurendra RL, Suriyaphol P, Fernando SD, Carter R, Rockett K, Corran P, et al. Genetic polymorphisms associated with anti-malarial antibody levels in a low and unstable malaria transmission area in southern Sri Lanka. Malar J. BioMed Central; 2012 Aug 20;11:281.

ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA



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

Rio de Janeiro, 26 de março de 2009.

Carta: 024/09

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Joseli de Oliveira Ferreira e
- Dr. Christian M. Gabriel Niel

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **492/08** intitulado "**Malária, leishmaniose tegumentar e tuberculose: aspectos clínico-epidemiológico, parasitológico, bioquímico e imunológicos e avaliação das co-infecções em área com população de assentamento no Estado de Rondônia**" com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente

Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Instituições: Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro; Laboratório Central de Saúde – LACEN, Porto Velho.

Título do Projeto de Pesquisa: Malária, Leishmaniose Tegumentar Americana e Tuberculose: aspectos clínico-epidemiológicos, parasitológicos, bioquímicos e imunológicos e avaliação das co-infecções em área com população de assentamento no Estado de Rondônia.

Coordenadores da Pesquisa: Joseli de Oliveira Ferreira e Dalma Maria Banic (Malária), Antonio Teva e Fatima Conceição Silva (Leishmaniose Tegumentar Americana) e Paulo Zuquim Antas (Tuberculose).

Pesquisadores: Fatima Santos, Cesarino J. Lima Aprigio, Cleoni Mendes de Lima, Rui Rafael Durlacher, Fabio Luis Storer, Fatima Madeira, Fernanda Nazaré Morgado

Telefone para contato: 021-3865-8115; 069-3216-530

Nome _____ **do**
Voluntário: _____

As doenças infecciosas são um grande problema no Brasil. Em Rondônia a mais conhecida é a malária, mas outras doenças como a tuberculose, as leishmanioses e as parasitoses intestinais também tem sido diagnosticadas. Os pesquisadores que estão fazendo o estudo para o qual estou sendo convidado, me informaram que eles gostariam de estudar a presença destas doenças na população da área onde eu moro.

Assim, Eu, _____, declaro que sou voluntário no estudo sobre a presença destas doenças na minha região. Para que eu possa participar como voluntário, terei de fazer vários exames (item C) para ver se eu estou com uma ou mais das doenças que vão ser estudadas (malária, tuberculose, leishmaniose e parasitoses intestinais). Fui informado que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre estas doenças e o que acontece quando mais de uma delas for encontrada na mesma pessoa. Fui também informado que, caso alguma dessas doenças for diagnosticada em mim, eu serei encaminhado a uma unidade de saúde para fazer o tratamento e o acompanhamento do meu caso. A minha participação em nada alterará o atendimento nas

unidades de saúde, caso eu venha a precisar por outros motivos. Uma parte dos resultados deste estudo me beneficiará caso eu esteja com uma dessas doenças, pois terei o diagnóstico feito e poderei ser tratado, mas outra parte não me beneficiará diretamente, pois servirá para estudar estas doenças. No entanto, estes resultados poderão no futuro beneficiar outras pessoas que também tenham a minha doença. Todos os resultados serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos serem divulgados na forma de comunicação e artigos científica. Entretanto não será permitido a minha identificação.

Pelo responsável fui informado de que:

Este documento procura fornecer informações sobre as doenças que serão estudadas e o que será realizado, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e possíveis riscos. Poderei recusar-me a participar da pesquisa ou, mesmo, dela me afastar em qualquer tempo, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. Os investigadores se obrigam a não revelar minha identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como, poderão interromper minha participação, a qualquer tempo, por razões técnico/médicas quando então, me serão fornecidos aconselhamentos e orientação.

A minha participação no projeto consiste em autorizar a realização de exames para avaliar se tenho estas doenças e que esse material seja utilizado neste estudo. Também autorizo 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. É importante saber das seguintes informações:

A- O problema de saúde objeto da investigação:

As doenças que serão procuradas são: 1- malária- doença transmitida por mosquito, muito comum em Rondônia e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais eu fico cansado e sem forças para trabalhar; 2- leishmaniose cutânea- é uma doença da pele que produz uma ferida de tamanho variável de acordo com a reação do organismo do doente. É causada por um micróbio denominado *Leishmania* e também é transmitida por um inseto; 3- tuberculose- é uma doença que é transmitida pela respiração e começa nos pulmões dando febre, tosse e catarro, pode depois se espalhar pelo organismo, mas isto não é comum; 4- parasitoses intestinais- são vermes e pequenos agentes que se instalam no meu intestino e podem ou não causar doença. Existem os grandes vermes como as

lumbrigas e outros, bem pequenos que são chamados de protozoários e que só podem ser vistos no microscópio. Para todas estas doenças existe tratamento, mas ainda não existe forma de prevenir com vacinas.

B- Objetivo do trabalho dos pesquisadores:

O objetivo deste trabalho, além de verificar se eu tenho uma destas doenças, é estudar (identificar) que parasitas estão presentes na minha região, se a presença de mais de um deles na mesma pessoa pode fazer as doenças ficarem diferentes (para melhor ou para pior) e se os pesquisadores podem identificar um tipo de resposta do organismo (imunológica) dos pacientes que seja protetora (benéfica). O conhecimento desta resposta poderá ser importante para se tentar prever a evolução da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves. Além disto, o melhor conhecimento destas doenças pode, no futuro, ajudar o desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.

C- Exames, procedimentos e tratamento 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 duas ocasiões: no dia do diagnóstico antes do tratamento (D0), podendo ser solicitada para uma coleta em outra ocasião para verificação de cura. Se a médica suspeitar que eu tenho Leishmaniose farão um teste na pele (injeção de 0,1 mL em um dos braços), chamado teste de Montenegro (para leishmaniose) para auxiliar no diagnóstico dessa doença. Além disso, se eu tiver alguma ferida no corpo que seja suspeita de leishmaniose, será feita uma biópsia (com anestesia) com retirada de um pedaço (não maior eu 6mm de diâmetro) da ferida, que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasita e fazendo histopatologia, e para o estudo científico. No caso de suspeita de tuberculose eu terei de colher uma amostra de escarro para diagnóstico de tuberculose em pote limpo e levar um pote limpo para casa para colher uma amostra de escarro na manhã do dia seguinte ao despertar. Para verificar se eu tenho alguma verminose vou ter que colher uma amostra de fezes em um pote limpo (chamada amostra fresca) e uma amostra de fezes num pote contendo um líquido vermelho (chamada fezes conservadas). Fui informado que o líquido vermelho (MIF) não é para ser tomado, e sim para colocar as fezes nele dentro do pote (as fezes servem para fazer o diagnóstico das parasitoses intestinais). Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para

confirmar que estou com um dos parasitas que provocam as doenças que vão ser estudadas. Eu posso fazer todos os exames ou apenas alguns, mas como cada um deles serve para doenças diferentes poderei não ser diagnosticado para algumas deles se não fizer todos os exames.

D- Benefícios:

Com a exceção da malária, as outras doenças não são diagnosticadas com facilidade, e isto traz problemas para o controle delas na minha região. Com o diagnóstico poderei ser encaminhado a uma unidade de saúde para cuidar do meu caso. Além disto, alguns trabalhos têm mostrado que se uma pessoa tiver mais de um parasita produzindo doença ao mesmo tempo, algumas vezes as doenças podem ter mais problema para serem curadas pelos remédios. O estudo da resposta imune em pacientes com as doenças do estudo tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores do organismo (imunológicos) na evolução das doenças. No entanto, mais estudos são necessários para tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção. Estes conhecimentos poderão fornecer importantes informações para se prever a evolução destas enfermidades nos indivíduos doentes e, para estabelecer uma futura vacina para uma ou mais delas.

E- Inconvenientes:

A reação positiva ao teste de Montenegro se acompanha de inflamação apenas (restrita) à área de aplicação do teste na pele. Este, no entanto, é o teste padrão para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. A coleta de sangue pode produzir em alguns casos hematoma (rouxidão) local que desaparece em 3 a 5 dias. A biópsia é feita sob anestesia no local da lesão (ferida). Será realizado curativo compressivo após biópsia e não devo retirar o curativo por 24 horas. Após 24 horas, o curativo poderá ser retirado, e diariamente deverá ser feito novo curativo. Receberei gaze estéril e esparadrapo ou atadura de gaze para os curativos. O ponto poderá ser retirado em 5 dias pelo próprio médico ou em posto de cuidados de saúde. Fui também informado de que, como o ponto foi realizado em úlcera ele poderá sair sozinho sem prejuízo da cicatrização e o procedimento de biópsia não deixará cicatriz suplementar, pois será realizado sobre a úlcera e a cicatrização da mesma ocorrerá de forma a sobrepor o local da biópsia.

Serei informado de cada passo pelo médico responsável e qualquer alteração devo comunicar ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados locais.

F- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:

Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante este trabalho são os normalmente usados para o diagnóstico: da malária, leishmaniose tegumentar, tuberculose e parasitoses intestinais.

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 1₁

_____ Data: _____

Testemunha 2₂

1 Apenas no caso de voluntários impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.

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

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO

Questionário Epidemiológico

REGISTRO N°

Data:

PROJETO: Malária, LTA e tuberculose: aspectos clínicos, parasitológicos, bioquímicos e imunológicos e avaliação das co-infecções em área com população de assentamento no Estado de Rondonia.

DADOS PESSOAIS

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

TEMPO DE RESIDÊNCIA (ANOS):

Área endêmica malária (anos) : Rondônia (anos):

Endereço atual:

LOCAL DE MORADIAS ANTERIORES DENTRO E FORA DE RONDONIA:

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 (2010):

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 Data:

EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

LOCALIZAÇÃO DA CASA
 Cidade Periferia 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 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, _____°C
 Cefaléia Calafrios Náusea Mialgia Nenhum

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS:

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

PARASITEMIA:

LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO:

RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE?: Sim Não Data:

É DOADOR DE SANGUE?: Sim Não Data da última doação:

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

GOTA ESPESSA **ESFREGAÇO** **PLASMA**

HISTÓRIA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

LOCAL DE MORADIAS ANTERIORES DENTRO E FORA DE RONDONIA:		
POSSUI ALGUMA LESÃO CUTTÂNEA: NÃO <input type="checkbox"/> IM <input type="checkbox"/> QUANTAS		
TEMPO DE LESÃO (meses):	LOCALIZAÇÃO:	
DESCRIÇÃO DA(S) LESÃO (ÕES):		
USO DE MEDICAÇÕES: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> local <input type="checkbox"/> sistêmica		
Descrição e evolução:		
Já teve no passado lesões na pele com dificuldade de cicatrização: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
local	Descrição	
Outra pessoa da casa apresentou lesões na pele com dificuldade de cicatrização:		
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> local	Descrição	
Já fez teste de Montenegro <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim - quando		
	resultado	
Possui animais em casa <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim quais		
Algun deles possui ferida ou teve ferida no último ano?		Descreva: