

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

MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NA MORBIDADE DA MALÁRIA POR
Plasmodium vivax:
CONTRIBUIÇÃO DE MICROPARTÍCULAS, ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

por

Fernanda Magalhães Freire Campos

Belo Horizonte
Fevereiro/2011

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

**MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NA MORBIDADE DA MALÁRIA POR
Plasmodium vivax: CONTRIBUIÇÃO DE MICROPARTÍCULAS, ÁCIDOS
NUCLÉICOS CIRCULANTES E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO
HOSPEDEIRO VERTEBRADO**

por

Fernanda Magalhães Freire Campos

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título
de Doutora em Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientadoras: Luzia Helena Carvalho

Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte
Fevereiro/2011

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

C198m **Campos, Fernanda Magalhães Freire.**
2011

Marcadores de inflamação na morbidade da malária por *Plasmodium vivax*: contribuição de micropartículas, ácidos nucleicos circulantes e polimorfismos genéticos do hospedeiro vertebrado / Fernanda Magalhães Freire Campos. – Belo Horizonte, 2011.

xviii, 118 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 115 - 136

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária vivax/transmissão 2. Plasmodium vivax/genética 3. Polimorfismo Genético/imunologia I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

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

MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NA MORBIDADE DA MALÁRIA POR *plasmodium*

vivax:

CONTRIBUIÇÃO DE MICROPARTÍCULAS, ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

por

Fernanda Magalhães Freire Campos

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Profa. Dra. Fabiana Maria de Souza Leoratti

Profa. Dra. Irene da Silva Soares

Profa. Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Suplente: Dra. Marina de Moraes Mourão

Tese defendida e aprovada em 24/02/2011

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos e tantos adorados familiares, amigos e colegas – tanto aos “velhos” e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da minha vida e por me guiar pelos caminhos que passei, por abençoar cada porta aberta e por ser sempre o meu maior companheiro.

Agradeço imensamente as minhas orientadoras, Dra. Luzia Helena Carvalho e Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito. Obrigada Luzia, pela oportunidade, recepção no laboratório de Malária, por todos os momentos de aprendizado e crescimento que com certeza solidificaram minha formação acadêmica. Obrigada Cristiana pela contribuição, incentivo, apoio, carinho e discussões. Foi muito importante para minha formação contar com pessoas tão competentes e que gostam tanto do que fazem! Obrigada pelo carinho e dedicação na escrita desta tese e principalmente por dosarem as críticas com comentários de incentivo.

Agradeço também os doutores Flora Kano, Luciano Moreira, Tais Nóbrega, Flávia Rodrigues e Bernardo pelos ensinamentos. Em especial agradeço ao Dr. Bernardo, pelo enorme auxílio, incentivo e contribuição no desenvolvimento deste projeto. Sou-lhe imensamente grata pelas ajudas fundamentais no citômetro, bem como na ajuda nas análises dos dados e elaboração do artigo fruto desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Malária... Nesses quatro anos, vi muitas pessoas entrarem e também pessoas queridas saírem do laboratório. Mas o saldo desse período foi muito positivo porque as lembranças do convívio, carinho e as amizades permanecerão para sempre. Aqui vai o meu muito obrigada a todos vocês: Armando, Fernanda Rezende, Flávia Alessandra, Flávia Carolina, Jéssica, Daniela, Aracele, Bárbara, Bruna, Denise, Flavia Aburjaile, Marden, Sabrina, Tayline, Verônica, Isabela Oliveira, Flavio, Carolina, Joaquim, Júlia, Juliana, Ricardo, Verônica, Walison e Marina, minha querida aluna de Iniciação Científica. Em especial agradeço ao meu companheiro de doutorado, Bruno Sanchez, pelo agradável convívio e por dividir comigo as angústias e as alegrias deste inesquecível momento. Vou

sentir muito a sua falta! Enfim, obrigada a todos pelo companheirismo, convivência e amizade. Vocês são responsáveis por este clima ímpar que faz parte do LAMAL! Agradeço também a Marli por deixar nosso ambiente de trabalho sempre limpo e agradável e ao Geraldo, por sua imensa prestatividade. A Alice, minha amiga e companheira de tempos! Braço direito de todos no laboratório, amiga que sempre esteve presente quando precisei, não só para o trabalho, mas para vida, muito obrigada! Agradeço a Carolina Parreira, que apesar do pouco tempo de convivência muito contribuiu para este trabalho, principalmente com sua alegria e força de vontade!

A Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito e remoto à informação técnico científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma. E também a Andréa e Cristiane, secretárias da Pós-graduação pelo auxílio sempre que necessário, e a Danúbia e a Dra. Ana Paula Madureira, pela contribuição na parte estatística desta tese.

Agradeço a minha querida amiga/irmã Marcela, amiga que fiz dentro do René Rachou e que sempre esteve comigo, em todos os momentos da minha vida! Com certeza nossa amizade perdurará por toda a vida. Muito obrigada pela sua amizade, ensinamentos, apoio e companheirismo.

A Minha família, minha vida, meu amor! Em especial aos meus pais, por tanto apoiarem meu trabalho, por entenderem minha distância e por me aplaudirem a cada vitória! Ao meu irmão André, por ser meu amigo e meu cúmplice, e a minha querida cunhada Fernanda, por ser essa pessoa iluminada, alegre e sempre presente em minha vida. Agradeço a todos os meus familiares, avós, tios e primos, pelo convívio saudável e por serem essa família maravilhosa!

As minhas grandes amigas Julia, Nina e Shaila, pela amizade e momentos de descontração, e aos primanos por tanto alegrarem os meus dias!

Ao meu marido, Felipe, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me confortando, acalmando meu coração. Obrigada pelo seu amor e por compreender tão bem meus momentos de ausência. A minha segunda família, Lourdinha, Marlinho e Thiago, que com certeza foram um presente de Deus. Obrigada por me apoiarem e me receberem como filha!

Enfim, agradeço a todos que de maneira geral contribuíram e participaram dessa importante fase da minha vida.

Às agências de fomento FAPEMIG, CNPq, PAPES V, CPqRR.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA HUMANA	20
1.2 PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE <i>P. vivax</i> E <i>P. falciparum</i> QUE PODEM SER RELACIONADAS À PATOGENIA.....	21
1.3 O PAPEL DAS MICROPARTÍCULAS (MPs) E DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES (CNAs) NA PATOGÊNESE DA MALÁRIA HUMANA.....	24
1.4 VARIAÇÕES GENÉTICAS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO E PATOGENIA NA MALÁRIA.....	25
1.4.1 ALGUMAS CITOCINAS ENVOLVIDAS NA PATOGENIA DA MALÁRIA E SUAS VARIAÇÕES GENÉTICAS.....	25
1.4.2 O PAPEL DAS PLAQUETAS E DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE GLICOPROTEÍNAS DE PLAQUETAS NA PATOGENIA DA MALÁRIA.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 ÁREAS E INDIVÍDUOS ESTUDADOS.....	40
4.1.1 ÁREAS.....	40
4.1.2 INDIVÍDUOS E AMOSTRAS.....	40

4.2 ESCORE CLÍNICO PARA AVALIAÇÃO DE MALÁRIA AGUDA POR <i>P. vivax</i>	42
4.3 OBTENÇÃO DE DNA E PLASMA.....	44
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PELA CITOMETRIA DE FLUXO.....	44
4.4.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	44
4.4.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS MP _s POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	44
4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MP _s NO PLASMA DOS PACIENTES.....	45
4.5 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES DO PLASMA.....	45
4.5.1 QUANTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO <i>P. vivax</i>	46
4.6 GENOTIPAGEM DOS GENES MIF, TNF- α , IL-10, TGF- β , GPIA/IIA E GPIIB/IIIA POR PCR E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR PCR- RFLP E ELETROFORESE CAPILAR.....	46
4.6.1 PADRONIZAÇÃO DAS PCRS.....	46
4.6.2 GENOTIPAGENS.....	47
4.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	49
5 RESULTADOS.....	51
5.1 ANÁLISES DE MICROPARTÍCULAS NO PLASMA DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO <i>P. vivax</i>	52
5.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PELA CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
5.1.2 DETERMINAÇÃO DA ORIGEM CELULAR DAS MP _s DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO PELO <i>P. vivax</i>	53
5.1.3 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE AS MP _s E A MORBIDADE NA MALÁRIA AGUDA POR <i>P. vivax</i>	53
5.1.4 AVALIAÇÃO DAS MP _s ANTES E APÓS O TRATAMENTO ANTIMALÁRICO...57	
5.2 ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES (CNAs) NO PLASMA DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO <i>P. vivax</i>	58
5.2.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CNAs NO PLASMA DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO <i>P. vivax</i>	58
5.2.2 ANÁLISE DOS CNAs EM FUNÇÃO DA MORBIDADE DA MALÁRIA POR <i>P. vivax</i>	59

5.2.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CNAs EM FUNÇÃO DOS NÍVEIS PLAQUETÁRIOS DURANTE A MALÁRIA AGUDA.....	60
5.2.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CNAs ANTES E APÓS O TRATAMENTO ANTIMALÁRICO.....	60
5.2.5 ANÁLISE DE CNAs DE <i>P. vivax</i> NO PLASMA DE INDIVÍDUOS COM MALÁRIA.....	60
5.3 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GENES DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO.....	61
5.3.1 VARIABILIDADE NO MICROSSATÉLITE: MIF-794 (CATT) ₅₋₈	61
5.3.1.1 IDENTIFICAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR ELETROFORESE CAPILAR E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS MIF-794 (CATT) ₅₋₈ NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	61
5.3.2 ANÁLISES DO POLIMORFISMO G-173C NO GENE MIF.....	63
5.3.2.1 IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA G-173C POR PCR-RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS MIF G-173C NA POPULAÇÃO ESTUDADA E ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS.....	63
5.3.3 HAPLÓTIPOS DO GENE MIF DO HOSPEDEIRO E ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS.....	66
5.3.4 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DO GENE TNF- α	69
5.3.4.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS GENES TNF T-1031C E TNF G-308A E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS TNF- α NA POPULAÇÃO ESTUDADA EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS.....	69
5.3.5 HAPLÓTIPOS DO GENE TNF- α E ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS.....	71
5.3.6 ANÁLISE DO POLIMORFISMO G-1082A DO GENE IL-10.....	73
5.3.6.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS G-1082A NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	73
5.3.7 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DO GENE TGF- β	75
5.3.7.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS TTGF- β C NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	75
5.3.8 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DAS GLICOPROTEÍNAS DE PLAQUETAS GPIA/IIA C807TE GPIIB/IIIA C1565T.....	76

5.3.8.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS GPIA/IIA C807T E GPIIB/IIIA C1565T NA POPULAÇÃO ESTUDO.....	76
6 DISCUSSÃO.....	80
6.1 FATORES PLASMÁTICOS DA INFLAMAÇÃO QUE PODEM SER BIOMARCADORES DA MORBIDADE NA MALÁRIA POR <i>P. vivax</i> : MICROPARTÍCULAS E ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES.....	81
6.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO NA MALÁRIA POR <i>P. vivax</i>	85
7 CONCLUSÕES.....	92
8 ANEXOS.....	95
8.1 PARECERES DO COMITÊ DE ÉTICA.....	96
8.2 ARTIGOS PUBLICADOS.....	98
8.2.1 MICROPARTÍCULAS.....	98
8.2.2 ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES.....	106
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura da capa: Hemácias humanas, células alvo para a infecção pelo <i>P. vivax</i>	i
Figura 1: Desenho esquemático do gene MIF humano mostrando os principais polimorfismos estudados.....	27
Figura 2: Identificação de MPs no plasma de indivíduos com malária <i>vivax</i>	52
Figura 3: Imunofenotipagem das MPs no plasma de indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i>	54
Figura 4: Avaliação do número absoluto de MPs no plasma de indivíduos com malária <i>vivax</i>	55
Figura 5: Associação das PMPs com a morbidade na malária aguda causada pelo <i>P. vivax</i>	56
Figura 6: Avaliação das MPs antes e após o tratamento antimalárico.....	57
Figura 7: Genotipagem do polimorfismo repetitivo do gene MIF-794 (CATT) ₅₋₈ em dois pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	62
Figura 8: Resultado da reação de PCR- RFLP correspondente ao produto da digestão da enzima <i>AluI</i> na região do promotor do gene MIF G-173C em amostras de 3 indivíduos infectados com <i>P. vivax</i>	64
Figura 9: Distribuição da frequência alélica do gene MIF G-173C nos indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i> em função do hematócrito.....	65
Figura 10: Associação entre os haplótipos MIF -794/-173 e presença de anemia (Hb \leq 12 g/dL, HTC \leq 35 %) nos indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i>	68
Figura 11: Resultado da reação de PCR- RFLP correspondente à digestão do produto da amplificação da região do promotor do gene TNF- α	69
Figura 12: Distribuição da frequência alélica do polimorfismo TNF- α T-1031C na amostra estudada. Os indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i> (n= 171) foram categorizados em função da presença ou ausência de febre (\geq 38 °C).....	70
Figura 13: Distribuição da frequência dos alelos TNF- α -G308A na amostra estudada.....	71
Figura 14: Associação entre os haplótipos TNF 308:1031 e susceptibilidade a trombocitopenia nos indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i>	73
Figura 15: Resultado da reação de PCR- RFLP, correspondente ao produto da digestão da região onde se encontra o polimorfismo do gene IL-10 (G-1082A), para amostras de 6 indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i>	74
Figura 16: Resultado da reação de PCR- RFLP correspondente ao produto da digestão da região +869 do gene TGF- β em 4 amostras de indivíduos infectados com <i>P. vivax</i>	75

Figura 17: Resultado da reação de PCR- RFLP, correspondente ao produto da digestão da região onde se encontra o polimorfismo do complexo GPIa/IIa C807T (A) e GPIIb/IIIa C1565T (B).....77

Figura 18: Distribuição da frequência dos genótipos GPIa/IIa C807T na amostra estudada. Os indivíduos infectados pelo *P. vivax* (n= 173) foram categorizados em função dos níveis de plaquetas.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Polimorfismos estudados e associação com susceptibilidade/resistência a doenças e/ou processos inflamatórios.....	26
Tabela 2: Procedência das amostras de voluntários selecionados para o estudo.....	42
Tabela 3: Dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, parasitológicos e hematológicos dos 220 indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i>	43
Tabela 4: Sequência dos iniciadores, condições de amplificação e genótipos associados aos diferentes perfis de fragmentos obtidos.....	48
Tabela 5: Frequências dos genótipos e alelos MIF-794 (CATT) ₅₋₈	63
Tabela 6: Comparação dos níveis de hemoglobina e hematócrito nos indivíduos sem (GG) e com a mutação (GC/CC) do gene MIF G-173C.....	66
Tabela 7: Distribuição dos haplótipos MIF-794/-173 na população estudada.....	67
Tabela 8: Distribuição dos haplótipos TNF 308:1031 na população estudada.....	72
Tabela 9: Principais associações encontradas entre os polimorfismos estudados e os parâmetros clínicos e hematológicos analisados.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC	Acidente vascular cerebral
CNAs	Ácido nucléico circulante
CSA	Condroitina Sulfato A
DBP	<i>Duffy binding protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA	DNA dupla fita
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMPs	Micropartículas de eritrócito
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPIa/IIa	Glicoproteína de membrana de plaqueta Ia/IIa
GPIIb/IIIa	Glicoproteína de membrana de plaqueta IIb/IIIa
GPIV	Glicoproteína IV
Hb	Hemoglobina
HTC	Hematócrito
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN-γ	Interferon gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
LMPs	Micropartículas de leucócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MIF	Fator de inibição da migração de macrófagos
MPs	Micropartículas
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR- RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
PfEMP1	Proteína de membrana do eritrócito de <i>Plasmodium falciparum</i>
PLP	Plasma livre de plaqueta
PMPs	Micropartículas de plaqueta
PPP	Plasma pobre em plaqueta
PS	Fosfatidilserina
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SNPs	Polimorfismos de Base única
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptores do tipo toll
TNFR1	Receptor para o fator de necrose tumoral alfa
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

Os estudos sobre os mecanismos patogênicos que levam à malária grave foram durante muitos anos restritos basicamente ao *Plasmodium falciparum*. Entretanto, o número de casos de *P. vivax* vem aumentando em todo o mundo, incluindo aqueles de malária grave. Evidências recentes sugerem que a infecção pelo *P. vivax* induz uma resposta imune inflamatória mais intensa que aquela induzida pelo *P. falciparum*. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: (i) investigar mediadores plasmáticos relacionados à inflamação que poderiam ser utilizados como marcadores de morbidade da malária por *P. vivax*; (ii) identificar indivíduos geneticamente susceptíveis e/ou resistentes à malária clínica. Na busca de biomarcadores, a hipótese investigada foi a de que as micropartículas (MPs) – vesículas resultantes da ativação e/ou apoptose celular – e os ácidos nucleicos circulantes (CNAs) estariam associados à infecção pelo *P. vivax*. Em pacientes bem caracterizados clinicamente foi possível demonstrar que as MPs, de diferentes origens, estavam significativamente aumentadas na malária por *P. vivax*, sendo as MPs de origem plaquetária associadas à sintomatologia da doença. Os níveis de CNAs plasmáticos estavam aumentados nos pacientes infectados pelo *P. vivax* sendo estes níveis associados ao espectro clínico da doença. Um achado interessante no presente trabalho foi que os níveis de CNAs também correlacionaram-se com a trombocitopenia. Um resultado de grande importância foi que os níveis de MPs e CNAs no plasma retornaram aos valores basais após o tratamento antimalárico específico, o que sugere que ambos os fatores podem ser bons marcadores de morbidade por *P. vivax*.

Na segunda parte do estudo, buscou-se a associação entre os polimorfismos genéticos de citocinas (MIF, TNF- α , IL-10 e TGF- β) e de glicoproteínas plaquetárias (GPIa/IIa e GPIIb/IIIa) com as complicações clínicas e hematológicas da infecção pelo *P. vivax*. Os resultados obtidos evidenciaram associações entre os polimorfismos dos genes GPIa/IIa, TNF- α , MIF e IL-10 e alterações clínicas e hematológicas na malária causada pelo *P. vivax*. Em resumo, os dados apresentados reforçam a influência de múltiplos genes do hospedeiro vertebrado na malária por *P. vivax*. Espera-se que os resultados observados no presente trabalho possam contribuir no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na patogenia do *P. vivax*.

ABSTRACT

Study of the mechanisms involved in the pathogenesis of severe malaria has been widely concentrated in malaria caused by *P. falciparum*. However, the number of severe cases of *P. vivax* has been increasing, placing *P. vivax* infection in a higher status of global health concern. The few studies that had addressed the pathogenesis of vivax malaria had shown that *P. vivax* infection induces greater host inflammatory responses compared to *P. falciparum* malaria. Here, the main objectives of the study were: (i) to investigate plasma-derived mediators of inflammation that could be a potential marker of *P. vivax* clinical disease, (ii) to identify individuals who are genetically susceptible and/or resistant to vivax malaria. Searching for biomarkers, the hypothesis investigated was that cellular microparticles (MPs) – submicron membrane vesicles released upon cellular activation or apoptosis– and circulating nucleic acids (CNAs) are involved in *P. vivax* infection. In patients clinically well characterized, it was possible to demonstrate that MPs from different cellular origins were significantly increased in *P. vivax* infection, and those platelet-derived were associated with acute malaria symptoms. Also, the levels of CNAs were increased in plasma of *P. vivax* patients, with their levels associated with the clinical spectrum of vivax malaria. An interesting finding was that the levels of CNAs were correlated with thrombocytopenia. Of importance, the levels of MPs and CNAs in plasma returned to basal values after specific antimalarial treatment, which suggested they may have potential as biomarkers of vivax morbidity. Further, we sought to investigate the association between genetic polymorphisms in cytokines (MIF, TNF- α , IL-10 and TGF- β) and platelet surface glycoproteins (GPIa/IIa and GPIIb/IIIa) with clinical complications of *P. vivax* infection. The results showed associations between genetic polymorphisms of several genes – GPIa/IIa, TNF- α , MIF and IL-10 – with hematological and clinical parameters of *P. vivax* infection. Taken together, the results presented here may shed light on the mechanism involved in the pathogenesis of *P. vivax*, and it might contribute to the current studies on *P. vivax* malaria.

I Introdução

1.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA HUMANA

A malária é uma das mais importantes doenças infecciosas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo reconhecida como grave problema de saúde pública no mundo. Quarenta por cento da população mundial vive em áreas de transmissão estando, portanto, expostas ao risco de contrair a doença. A incidência da malária é de 300 a 500 milhões de casos e cerca de 1 milhão de mortes por ano, das quais 90% acometem na África sub-Saariana em crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2009). No Brasil, a doença é endêmica na Amazônia Legal, onde foram registrados cerca de 306.000 casos em 2009, correspondendo a 95% dos casos da doença registrados no país. Dos casos clínicos de malária notificados anualmente na região Amazônica, 83,7% são causados pelo *Plasmodium vivax* e cerca de 16,3% pelo *Plasmodium falciparum* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Guerra e colaboradores (2010) mostraram que em 2009, cerca de 2,85 bilhões de pessoas estão em áreas de risco de transmissão da malária por *P. vivax* no mundo todo.

A malária humana é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, que inclui mais de 100 espécies conhecidas, das quais quatro são as principais que parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*. Recentemente, a transmissão natural do *P. knowlesi*, parasito de símios, tem sido descrita em algumas regiões do sudeste asiático e da África (Bronner *et al.*, 2009). Conseqüentemente, muitos autores tem considerado esta espécie como a quinta espécie de plasmódio causando malária humana (Babady *et al.*, 2009).

Apesar da malária causada por *P. vivax* ser a principal encontrada nas Américas e na Ásia, é ainda pouco estudada, possivelmente por ser esta espécie menos virulenta que o *P. falciparum* e também devido às dificuldades de sua manutenção em cultivo contínuo. Entretanto, achados recentes tem questionado o paradigma de que a infecção por *P. vivax* não seja benigna. Em um estudo clínico em Papua Nova Guiné (Oceania) foi mostrado que em crianças menores de cinco anos, 23% dos casos de *P. vivax* foram considerados graves, dos quais 80% apresentavam um quadro de anemia grave (hemoglobina menor que 5g/dL) (Tjitra *et al.*, 2008). Genton e colaboradores (2008) mostraram que na Papua Nova Guiné 9% das crianças com idade inferior a 5 anos diagnosticadas com *P. vivax* evoluíram para o quadro clínico de malária grave. No Brasil, vários estudos relataram um aumento no número de casos graves em pacientes infectados pelo *P. vivax* (Araujo *et al.*, 2008). Estes estudos mostraram que no período de 1998 a 2008, cerca de 230 mortes relacionadas à infecção pelo *P. vivax* foram registradas na Amazônia (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Entretanto, é importante ressaltar a importância da confirmação da espécie *P. vivax* por técnicas mais sensíveis (como o PCR, por

exemplo) em um caso de morte, uma vez que deve ser descartada a possibilidade de co-infecção com o *P. falciparum*. Além disso, a presença de outras doenças infecciosas agudas como febre amarela, leptospirose e dengue também deve ser considerada (Santana *et al.*, 2010).

Nos estudos que mostraram que houve um aumento no número de internações por malária *P. vivax* no Brasil, as principais complicações clínicas encontradas foram anemia grave, icterícia e trombocitopenia (Alexandre *et al.*, 2010). A trombocitopenia foi encontrada em cerca de 20% dos pacientes internados com malária *vivax*, muitos deles apresentando também trombocitopenia grave (plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$) não relacionada aos distúrbios de coagulação. Infecções por *P. vivax* associadas à trombocitopenia também tem sido descritas em outros países, tais como a Índia, onde 18% dos infectados pelo *P. vivax* desenvolveram trombocitopenia grave (Kochar *et al.*, 2009). Entretanto, a importância clínica desta complicação hematológica é ainda pouco compreendida tanto para a infecção pelo *P. vivax* quanto pelo *P. falciparum*. Estes achados demonstram a grande necessidade de novos estudos visando o esclarecimento dos mecanismos patogênicos envolvidos na infecção por *P. vivax* (Anstey *et al.*, 2009).

1.2 PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE *P. vivax* E *P. falciparum* QUE PODEM SER RELACIONADAS À PATOGENIA

Na sua forma mais freqüente, a não-grave, a malária traduz-se clinicamente em uma síndrome febril aguda indiferenciada. O paroxismo febril se justifica pela ruptura das hemácias pelos esquizontes. Este paroxismo acontece principalmente em consequência da liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-1, TNF- α e IFN- γ , que produzem, em seu conjunto, a febre e os calafrios característicos da doença (Anstey *et al.*, 2009).

A malária grave, por ser responsável pelo grande número de mortes em regiões tropicais, tem sido o alvo da maior parte dos estudos sobre a doença, principalmente no que diz respeito ao *P. falciparum*, espécie mais patogênica e melhor estudada. Entretanto, diferenças nas manifestações da doença podem ser observadas, com uma parcela dos indivíduos desenvolvendo complicações graves, enquanto outros não, sendo as razões para isso pouco esclarecidas (Clark *et al.*, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que fatores do parasito, como a virulência da cepa, por exemplo, bem como a idade e características genéticas do hospedeiro, podem estar envolvidos no aumento da susceptibilidade e/ou

resistência ao desenvolvimento de complicações clínicas e hematológicas na infecção malárica (Randall *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao parasito, podemos destacar sua capacidade de multiplicação dentro do hospedeiro vertebrado, uma vez que para cada esporozoíto de *P. falciparum* que penetra em um hepatócito, formam-se cerca de 40.000 novos merozoítos, enquanto na infecção por *P. vivax*, formam-se apenas 10.000 novos merozoítos (revisto por Anstey *et al.*, 2009). É importante destacar ainda os mecanismos de invasão utilizados pelos plasmódios para infectar as células sanguíneas. Nesta etapa de invasão, diferenças importantes são observadas entre a infecção causada pelo *P. vivax* e por *P. falciparum*, quanto ao tipo de célula hospedeira infectada e às interações ligante-receptor necessárias para a invasão.

O *P. vivax* parece invadir exclusivamente reticulócitos (eritrócitos jovens), o que pode contribuir para as cargas parasitárias menores observadas na infecção por essa espécie de parasito (revisto por Anstey *et al.*, 2009) e requer, principalmente, a interação de uma proteína micronemal, a *Duffy binding protein* (DBP), com o seu receptor na superfície do eritrócito, o antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC) (Miller *et al.*, 1976; Chaudhuri *et al.*, 1989; Horuk *et al.*, 1993). Por outro lado, o *P. falciparum* invade tanto os reticulócitos quanto os eritrócitos maduros (Pasvol, *et al.*, 1980) e é capaz de invadir estas células através, de pelo menos, cinco vias diferentes de invasão (revisado por Haldar e Mohandas, 2009). Por fim, destaca-se a capacidade do parasito de causar citoaderência, mecanismo patognomônico da infecção pelo *P. falciparum*, que pode levar às manifestações mais graves da doença, como a malária cerebral. Este complexo mecanismo de citoaderência ocorre devido à formação de protuberâncias (knobs) na superfície das hemácias, a partir de antígenos variantes do parasito tais como a proteína PfEMP1. O sequestro só é possível quando acontece a interação entre a PfEMP1 e proteínas de adesão celular presentes na superfície das células endoteliais humanas, tais como ICAM-1 e CD36. O resultado final é a obstrução de capilares de importantes órgãos como cérebro, pulmão, fígado e rins, cuja anóxia contribui para a fisiopatologia da malária grave (Clark *et al.*, 2006; Van der Heyde *et al.*, 2006). Entretanto, os eventos que levam às complicações e à morte por *P. falciparum* são multifatoriais, envolvendo ainda alteração da homeostase, inflamação sistêmica e lesão neuronal (Rao *et al.*, 2010).

Pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na doença grave causada pelo *P. vivax* (Mueller *et al.*, 2009). Sabe-se que, no caso da infecção por esse parasito, a formação de Knobs não ocorre, o que sugere a princípio, a sua incapacidade de se aderir ao endotélio microvascular. Entretanto, Kim e colaboradores (2006) mostraram que os eritrócitos

infectados por *P. vivax* são capazes de se aderirem *in vitro* ao receptor CSA (condroitina sulfato A), expresso em células da placenta e do pulmão. Anstey e colaboradores (2007) mostraram através de evidências indiretas *in vivo* que a adesão em órgãos como o pulmão pode acontecer também nesta espécie. Recentemente, Carvalho e colaboradores (2010) mostraram que eritrócitos infectados pelo *P. vivax* são capazes de se aderirem *in vitro* às células endoteliais do hospedeiro vertebrado. Entretanto, a citoaderência e o sequestro em *P. vivax* ainda permanecem pouco esclarecidos.

Os poucos estudos que tem investigado a patogenia da malária causada pelo *P. vivax* tem mostrado que a infecção por este parasito induz uma resposta inflamatória mais intensa que aquela induzida pelo *P. falciparum* (Anstey *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2010), com associação entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e a forma mais grave da doença (Andrade *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de ácidos nucléicos complexados às proteínas em estimular a resposta imune inata (Parroche *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). Dentre os receptores especializados em reconhecer o complexo ácidos nucléicos-proteínas, estão os receptores do tipo Toll 9 (TLR9) e Toll 2 (TLR2) (Franklin *et al.*, 2009). Em *P. falciparum*, moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) também podem estimular os TLRs e levar ao paroxismo malárico (Boutlis *et al.*, 2005). Entretanto, estudos desta natureza ainda não foram conduzidos em *P. vivax*.

Vários autores têm especulado os fatores que podem contribuir para uma resposta mais inflamatória na infecção pelo *P. vivax*. Carlton e colaboradores (2008) mostraram que o DNA de *P. vivax* apresenta um alto conteúdo de motivos CpG, maior do que o *P. falciparum*. Os motivos CpG são sequências de DNA contendo o di-nucleotídeo citosina-guanina não metilado. Essas sequências são encontradas no genoma de vários protozoários, bactérias e fungos (Leichtle *et al.*, 2011). Hemmer e colaboradores (2006) mostraram que as concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória envolvida na gravidade da malária, foram maiores durante o paroxismo na malária *vivax* quando comparado a malária *falciparum*. Diante disso, uma maior resposta inflamatória durante a infecção pelo *P. vivax* em comparação com *P. falciparum* pode desencadeada por inúmeros fatores diferentes (Karunaweera *et al.*, 2007).

Várias investigações têm proposto que uma desregulação na resposta imunológica do hospedeiro contribui para a supressão da eritropoiese durante a malária (Hunt and Grau, 2003). Por outro lado, a deficiência na produção de eritropoietina (EPO) não parece ser responsável pela anemia grave (Chang and Stevenson, 2004). Lamikanra e colaboradores

(2007) observaram que a supressão da eritropoiese foi provocada tanto pela presença de fatores do hospedeiro, tais como citocinas pró- inflamatórias, quanto por fatores do parasito, como a hemozoína, indicando que a supressão da eritropoiese é um fenômeno multifatorial. Além disso, estudos de malarioterapia mostraram que para cada eritrócito infectado destruído durante a infecção por *P. vivax*, 32 eritrócitos não infectados são também removidos da circulação sanguínea. Em *P. falciparum* essa destruição é menos acentuada (1 eritrócito infectado para cada 8 eritrócitos não infectados) (Anstey *et al.*, 2009).

I.3 O PAPEL DAS MICROPARTÍCULAS (MPs) E DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES (CNA_s) NA PATOGÊNESE DA MALÁRIA HUMANA

Uma característica de muitas doenças inflamatórias e infecciosas é a ativação de células sanguíneas e do sistema vascular. Esta ativação leva a um processo de vesiculação, formando as micropartículas (

), que são fragmentos da membrana plasmática de algumas células, formados em condições fisiológicas ou quando a homeostase do tecido é perturbada (Mause e Veber, 2010). As MPs formam uma população heterogênea, mas em geral, são definidas pelo seu tamanho (menor que 1 micrômetro) e pela presença de fosfatidilserina (PS) na sua superfície externa (Couper *et al.*, 2010). As MPs possuem diferentes características de acordo com as células que as originam, ou seja, quando as MPs são formadas, elas se deslocam levando consigo as proteínas de membrana da sua célula de origem (van der Heyde *et al.*, 2011). As mais comuns são derivadas de plaquetas (George *et al.*, 1982), mas existem também as que se originam de eritrócitos (Scott, Pendlebury and Green, 1984), leucócitos (Satta *et al.*, 1994) e células endoteliais (Combes *et al.*, 2004). As MPs têm um importante papel na inflamação, coagulação e homeostase vascular, possuindo várias funções fisiológicas, incluindo o transporte de componentes da membrana da sua célula de origem para outras células ativando direta ou indiretamente a inflamação e a coagulação. Uma grande variedade de patologias gera MPs, como doenças cardiovasculares, trombocitopenia idiopática púrpura (Jy *et al.*, 1992) e talassemias (Pattanapanyasat *et al.*, 2004; Pattanapanyasat *et al.*, 2007). As MPs parecem ter ainda um importante papel na infecção por HIV, arteriosclerose e metástase de tumores (Shah *et al.*, 2008).

Recentemente, tem sido sugerido que a vesiculação celular pode estar envolvida também na imunopatologia da malária cerebral por *P. falciparum* (Coltel *et al.*, 2006; Faille *et al.*, 2009), uma vez que em indivíduos com malária cerebral foram observadas altos níveis de

MPs endoteliais. Uma hipótese que pode explicar o papel das MPs na patogênese da malária cerebral é que elas auxiliam em uma maior adesão de eritrócitos infectados (Faille *et al.*, 2009). Já em modelo murino, as MPs de plaquetas foram encontradas em maior quantidade, principalmente em camundongos que apresentavam trombocitopenia (Combes *et al.*, 2004). Recentemente, Couper e colaboradores (2009) mostraram que as MPs podem contribuir para a ativação potente de macrófagos, o que levaria ao desenvolvimento de um processo inflamatório na malária por *P. berghei*. Por outro lado, na infecção por *P. vivax*, as MPs ainda não foram estudadas.

Outro aspecto investigado neste trabalho foi a contribuição de ácidos nucleicos circulantes (CNAs) na inflamação induzida pelo *P.vivax*. A maior parte do DNA e RNA no organismo está localizada dentro das células. Entretanto, uma pequena porção destas sequências (1,8 - 3 ng/mL) pode ser encontrada circulando livremente no sangue de indivíduos saudáveis. O termo “ácidos nucleicos circulantes (CNAs)” se refere a segmentos de DNA ou RNA extracelulares encontrados na circulação sanguínea. A presença de níveis aumentados de CNAs no plasma de pacientes com lesão tecidual (Lam *et al.*, 2009), acidente vascular cerebral (AVC) (Rainer *et al.*, 2003), diabetes (Gahan *et al.*, 2008) e vários tipos de cânceres tem sido demonstrada (Sozzi *et al.*, 2003). Em vários destes modelos, os níveis de CNAs foram diretamente associados à gravidade da doença. Assim, para várias destas doenças, tais como câncer, os CNAs constituem um biomarcador e uma poderosa ferramenta prognóstica pouco-invasiva. Apesar da importância, o papel destes CNAs nunca foi estudado na malária.

1.4 VARIAÇÕES GENÉTICAS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO E PATOGENIA NA MALÁRIA

1.4.1 ALGUMAS CITOCINAS ENVOLVIDAS NA PATOGENIA DA MALÁRIA E SUAS VARIAÇÕES GENÉTICAS

Nos últimos anos tem havido certo consenso que grande parte da patologia na malária pode ser resultado da ativação de vias inflamatórias, resultando em uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, fazendo-se necessário um controle nesta produção para que haja um equilíbrio na resposta imunológica (Clark *et al.*, 2006). Assim, grande atenção tem sido dada aos genes do hospedeiro vertebrado que podem estar envolvidos em uma resposta inflamatória exacerbada. Dentre estes, vários genes codificadores de citocinas tem sido estudados na infecção por *P. falciparum*, como por exemplo, o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon- gama (IFN- γ). A tabela

1 resume os principais achados da literatura envolvendo polimorfismos nos genes estudados neste projeto e suas relações com as doenças e/ou processos patológicos.

O MIF foi originalmente descrito como um fator de inibição da migração de macrófagos derivados de linfócitos T (David, 1966). Atualmente sabe-se que além dos macrófagos, outros tipos de células também são importantes produtoras de MIF. O MIF é uma citocina multifuncional envolvida na patogênia de várias doenças humanas, incluindo sepse e choque séptico (Bernhagen *et al.*, 1993; Calandra *et al.*, 1998; Calandra *et al.*, 2000), síndrome do desconforto respiratório agudo (Donnelly *et al.*, 1997) e doenças inflamatórias e auto-imunes como a artrite reumatóide (Gregersen *et al.*, 2003; Hoi *et al.*, 2003), glomerulonefrite (Lan *et al.*, 2000) e doenças inflamatórias intestinais (de Jong *et al.*, 2001).

Tabela 1- Polimorfismos estudados e associação com susceptibilidade/resistência a doenças e/ou processos inflamatórios

Gene	Polimorfismo	Doença/Processo Patológico	Associação	Referência Bibliográfica
MIF	-794 (CATT) ₅₋₈	Artrite reumatóide	Aumento da gravidade	Baugh <i>et al.</i> , 2002
	G-173C	Artrite reumatóide	Aumento da gravidade	Barton <i>et al.</i> , 2003
TNF- α	G-173C e -794 (CATT) ₅₋₈	Malária por <i>P. falciparum</i>	Aumento da susceptibilidade a anemia	Awandare <i>et al.</i> , 2009
	T-1031C	Malária por <i>P. falciparum</i>	Aumento da gravidade	Sinha <i>et al.</i> , 2008
	T-1031C	Endometriose	Aumento da gravidade	Lee <i>et al.</i> , 2008
	G-308A	Malária por <i>P. vivax</i>	Aumento da gravidade	Sohail <i>et al.</i> , 2008
IL-10	C819T	Queimadura	Aumento da gravidade	Huebinger <i>et al.</i> , 2010
	G-1082A	Câncer gastrointestinal	Aumento da susceptibilidade	Sun <i>et al.</i> , 2010
	G-1082A	Doença de Chagas cardíaca	Diminuição da susceptibilidade	Costa <i>et al.</i> , 2009
	G-1082A	Malária por <i>P. falciparum</i>	Aumento da susceptibilidade	Ouma <i>et al.</i> , 2008
TGF- β	T869C	Diabetes	Diminuição da susceptibilidade	Valladares-Salgado <i>et al.</i> , 2010
	T869C	Hipertensão arterial	Diminuição da susceptibilidade	Yang <i>et al.</i> , 2010
GPIa/IIa	C807T	Trombose	Aumento da susceptibilidade	Jimenez <i>et al.</i> , 2008
GPIIb/IIIa	C1565T	Trombocitopenia púrpura	Aumento da susceptibilidade	Newman <i>et al.</i> , 1989

O gene MIF foi clonado pela primeira vez em 1994 (Paralkar *et al.*, 1994) e mapeado em 1997 por Budarf e colaboradores. Esses autores mostraram que o MIF é um gene de cópia única que está localizado no cromossomo 22q11.2, composto por 3 exons de 205, 183 e 173 pb e 2 íntrons de 185 e 95 pb. O gene MIF é altamente conservado em diferentes espécies animais, o que sugere que essa citocina possui importantes funções biológicas. A região promotora do gene MIF apresenta várias sequências prováveis de ligação para fatores de transcrição, incluindo AP-1, fator nuclear NF- κ B e GATA. Entretanto, o papel dessas sequências no controle da expressão do gene MIF humano ainda não é conhecido (Renner *et al.*, 2005).

Quatro polimorfismos do gene MIF humano tem sido mais frequentemente descritos na literatura: uma repetição do tetranucleotídeo - CATT- localizado na posição -794 do promotor [-794(CATT)₅₋₈] e três polimorfismos de base única (SNPs), um na região do

promotor (G-173C) e outros dois (T254C e C656G) em íntrons do gene (Donn *et al.*, 2001; Donn *et al.*, 2002 e Baugh *et al.*, 2002) (Figura 1). Como os dois últimos polimorfismos estão localizados em sequências não codificantes, a maioria dos estudos realizados com esse gene foram direcionados para os polimorfismos -794(CATT)₅₋₈ e G-173C, encontrados no promotor.

O polimorfismo -794(CATT)₅₋₈ foi identificado por Baugh e colaboradores em 2002. Neste estudo, os autores avaliaram pacientes com artrite reumatóide e indivíduos não-portadores da doença, e observou-se uma associação significativa entre pacientes homocigotos que apresentavam cinco repetições do CATT (5-CATT) e menor agressividade da doença reumatóide, quando comparados aos outros pacientes com maior número de repetições do tetranucleotídeo (6, 7 ou 8-CATT). Além disso, dados experimentais demonstram que indivíduos com o alelo 5-CATT (*low repeat*) apresentam baixos níveis de expressão de MIF e aqueles apresentando 6-CATT, 7-CATT ou 8-CATT apresentam uma elevada expressão desta citocina (Renner *et al.*, 2005).

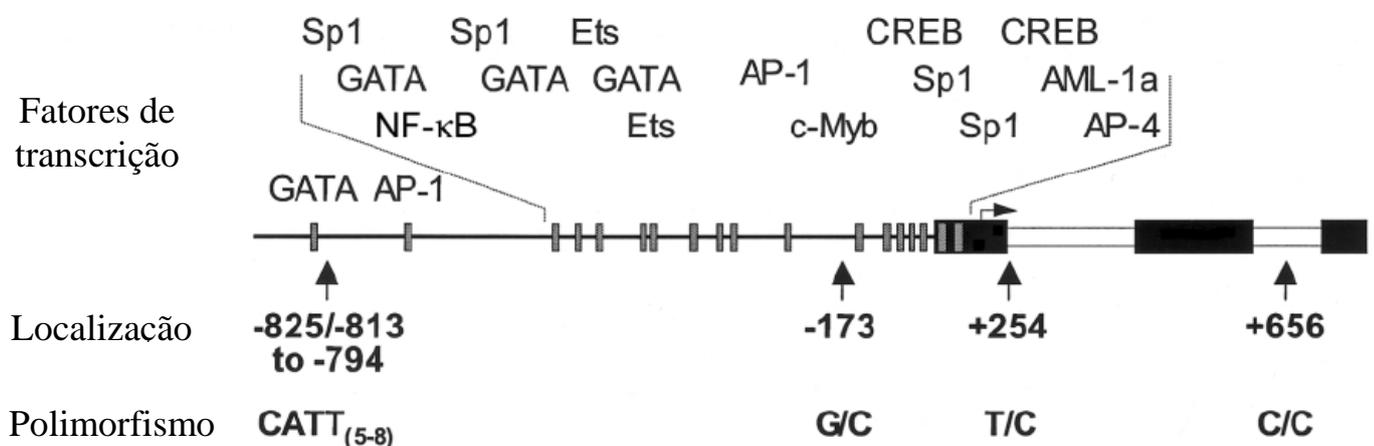


Figura 1: Desenho esquemático do gene MIF humano mostrando os principais polimorfismos estudados. As caixas pretas representam os três exons, as caixas brancas os dois íntrons e as caixas cinzas, os prováveis locais para ligação de fatores de transcrição (GATA, AP-1, ETs etc). As setas indicam as posições dos polimorfismos do gene (*Adaptado de Renner et al.*, 2005).

Barton e colaboradores (2003) estudaram o papel dos polimorfismos MIF G-173C e -794 CATT₅₋₈ na patogenia da artrite reumatóide. Estes autores mostraram que os indivíduos carreadores do alelo 5-CATT tiveram uma redução no risco de desenvolver a artrite e que indivíduos portadores do alelo -173C apresentaram um aumento na chance de desenvolver essa patologia.

Na malária, McDevitt e colaboradores (2006) observaram que em cultura de monócitos estimulada com hemozoína, um resíduo da digestão da hemoglobina pelo *Plasmodium* e forte indutor da resposta imune do hospedeiro vertebrado, pacientes portadores de dois alelos 5-CATT (homozigoto) secretam menores níveis de MIF que os monócitos de pacientes portadores dos alelos 6-CATT ou 7-CATT (homozigoto ou heterozigoto). Estes dados experimentais obtidos *in vitro* sugerem que polimorfismos no promotor do gene desta citocina podem influenciar na resposta imune contra a infecção malárica, uma vez que indivíduos carreadores de alelos com mais de 5 repetições, são alto produtores de MIF.

O polimorfismo de base única MIF G-173C se caracteriza por uma substituição de uma guanina por uma citosina na posição -173 do gene. Assim como o microssatélite, esse SNP parece estar associado a uma maior produção de MIF, levando a um aumento da susceptibilidade a inúmeras doenças inflamatórias. Apenas mais recentemente o papel dos SNPs do gene MIF na malária humana tem sido estudado. Jain e colaboradores (2009) mostraram que elevados níveis de MIF estão associados com a mortalidade de pacientes com malária cerebral na Índia. Além disso, o polimorfismo MIF-G173C foi associado com um maior risco de parasitemias elevadas em crianças com malária no Quênia. Awandare e colaboradores (2009) mostraram a associação dos polimorfismos de SNP (MIF G-173C) e microssatélite (-794 CATT₅₋₈) com uma maior susceptibilidade a anemia grave na malária por *P. falciparum*. O forte desequilíbrio de ligação entre estes loci tem mostrado que a associação entre eles é capaz de gerar associações à susceptibilidade a diferentes doenças mais fortes do que utilizando os locus individuais (Donn *et al.* 2002; Barton *et al.* 2003; Hizawa *et al.* 2004). Além disto, alguns autores tem mostrado a associação de haplótipos deste gene envolvendo as regiões -794/-173 com um aumento da susceptibilidade a várias doenças, tais como sepse e choque séptico (Lehmann *et al.*, 2009). A associação dos haplótipos MIF -794/-173 com uma maior susceptibilidade a anemia foi vista em pacientes com malária por *P. falciparum* (Awandare *et al.*, 2009).

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) foi descoberto como uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e respostas imunes (Carswell *et al.*, 1975). A identificação desta citocina pleiotrópica levou a descoberta da superfamília de TNFs e de

seus receptores (Revisado por Parameswaran e Patial, 2010). O TNF- α participa na defesa do hospedeiro contra infecções, causando o aumento da expressão das moléculas de adesão, aumentando a circulação de células no sítio de infecção, estimulando macrófagos e neutrófilos à fagocitose, assim como a liberação de outras citocinas e mediadores inflamatórios. A produção exacerbada de TNF- α tem sido associada com a patogenia de várias doenças, como artrite reumatóide, doença de Crohn, arteriosclerose e sepse (Revisado por Parameswaran e Patial, 2010). Em malária, TNF- α foi a primeira citocina demonstrada estar presente em níveis elevados no plasma de pacientes com malária grave por *P. falciparum* (Grau *et al.*, 1989).

Os macrófagos são os principais tipos celulares produtores de TNF- α . Além deles, células T e B, monócitos e fibroblastos também podem produzir esta citocina. A expressão do gene TNF- α acontece através de inúmeras vias de sinalização celular e na grande maioria das células, ele não é expresso sem que haja uma estimulação prévia. É necessário que a célula seja exposta a estímulos tais como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) para que haja a produção de TNF- α (Falvo *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2000). Estudos visando à identificação de fatores importantes para a transcrição do gene TNF- α mostraram que a via de transdução de sinal do TNF- α se dá através de dois receptores de membrana- TNFR1 e TNFR2- fazendo com que esta citocina exerça um número variado de importantes funções celulares incluindo proliferação, diferenciação e apoptose.

Mais recentemente, tem sido proposto que o TNF- α , cujo gene codificador foi mapeado no cromossomo 6p21.3 está envolvido na regulação do metabolismo de ferro e no desenvolvimento da anemia grave na malária por *P. vivax* (Jain *et al.*, 2009). De fato, essa citocina pode bloquear a diferenciação e proliferação de células progenitoras eritróides, causando uma deficiência de glóbulos vermelhos maduros no sangue (Roodman *et al.*, 1987).

Vários estudos têm sido feitos na tentativa de entender os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição do gene do TNF- α (Pociot *et al.*, 1993), dentre eles estudos de polimorfismos na região promotora. Os polimorfismos mais estudados são os SNPs localizados na posição G-308A e T-1031C do promotor do gene (Sohail *et al.*, 2008), por estarem relacionados com diferença na expressão deste importante gene associado com a resposta inflamatória em várias doenças. Além disso, esses polimorfismos estão associados com as complicações cerebrais da malária causada por *P. falciparum* (Sinha *et al.*, 2008) e com o aumento no risco de desenvolver anemia grave em crianças recém-nascidas do Quênia (Aidoo *et al.*, 2001).

O primeiro polimorfismo na posição -308 corresponde à substituição do nucleotídeo guanidina (G) por uma adenina (A). Esta alteração está relacionada com um aumento na

produção de TNF- α (Hajeer and Hutchinson, 2001). O mesmo ocorre para o polimorfismo na posição -1031, que corresponde à substituição de uma timina (T) por uma citosina (C). Os dados de associação de TNF- α e malária *vivax* são escassos. Em um dos poucos estudos descritos, Sohail e colaboradores (2008) mostraram a associação dos polimorfismos G-308A e T-1031C com sintomas clínicos em cerca de 40 pacientes com malária *P. vivax* na Índia. Mais recentemente, estudos buscando a associação dos haplótipos do gene TNF- α com suscetibilidade à malária também tem sido feitos (Kuesap *et al.*, 2010). Entretanto, o papel dos polimorfismos no gene do TNF- α e a malária por *P. vivax* permanece pobremente compreendido.

A Interleucina 10 (IL10) foi descrita pela primeira vez em 1990 (Moore *et al.*, 1990) e constitui um membro da família das chamadas IL-10. A IL-10 propriamente dita é uma citocina antiinflamatória produzida por monócitos e linfócitos e que possui efeitos pleiotrópicos (Ouyang *et al.*, 2010). Esta citocina tem um importante papel na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, auxiliando na diminuição da resposta inflamatória provocada por essas citocinas (Buruiana *et al.*, 2010).

O gene codificador da IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32 e possui uma região promotora contendo mais de 27 sítios polimórficos (Giordani *et al.*, 2003). Três principais polimorfismos já foram descritos na região promotora do gene IL-10 (G-1082A, C819T e C592A) (Gibson *et al.*, 2001). Huebinger e colaboradores (2010) estudando pacientes que sofreram queimadura mostraram que indivíduos com a mutação C819T tiveram um menor risco de morte. O mesmo polimorfismo está ainda associado à resposta imune em doenças auto-imunes e/ou inflamatórias. Alguns estudos mostraram que o genótipo GG, relacionado ao polimorfismo na posição -1082 do gene IL-10 e associado à alta produção da citocina, parece proteger contra o câncer do trato gastrointestinal (Sun *et al.*, 2010).

Souza e colaboradores (2004) mostraram que a alta expressão de IL-10 foi observada em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, enquanto que indivíduos portadores da forma cardíaca da doença apresentaram baixos níveis desta citocina. Os autores sugerem que há uma perda do controle imunológico em pacientes com a forma cardíaca da doença, tendo a IL-10 papel fundamental neste controle. Entretanto, Costa *et al.* (2009) mostraram que a presença do alelo A na posição 1082 do gene IL-10 está relacionado à proteção na doença de Chagas, uma vez que indivíduos que apresentaram esse alelo são portadores da forma indeterminada da doença.

Apesar das bases fisiopatológicas da anemia grave em pacientes com malária ainda permanecerem obscuras, diferentes níveis de produção de IL-10 parecem estar relacionados

com a determinação da resposta à doença. Ouma e colaboradores (2008) mostraram a associação do haplótipo -1082G/-819C/-592C no gene IL-10 com a proteção contra a anemia grave em crianças com malária por *P. falciparum*. Além disso, esses autores mostraram que crianças com este haplótipo também possuem altos níveis plasmáticos de IL-10.

O fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) constitui uma superfamília de citocinas com mais de 40 membros. O TGF- β 1 é uma citocina pleiotrópica que pode ter efeito anti e pró-inflamatório dependendo do ambiente e da sua concentração (Andrade *et al.*, 2010). Esta citocina tem como papel regular diferentes funções celulares, como proliferação, apoptose, diferenciação, migração, entre outros (Arosio *et al.*, 2007). O TGF- β 1 está envolvido em várias patologias humanas, incluindo doenças auto-imunes, doenças vasculares e tumores. Além disso, esta citocina tem um efeito imunossupressor, por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucina 1 (IL-1) (Suzumura *et al.*, 1993) e de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1 (Shrikant *et al.*, 1996). Existem vários polimorfismos descritos no gene codificador do TGF- β 1, tanto na região do promotor, quanto na sua região codificadora, mas os principais e melhores estudados são dois SNPs, T869C, e G915C. Esses polimorfismos estão associados com variações na expressão da citocina TGF- β 1 (Cambien *et al.*, 1996). A atividade anti-inflamatória do TGF- β 1 parece estar associada a uma redução dos sintomas clínicos em crianças infectadas com *P. falciparum*. Recentemente, Sambo e colaboradores (2010) mostraram que polimorfismos no gene do TGF- β 2 contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento da malária cerebral por *P. falciparum* em crianças angolanas. De particular interesse para o estudo da malária, podemos destacar que as plaquetas ativadas liberam TGF- β 1 que podem estimular a apoptose no endotélio, levando a graves complicações na malária cerebral (Wassmer *et al.*, 2006). Ainda não foram feitos estudos associando-se polimorfismos no gene TGF- β 1 em *P. vivax*.

1.4.2 O PAPEL DAS PLAQUETAS E DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE GLICOPROTEÍNAS DE PLAQUETAS NA PATOGENIA DA MALÁRIA

Além do seu importante papel no controle da homeostase, as plaquetas podem contribuir em vários processos relacionados à modulação da resposta imune, inflamação e angiogênese (Smyth *et al.*, 2009).

As plaquetas possuem em sua superfície uma grande quantidade de integrinas, que consistem de heterodímeros de subunidades α e β , associados covalentemente. A principal integrina plaquetária é o complexo GPIIb/IIIa, única integrina expressa exclusivamente em

plaquetas. O receptor é formado pela associação de duas GP, a GPIIb e a GPIIIa, por isso é considerado um complexo. O GPIa/IIa é o principal receptor para o colágeno, enquanto o GPIIb/IIIa é um importante receptor para o fibrinogênio (de Lacerda, 2007). O receptor plaquetário GPIV (CD36) é o mesmo envolvido na citoaderência de hemácias parasitadas por *P. falciparum* a vários órgãos-alvos da malária grave. O CD36 não é expresso exclusivamente em plaquetas, sendo também encontrado em monócitos, macrófagos e em células endoteliais (Cserti-Gazdewich *et al.*, 2011).

Há algum tempo se especula a participação das plaquetas na fisiopatologia da malária grave por *P. falciparum*, uma vez que a proteína PfEMP1 do parasito pode se ligar as plaquetas expressando CD36, e essas por sua vez podem se ligar ao endotélio aumentando a adesão de eritrócitos infectados (Cox e McConkey, 2010). A diversidade de receptores encontrados nas plaquetas sugere a interação destas partículas com células do sangue, sistema imune, sistema endócrino e sistema nervoso. A ativação plaquetária pode ainda induzir a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, o que aumenta a resposta inflamatória durante a malária (Coppinger *et al.*, 2004). Por outro lado, essa ativação pode levar a trombocitopenia, o que acaba reduzindo a adesão de eritrócitos infectados, uma vez que, com a diminuição de plaquetas no sangue passam a existir também poucos receptores disponíveis para que os eritrócitos se aderem (Cox e McConkey, 2010).

Vários mecanismos imunológicos como estresse oxidativo por exemplo, tem sido sugeridos como causa da destruição de plaquetas. Entretanto, a patogênese da perda de plaquetas associada com a malária grave é muito pouco esclarecida, tendo sido estudada principalmente em modelos de malária murina (Piguet, Kan and Vesin, 2002). Nestes modelos, tem sido proposto que as plaquetas podem agravar a malária por contribuir para a adesão de leucócitos ou por permitir a ativação endotelial (Cserti-Gazdewich *et al.*, 2011). Conseqüentemente, o papel das plaquetas na patogênese da malária, bem como em outras doenças inflamatórias e infecciosas, tem sido um assunto de grande interesse.

A contagem de plaquetas tem sido associada à malária *falciparum* grave e, apesar do achado não ser consensual, a trombocitopenia não tem sido um critério para classificação de malária grave, de acordo com a OMS (Kochar *et al.*, 2009). Mais recentemente, também nos casos de malária *vivax* com complicações, tem-se observado, sistematicamente, o aparecimento de plaquetopenia. Em estudo descritivo de 43 casos de malária *vivax* grave, em Manaus, a média da contagem de plaquetas em pacientes graves, no dia da admissão, foi significativamente menor do que a de pacientes não-graves (de Lacerda, 2007).

Variabilidades genéticas podem afetar os receptores de plaquetas, contribuindo para o aumento da adesão, podendo levar a trombose (Jimenez *et al.*, 2008). Além disso, essa variabilidade pode levar à trombocitopenia grave, uma vez que as glicoproteínas de superfície plaquetária parecem ser alvos importantes para a destruição de plaquetas (Negrier *et al.*, 1998). Negrier e colaboradores (1998) identificaram vários polimorfismos na região do promotor e na região codificadora dos genes dos complexos GPIa/IIa e GPIIb/IIIa. O polimorfismo C807T na subunidade Ia (GPIa/IIa) tem sido relacionado com a maior expressão do receptor, contribuindo para uma maior adesão plaquetária. Por outro lado, o complexo IIb/IIIa possui inúmeros epítomos que podem ser alvo do reconhecimento de aloanticorpos, levando a destruição plaquetária e com isso à trombocitopenia. Newman e colaboradores (1989) identificaram um polimorfismo na posição 1565 do gene GPIIIa (do complexo GPIIb/IIIa), onde uma citosina foi substituída por uma timina. Esse polimorfismo levou a uma maior expressão da glicoproteína, levando ao aumento da apoptose de plaquetas. É importante ressaltar que até o momento, não há nenhum estudo associando os polimorfismos das glicoproteínas de plaquetas com a patogênese da malária humana.

2 Justificativa

A malária é uma doença parasitária que ocupa posição de destaque no panorama mundial. A incidência dessa doença no Brasil vem aumentando dramaticamente nas últimas décadas, sendo importante destacar que atualmente mais de 80% dos casos diagnosticados no Brasil são causados pelo *P. vivax* (WHO, 2009).

O fato do *P. vivax* ter sido considerado por muito tempo como uma espécie causadora de uma malária benigna, fez com que os estudos sobre os aspectos patogênicos da malária humana fossem dirigidos principalmente para a infecção pelo *P. falciparum*, espécie mais letal para o homem. Recentemente casos graves de malária por *P. vivax* tem sido relatados e nos últimos anos, com a implementação das técnicas de biologia molecular, que tem permitido descartar/confirmar a presença de infecções mistas por *Plasmodium*, tornou-se mais evidente que o *P. vivax* - na ausência de *P. falciparum* - pode estar frequentemente envolvido com a malária severa (Anstey et al., 2009).

Casos de malária grave por *P. vivax* tem sido descritos em todo o mundo, incluindo os casos de infecção por parasitos multi-resistente às drogas (Gentron et al., 2008; Tjitra et al., 2008). No Brasil a maioria das complicações clínicas relacionadas com a malária causada pelo *P. vivax* são complicações hematológicas, como anemia severa e trombocitopenia. Um estudo recente, realizado em Manaus (AM), a trombocitopenia foi observada em 65% dos pacientes com malária por *P. vivax*, sendo 19% portadores também de anemia severa ($< 50.000/\text{mm}^3$) (de Lacerda et al., 2007). Achados como este tem levado ao questionamento do paradigma de que o *P. vivax* é causador de uma malária “não-virulenta” (Picot, 2006). Outras complicações também descritas na infecção pelo *P. vivax* incluem complicações cerebrais, síndrome respiratória aguda severa (SARS), disfunção hepática e falha renal (Kochar et al., 2005; Saleri et al., 2006). De grande relevância foi o achado recente de que eritrócitos infectados por *P. vivax* parecem ser seqüestrados nos capilares pulmonares, um fenômeno previamente atribuído exclusivamente ao *P. falciparum* (Anstey et al., 2007).

Os poucos estudos que tem investigado a patogenia da malária causada pelo *P. vivax* tem mostrado que a infecção pelo *P. vivax* induz uma resposta inflamatória mais intensa que aquela induzida pelo *P. falciparum* (Yeo et al., 2010). No Brasil, um único estudo mostrou a associação entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e a forma mais grave da doença (Andrade et al., 2010). Visto que uma resposta imune exacerbada do hospedeiro parece ter um papel fundamental na patogenia da malária causada por *P. vivax*, a proposta deste trabalho foi estudar mediadores importantes da resposta imuno-inflamatória que poderiam estar envolvidos nas manifestações da infecção causada pelo *P. vivax*. Mais especificamente, um

dos pontos investigados foi se parte da resposta inflamatória induzida pelo *P. vivax* é mediada por um processo de vesiculação celular que culmina com a produção de micropartículas (MPs) na circulação. As micropartículas - microvesículas resultantes da ativação celular - estão frequentemente associadas a processos inflamatórios sistêmicos que levam a um distúrbio de coagulação (Piccin et al., 2007). Estudos sobre MPs ganharam destaque na última década, sendo muitos os trabalhos que descrevem as características moleculares e funcionais das MPs derivadas de várias células (Periard et al., 2007). Embora muitos aspectos da função de MPs ainda sejam desconhecidos, existem evidências crescentes que elas são fundamentais nos processos inflamatórios e de coagulação.

Além das MPs, os CNAs vêm ganhando destaque como potenciais biomarcadores de morbidade em inúmeras doenças inflamatórias. A presença de níveis aumentados destes ácidos nucleicos circulantes foi observada no plasma de indivíduos com patologias tais como câncer, diabetes entre outras. Diante disso, acredita-se que os CNAs, juntamente com as MPs possam ser importantes biomarcadores prognósticos na malária por *P. vivax* e pretendeu-se no presente trabalho investigar o papel dos CNAs nesta doença.

Vários trabalhos têm mostrado o envolvimento de polimorfismos em genes do hospedeiro vertebrado com a susceptibilidade e/ou resistência às doenças inflamatórias e à malária por *P. falciparum*. Diante disso, selecionou-se alguns polimorfismos nos seguintes genes: (i) *Fator de inibição da migração de macrófagos (MIF)*; (ii) *Fator de necrose tumoral-beta (TNF-alfa)*; (iii) *interleucina 10 (IL-10)* (iv) *fator de transformação de crescimento beta 1(TGF-β)*; (v) *Glicoproteínas de membrana de plaquetas IIb/IIIa e Ia/IIa*. Espera-se que o estudo dos polimorfismos nos genes descritos possam auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos patogênicos na malária por *P. vivax*.

3 Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial de micropartículas e ácidos nucleicos circulantes como biomarcadores de morbidade na malária por *P. vivax*, assim como o envolvimento de polimorfismos em genes do hospedeiro vertebrado com manifestações da infecção causada pelo *P. vivax*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a presença das micropartículas na infecção pelo *P. vivax* e determinar sua origem celular;

Identificar CNAs circulantes em pacientes infectados pelo *P. vivax*;

Investigar a associação entre os níveis de CNAs e/ou de MPs com os parâmetros hematológicos e clínicos tais como febre, paroxismo, parasitemia, tempo de exposição à malária e dias com sintomas da doença aguda;

Comparar os níveis de CNAs e de MPs antes e após a terapêutica antimalárica específica;

Genotipar os polimorfismos selecionados nos genes codificadores das citocinas pró- (MIF, IFN- γ , TNF- α), anti- (TGF β -1e IL-10) inflamatórias e em glicoproteínas da superfície de plaquetas em pacientes infectados pelo *P. vivax*;

Associar estes polimorfismos com a presença de alterações laboratoriais, clínicas e hematológicas.

4 Materiais e Métodos

4.1 ÁREAS E INDIVÍDUOS ESTUDADOS

4.1.1 ÁREAS

Nos últimos 10 anos o nosso grupo de pesquisa vem conduzido uma série de estudos imuno-epidemiológicos em áreas de transmissão da malária humana no Brasil, onde a colaboração com clínicos locais tem viabilizado os estudos (Carvalho *et al.*, 1999; Ceravolo *et al.*, 2005; Rezende *et al.*, 2009). O presente estudo foi realizado entre os anos de 2007 e 2010, com amostras obtidas dos estados do Amazonas (Manaus), Rondônia (Porto Velho) e Mato Grosso (Cuiabá).

Em 2009, 19.698 casos de malária foram registrados em Manaus com um grande predomínio de *P. vivax* (92,6%) sobre a malária *falciparum* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). No estado de Rondônia a malária continua sendo uma doença relacionada com a atividade profissional exercida principalmente pelos homens adultos. As baixas taxas de transmissão ocorrem durante todo o ano, também com predomínio da infecção pelo *P. vivax* (Katsuragawa *et al.*, 2010). O principal vetor no estado de Rondônia é o *Anopheles darlingi* e o número de picadas infectantes por habitante/ano é estimado para esta região entre 2 a 10 (Gil *et al.*, 2007). Em Mato Grosso, os municípios da região noroeste são responsáveis por cerca de 75 a 80% das ocorrências de malária no estado, dentre os quais Colniza, Aripuanã, Juína, Rondolândia e Brasnorte são os que mais registram casos por estarem localizados em região mais próximas à floresta Amazônica. No período de 2005 a 2009 o estado do Mato Grosso teve uma redução de mais de 60% nos casos de malária, passando de 8.437 casos para 3.273 (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). As cidades de Manaus (AM), Porto Velho (RO) e Cuiabá (MT) possuem centros de referência de tratamento de malária, com uma boa estrutura hospitalar.

4.1.2 INDIVÍDUOS E AMOSTRAS

O presente estudo foi realizado com indivíduos infectados por *P. vivax* e que procuraram o serviço de referência nas cidades de Cuiabá (n= 162), Porto Velho (n= 38) e Manaus (n= 20), totalizando amostras de 220 indivíduos (Tabela 2). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Processos CPqRR N° 07/ 2006 e N° 05/2008). Os indivíduos diagnosticados do Mato Grosso e de Rondônia foram tratados e acompanhados clinicamente pelo Dr. Cor Jésus F. Fontes, colaborador deste trabalho (UFMT). Os pacientes do Amazonas foram diagnosticados e tratados pelo Dr. Marcus V G Lacerda também colaborador deste

trabalho (Fundação de Medicina Tropical, AM). Nessas regiões, a identificação da infecção pelo *P. vivax* foi feita através do exame microscópico de gota espessa corada pelo Giemsa realizadas por técnicos treinados das Unidades de Saúde da localidade e, posteriormente, pela nested-PCR realizada em nosso laboratório (Snounou *et al.* 2002).

Adicionalmente, foram incluídas neste estudo amostras de 15 indivíduos saudáveis, voluntários do Centro de Pesquisas René Rachou e de 12 indivíduos com carcinoma de ovário provenientes do Hospital Luxemburgo. A tabela 3 resume os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, parasitológicos e hematológicos dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* e que aceitaram participar do estudo através da assinatura do consentimento informado por escrito de acordo com as diretrizes para pesquisa com seres humanos, conforme especificado pelo Conselho Nacional de Saúde do Brasil (Resolução 196/96). Os dados clínicos e demográficos foram adquiridos através de um questionário padronizado, e o perfil hematológico foi avaliado por meio de hemograma completo automatizado.

Fizeram parte deste estudo voluntários na faixa etária entre 15 e 78 anos, sendo 76% do sexo masculino e 24% do sexo feminino, apresentando diagnóstico de malária por *P. vivax* através de gota espessa. Como nas áreas de estudo os indivíduos eram migrantes, provenientes de áreas livres de transmissão de malária, a idade não se correlacionou necessariamente com a exposição à malária. A exposição cumulativa à malária foi, portanto, baseada no número de episódios de malária relatados pelos indivíduos (Tabela 3). Como foram relatados números variáveis de infecções prévias de malária, categorizamos os indivíduos em três grupos: (i) até cinco episódios prévios de malária (EPM), (ii) 6 a 10 EPM, e (iii) mais de 10 EPM. A temperatura corporal aferida no momento da coleta do sangue, permitiu categorizar os indivíduos em dois grupos: com febre ($> 38^{\circ}\text{C}$) e sem febre ($< 38^{\circ}\text{C}$). Outro parâmetro clínico avaliado em nosso estudo foi o número de dias apresentando sintomas de malária aguda, onde os indivíduos foram categorizados como tendo: até 2 dias, de 3 a 5 dias e mais de 5 dias de sintomas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2009) a anemia foi definida como a concentração de hemoglobina <13 g/dL em homens e <12 g/dL em mulheres e a trombocitopenia é definida quando a contagem de plaquetas for inferior a $150.000/\mu\text{L}$. A trombocitopenia foi categorizada em leve (100.000 - $150.000/\mu\text{L}$), moderada (50.000 - $100.000/\mu\text{L}$) e severa ($<50.000/\mu\text{L}$) (George *et al.*, 2000).

Tabela 2 – Procedência das amostras de voluntários selecionados para o estudo.

Doença	Localidade de Coleta (Cidade/UF)	Ano de coleta	Nº de Indivíduos
Malária (<i>P. vivax</i>)	Cuiabá/MT	2003-2006	162 ^a
Malária (<i>P. vivax</i>)	Porto Velho/RO	2008	38 ^{a, b}
Malária (<i>P. vivax</i>)	Manaus/AM	2010	20 ^{a, b, c}
Carcinoma de ovário	Belo Horizonte/MG	2008	12 ^b
Não doente	Belo Horizonte/MG	2008-2010	15 ^{b, c}

^a Amostras utilizadas no estudo de polimorfismos de DNA

^b Amostras utilizadas no estudo de MPs

^c Amostras utilizadas no estudo de CNAs

4.2 ESCORE CLÍNICO PARA AVALIAÇÃO DE MALÁRIA AGUDA POR *P. vivax*

Diante da inexistência de critérios que permitam definir a gravidade da malária causada pelo *P. vivax*, foi utilizada a classificação feita pela OMS para malária por *P. falciparum* (WHO, 2009). Um único paciente infectado pelo *P. vivax* do estado do Amazonas apresentou sinais clínicos de malária grave, conforme preconizado pela OMS. Este paciente apresentou hiperbilirrubinemia (bilirrubina total = 4,3 mg/dL) e insuficiência renal aguda (creatinina= 2,3 mg/dL); outras doenças infecciosas comuns foram descartadas durante a sua hospitalização. Para definir diferentes graus de morbidade para os outros indivíduos com malária, foram adaptados os critérios descritos por Karunaweera *et al* (1998), já validados na região amazônica pelo nosso grupo (Souza-Silva *et al.*, 2010). Em resumo, a ocorrência de febre no momento da coleta de sangue e parâmetros hematológicos foram incluídos no cálculo do escore clínico: leucócitos, plaquetas, hemoglobina (Hb) e hematócrito (HTC). Pontuações numéricas de 0 ou 1, foram atribuídos aos parâmetros clínicos e hematológicos relatada como ausente (ou dentro dos limites normais) ou presente (ou fora da faixa normal), respectivamente. Para os 5 parâmetros analisados, a soma das pontuações forneceu o escore clínico final do paciente. Esta avaliação semiquantitativa clínica permitiu analisarmos a correlação existente entre os polimorfismos genéticos estudados e o espectro clínico da malária *vivax*, bem como no estudo de ácidos nucleicos circulantes.

Tabela 3 – Dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, parasitológicos e hematológicos dos 220 indivíduos infectados pelo *P. vivax*

CARACTERÍSTICAS	
Sexo, homem:mulher	2,3:1
Mediana idade, anos (IQR)*	37,0 (15,0-78,0)
Nº de episódios prévios de malária, n (%)	
≤ 5	159 (74)
6 – 10	35 (16)
> 10	22 (10)
Nº de dias com a doença aguda, n (%)	
≤ 2	36 (18)
3 – 5	81 (42)
> 5	78 (40)
Principais sintomas nos últimos 3 dias, n (%)	
Febre	177 (82)
Dor de cabeça	192 (89)
Calafrio	190 (88)
Mialgia	183 (85)
Náusea	108 (50)
Vômito	61 (28)
Parasitemia, parasitas/µL de sangue, n (%)	
≤ 500	33 (23)
501 – 1,000	34 (24)
> 1,000	75 (53)
Temperatura do corpo (°C)	
< 38	24 (11)
≥ 38	191 (89)
Níveis de hemoglobina, mediana (variação)	12,8 (4,5-16,9)
Contagem de plaquetas x 1000/mm³, mediana (variação)	107 (13-260)
Contagem de leucócitos x 100/mm³, mediana (variação)	56 (14-207)
Hematócrito (%), mediana (variação)	37 (13-50,6)

4.3 OBTENÇÃO DE DNA E PLASMA

As amostras de DNA para os estudos de polimorfismos foram extraídas do sangue periférico dos indivíduos infectados por *P. vivax*, indivíduos saudáveis e pacientes com carcinoma de ovário. De cada indivíduo foram coletados cerca de 5 mL de sangue por punção venosa na presença de EDTA utilizando o sistema *Vacurette®* (*Greiner Bio-One GmbH*, Kremsmünster, Áustria). O DNA foi extraído utilizando-se o kit de extração de DNA genômico (*Gentra systems*, USA) conforme as recomendações do fabricante e aliquoteado a -20°C até o momento do uso. Os plasmas utilizados nos estudos de MPs e CNAs foram obtidos por punção venosa na presença de citrato de sódio (MPs) e heparina (CNAs) e conservados a -70°C até o uso.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PELA CITOMETRIA DE FLUXO

4.4.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A quantificação das MPs no plasma foi realizada pela citometria de fluxo adaptada dos protocolos descritos anteriormente (Bode and Hickerson, 2000; Couper *et al.*, 2010). Inicialmente, o sangue coletado em tubos contendo citrato de sódio a 0,124 M foi centrifugado a baixa rotação (1.500 x g) por 15 minutos a temperatura ambiente para obtenção dos plasmas pobres em plaquetas (PPP). Em seguida, o PPP foi centrifugado a alta rotação (13.000 x g) por 3 minutos, para obtenção do plasma livre de plaquetas (PLP). Finalmente, 100 µL do PLP foram diluídos em solução de PBS contendo citrato e heparina (1 µg/mL) (diluição de 1:3) e novamente centrifugados por 90 minutos a 14.000 x g a 15°C. O sedimento rico em MPs foi ressuspenso no tampão de ligação à anexina 1X (BD Biosciences, California, US). As MPs foram quantificadas por citometria de fluxo através da calibração com *microbeads* fluorescentes (*Spherotech Inc.*Libertyville, Illinois, US) de tamanho definido (0,7 a 0,9 µm). Dez microlitros das *beads* foram adicionadas à 100 µL de PBS 1X estéril.

4.4.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS MP_s POR CITOMETRIA DE FLUXO

A maioria dos reagentes utilizados neste estudo foi obtida da empresa BD Biosciences, exceto quando mencionado. A caracterização fenotípica das MPs para determinação de sua origem celular foi realizada com a incubação de 100 µL do plasma contendo as MPs com os anticorpos específicos para: plaquetas (CD41a/FITC), leucócitos (CD45/FITC), monócitos

(CD14/FITC), eritrócitos (CD235a/FITC) e células endoteliais (CD144 VE caderina/FITC). Adicionalmente, foram utilizados como controle anticorpos IgG de camundongo marcados com FITC e PE (controle de isotipo). Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 min. protegidas da luz. As MPs foram ressuspensas em 100 μ L do tampão de ligação de Anexina V (BD Pharmingen) e, finalmente, 5 μ L de Anexina V foram adicionados, já que a Anexina V reconhece resíduos de fosfatidilserina que geralmente estão presentes na superfície das MPs.

As amostras foram levadas ao citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton-Dickinson, California, USA), onde cerca de 100.000 eventos foram obtidos em cada amostra, sendo pelo menos 2.000 eventos dentro da região específica para MPs. As análises foram feitas utilizando o *software FlowJo* (Tree Star).

4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MPs NO PLASMA DOS PACIENTES

Para confirmar se o número absoluto de MPs era diferente entre os indivíduos infectados com malária e os indivíduos saudáveis, assim como para determinar o número absoluto de MPs por microlitro de sangue, o citômetro foi ajustado para realizar a leitura da amostra em alta velocidade (60 μ L/segundo) para cada amostra. O número de MPs/ μ L de plasma foi calculado como descrito por Faille *et al* (2009) de acordo com a seguinte fórmula: $\text{MPs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 400) / (60 \times 100)$, onde N é o número de eventos adquiridos na região das MPs, 400 é o volume total em cada tubo antes da fenotipagem, 60 é o volume de amostra analisada durante a fenotipagem e 100 é o volume original da suspensão de MPs.

4.5 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES DO PLASMA

Ácidos nucléicos circulantes (CNAs) foram isolados do plasma de pacientes com *P. vivax* e de doadores saudáveis utilizando o kit QIAamp de ácido nucléico circulantes (Qiagen, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizadas duas diferentes metodologias para quantificar os níveis CNAs no plasma: (i) amplificação por PCR em tempo real da seqüência do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), um gene de cópia única que foi utilizado neste estudo como um marcador da quantidade de DNA presente em amostras de plasma, (ii) quantificação fluorométrica do DNA circulante total

utilizando o kit Quant-iT™ PicoGreen Reagente (Molecular Probes, Holanda), de acordo com instruções do fabricante.

Para o PCR em tempo real, foram utilizados os seguintes iniciadores F: 5' GGC ACA CGT GGC TTT TCG 3'; R: 5' GGT CCT GAA TGC ATG AAG TTT CAA 3', como descrito anteriormente (Sozzi *et al.*, 2003). Com o objetivo de normalizar a quantidade de DNA nas amostras dos plasmas, 5 ng de DNA de uma solução de espermatozoides de salmão (Invitrogen, CA, EUA) foram adicionadas em amostras de plasma antes da purificação do DNA. A sequência genômica do salmão *Oncorhynchus keta*, um marcador específico do cromossomo Y, foi amplificada em paralelo com a hTERT utilizando os iniciadores específicos: F: 5' CAA CCC AGG TTG CTC GAA TT 3'; R: 5' TGG ACG CAT GGC TTA CCG 3'

4.5.1 QUANTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO *P. vivax*

Para identificar as sequências do parasito no plasma dos pacientes infectados pelo *P. vivax*, os iniciadores F: 5'CAA CAG GTC CTT CAC GCT TAG TG 3'; R: 5' CGA CAG CAC CAT TGG CG 3' foram desenhados para sequências genômicas específicas de *P. vivax* obtidas do GenBank (Carlton *et al.*, 2008) e acessadas do site PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>), com o auxílio do programa *Primer Express* (PE Applied Biosystems). As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas no equipamento ABI Prism 7000 Sequence Detection System SDS (PE Applied Biosystems, CA, EUA). As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 1 min. O ciclo limite (*threshold*) para a quantificação do DNA foi ajustado para 0,2 para todos os experimentos feitos neste estudo.

4.6 GENOTIPAGEM DOS GENES MIF, TNF- α , IL-10, TGF- β , GPIA/IIA E GPIIB/IIIA POR PCR E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR PCR- RFLP E ELETROFORESE CAPILAR

4.6.1 PADRONIZAÇÃO DAS PCRS

Reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas para a amplificação das regiões de interesse dos genes estudados a partir de molde de DNA dupla fita. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20 μ L, utilizando 100-200ng da amostra de DNA, 0,5 μ M de cada iniciador, 1,25mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl₂ (0,75 mM- 4,5 mM), 1U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As amplificações foram conduzidas em termocicladores automáticos

Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e PTC100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Massachusetts, USA). Na tabela 4 estão listadas as sequências dos iniciadores e as condições de amplificação utilizadas para cada gene.

Em geral, os polimorfismos estudados neste trabalho são polimorfismos de base única (SNP). No caso específico do gene MIF, além de um SNP, foi realizado o estudo de um polimorfismo de microssatélite, que consiste em uma repetição do tetranucleotídeo CATT₅₋₈, na posição -794. Para o polimorfismo de microssatélite (CATT₅₋₈), o primer MIF (-794 CATT₅₋₈)- anti-senso foi marcado com fluoresceína para permitir a detecção dos produtos de PCR utilizando a técnica de eletroforese capilar no aparelho MegaBACE (Amersham Biosciences). Após a eletroforese, foram observados quatro produtos de amplificação com tamanhos diferentes, sendo cada um deles correspondente em ordem crescente aos alelos contendo 5, 6, 7 e 8 repetições do tetranucleotídeo CATT. As reações de PCR foram, primeiramente, visualizadas em géis de agarose 1,0% em tampão TAE 1X (40 mM TRIS, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8), corados com Brometo de Etídeo [10 mg/mL]. Os géis foram corridos a 100V, visualizados em um transiluminador ultravioleta e fotografados utilizando o sistema UVP BioDoc-iTTM. Posteriormente foi realizada a genotipagem utilizando sequenciador automático de DNA para determinação dos tamanhos dos fragmentos amplificados.

4.6.2 GENOTIPAGENS

Para o polimorfismo MIF-794 (microssatélite CATT₅₋₈), os produtos de PCR foram separados por eletroforese capilar. Neste procedimento foram utilizadas placas de genotipagem de 96 poços, nas quais foram adicionados em cada poço 2 µL do produto de PCR e 8 µL da mistura de Tween 0,1% e DNA padrão (MegaBACETM ET550-R Size Standard: 1x500 µL em 10 mM Tris; pH 8,0, 11 mM) conjugado a fluoresceína, completando um volume final de 10 µL. Em seguida as placas foram aquecidas por 1 minuto para a desnaturação das fitas de DNA e levadas ao sequenciador automático de DNA *MegaBace* (Amersham Biosciences) para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados e posteriormente os resultados foram analisados utilizando o software MegaBACE genetic Profiler Suíte v2.2.

Para os polimorfismos dos genes MIF G-173C, TNF- α G-308A, TNF- α T-1031C, TGF- β T869C, IL-10 G-1082A, GPIa/IIa C807T e GPIIb/IIIa C1565T foram feitas as genotipagens por PCR- RFLP.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores, condições de amplificação e genótipos associados aos diferentes perfis de fragmentos obtidos

Sequência do iniciador 5'-3'	Protocolo da PCR (número de ciclos e temperatura de anelamento dos primers)	Enzima de restrição	Condições da digestão	Base: tamanho em pb
TNF-α (G-308A) (Zhang D, 2003)	35 ciclos; 59°C por 45 seg	<i>NcoI</i>	2 U da enzima, 37°C, 5 horas	G: 20, 87 A: 107
F: AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	---	---	---	---
R: GCCTTAGCCTCGTCCCTCCT	---	---	---	---
TNF-α (T-1031C) (Asghar <i>et al.</i> , 2004)	35 ciclos; 59°C por 1 min	<i>BbsI</i>	2 U da enzima, 37°C, 16 horas	T: 13, 251 C: 13, 71, 180
F: TATGTGATGGACTCACCAGG	---	---	---	---
R: TTCTGTCCCGGTACATCTCC	---	---	---	---
TGF-β (T869C) (Garcia-González <i>et al.</i> , 2007)	32 ciclos; 61°C por 1 min	<i>MspAII</i>	2 U da enzima, 37°C, 3 horas	T: 15, 40, 67, 85
F: CCTGTTTCGCGCTCTCGGCAGTG	---	---	---	---
R: GGTAGGCGCCGGTCTAGGACAG	---	---	---	---
IL-10 (G-1082A) (Cordeiro <i>et al.</i> , 2008)	35 ciclos; 60°C por 1 min	<i>EcoNI</i>	5 U da enzima, 37°C, 4 horas	G: 253, 97, 27 A: 280, 97
F: CCAAGACAACACTACTAAGGCTCCTTT	---	---	---	---
R: GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA	---	---	---	---
GPIa/IIa (C807T) (Jimenez <i>et al.</i> , 2008)	40 ciclos; 53°C por 45 seg	<i>TaqI</i>	10 U da enzima, 65°C, 2 horas	C: 23, 92 T: 115
F: GTGTTTAACTTGAAGACATAT	---	---	---	---
R: ACCTTGCATATTGAATTGCTT	---	---	---	---
GPIIb/IIIa (C1565T) (Jimenez <i>et al.</i> , 2008)	40 ciclos; 58°C por 1 min	<i>MspI</i>	20 U da enzima, 37°C, 16 horas	C: 45, 221 T: 45, 50, 177
F: TTCTGATTGCTGGACTTCTCTT	---	---	---	---
R: TCTCTCCCATGGCAAAGAGT	---	---	---	---
MIF (G-173C) (Donn <i>et al.</i> , 2001)	30 ciclos; 60°C por 45 seg	<i>AluI</i>	2 U da enzima, 37°C, 5 horas	G: 98, 268 C: 63, 98, 205
F: ACTAAGAAAGACCCGAGGC	---	---	---	---
R: ATTTGTGGTTGCACGGGG	---	---	---	---
MIF -794(CATT_{5,8})* (Baugh <i>et al.</i> , 2002)	35 ciclos; 65°C por 1 min	---	---	5, 5 5, X**
F: TGCAGGAACCAATACCCATAGG	---	---	---	---
R: CAGGGGCTCAAATGGTAA	---	---	---	---

*Para todos os genes acima foram estudados apenas polimorfismos de base única, exceto para o MIF, onde foram analisados dois polimorfismos, sendo um de base única e outro de microsatélite.

** Corresponde aos alelos com 6, 7 ou 8 repetições.

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

No presente estudo, foram feitas análises de dados referentes às MPs, aos CNAs e aos polimorfismos genéticos humanos. No estudo de MPs, investigou-se se a infecção pelo *P. vivax* estava associada com elevados níveis de MPs circulantes no plasma, bem como o papel das MPs durante a fase aguda da doença. Os dados foram analisados utilizando-se os programas *GraphPad* (Instat 4.0) e *SPSS* (15.0). As diferenças nas médias entre os grupos estudados (apresentando marcação para anexina V e para os diferentes marcadores celulares) foram analisadas pelo teste não-paramétrico *Mann Whitney*. Para investigar a associação entre os parâmetros clínicos utilizados e os níveis de MPs foram realizadas análises de regressão linear. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em escala logarítmica para que essas análises pudessem ser realizadas.

No estudo de CNAs, os dados foram analisados através dos programas *GraphPad* *Prisma* (5.0). As diferenças das médias entre os níveis de CNAs nos grupos estudados foram analisadas pelo teste t de Student bicaudal ou o teste Mann-Whitney quando os dados não se ajustavam a uma distribuição normal. O teste não-paramétrico de correlação de Spearman foi utilizado para analisar a associação entre as variáveis e os níveis de CNAs, bem como entre o escore clínico e os níveis de CNAs.

Finalmente, no estudo de polimorfismos avaliou-se a associação entre os polimorfismos de genes do hospedeiro vertebrado com as alterações clínicas e hematológicas encontradas nesses indivíduos. Dependendo do tipo de análise, as estatísticas foram realizadas nos programas *GraphPad* (Instat 4.0), *SPSS* 15.0 ou *BioStat* 5. Como as variáveis analisadas neste estudo não apresentavam distribuição normal, a associação entre elas e os polimorfismos foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de *Spearman*. Este coeficiente também foi utilizado nas análises de correlação entre a presença dos polimorfismos e os escores clínicos dos pacientes. As comparações entre médias (temperatura, dias com sintomas da doença, Hb, HTC, plaquetas e leucócitos e os genótipos) foram realizadas utilizando o teste não-paramétrico *Mann Whitney*. As comparações de proporções (genótipos e parâmetro clínico ou hematológico) foram feitas pelo Qui-quadrado (χ^2) ou Teste Exato de *Fischer*. O teste exato de *Fischer* foi utilizado nas comparações entre grupos com um número de amostras inferior a cinco. Para as análises de tendência foi feito o teste do Qui-quadrado de tendências. Em todos os testes realizados o nível de significância considerado foi de 5%.

Os haplótipos dos genes MIF (-794/-173) e TNF (-308/-1031) foram inferidos pelo programa PHASE (2.1) (Stephens *et al* 2001; Stephens & Scheet, 2005). Este programa se baseia na construção de haplótipos para genótipos independentes, através de um método estatístico bayesiano. Ao inferir os haplótipos utilizando o PHASE, as probabilidades são monitoradas e associadas em cada leitura. As probabilidades são consideradas excelentes quando o valor é próximo de 1. Este programa também foi utilizado para medir o desequilíbrio de ligação entre os loci -173 e -794 (MIF) e -308 e -1031 (TNF). A razão de chance da ocorrência de determinado haplótipo nos grupos estudados foi calculada pelo teste de “Odds ratio” (OR), onde também foram calculados os intervalos de confiança para cada caso. Análises de regressão multivariada logística foram realizadas para descrever associações independentes entre as variáveis: idade, sexo e número de episódios anteriores de malária e a presença dos polimorfismos e dos haplótipos.

As construções dos haplótipos e análises de desequilíbrio de ligação foram realizadas pela Dra. Tais N de Souza (Laboratório de Malária), colaboradora deste projeto. Nas demais análises estatísticas obteve-se a colaboração da estatística Danúbia Lacerda, do Centro de Pesquisa René Rachou.

5 Resultados

5.1 ANÁLISES DE MICROPARTÍCULAS NO PLASMA DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *P. vivax*

Os resultados referentes ao estudo de MPs foram recentemente publicados (Campos *et al.*, 2010). O artigo foi incluído no ANEXO 8.2 desta tese (pag. 96).

5.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PELA CITOMETRIA DE FLUXO

Neste trabalho, padronizou-se com sucesso a técnica de citometria de fluxo para a identificação e quantificação de MPs nos plasmas incluindo a determinação de sua origem celular. Como as MPs possuem um tamanho de cerca de 1 μm , utilizou-se microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7 - 0,9 μm) para delimitar a região (R1) correspondente às MPs. As MPs isoladas do plasma foram então definidas de acordo com o tamanho (SSC) e a granulidade (FSC) (Figura 2A). Além disso, utilizou-se a proteína ligadora de fosfolípedes Anexina V (capaz de reconhecer fosfatidilserinas presentes na superfície das MPs) conjugada com PE. Foram utilizados ainda os controles de isotipo IgG-FITC e IgG-PE de camundongo para delimitação correta dos *gates* para as análises de MPs (Figura 2A).

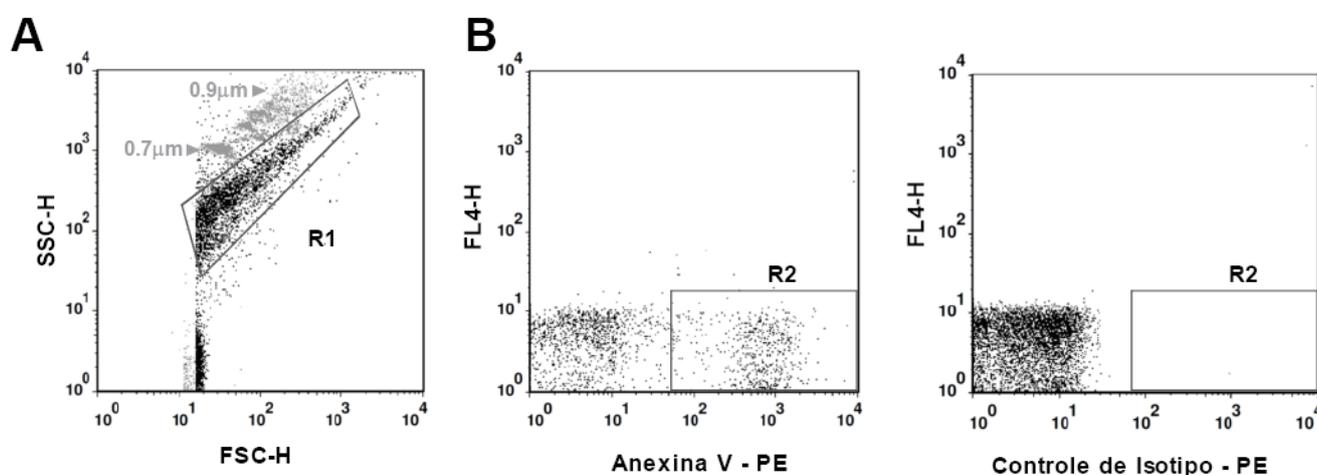


Figura 2: Identificação de MPs no plasma de indivíduos com malária *vivax*. **(A)** MPs isoladas do plasma foram selecionadas de acordo com seu tamanho (SSC) e granulidade (FSC). Microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7-0,9 μm) foram utilizadas para delimitar a região das MPs (R1). **(B)** Os eventos presentes em R1 foram selecionados pela marcação positiva com Anexina V-PE. O controle de isotipo IgG-PE de camundongo foi utilizado para a delimitação correta da região de MPs (R2).

5.1.2 DETERMINAÇÃO DA ORIGEM CELULAR DAS MPs DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO PELO *P. vivax*

A imunofenotipagem das MPs no plasma dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* foi feita através da marcação com anticorpos monoclonais específicos para cada tipo celular: CD41a - expresso em plaquetas; CD144 - expresso em células endoteliais; CD235a - expresso em eritrócitos; CD45 - expresso em leucócitos e CD14 - expresso em monócitos. A porcentagem de eventos positivos para anexina V e para cada um dos marcadores foi comparada entre os indivíduos infectados, os não infectados (controle negativo) e os com carcinoma de ovário (controle positivo – doença indutora de MPs) (Figura 3). A frequência de MPs originadas de plaquetas (PMPs), de eritrócitos (EMPs) e de leucócitos (LMPs) foi significativamente maior entre os indivíduos infectados pelo *P. vivax* quando comparadas ao grupo controle negativo ($p < 0,0087$). Esse aumento foi confirmado quando avaliou-se o número absoluto de MPs/ μL de plasma (Figura 4). Não foram encontradas diferenças significativas entre as MPs originadas de células endoteliais ou de monócitos entre indivíduos infectados e não infectados pelo *P. vivax*. Esses resultados sugerem que as plaquetas, eritrócitos e leucócitos são as principais fontes de MPs durante a fase aguda da infecção pelo *P. vivax* e que a presença dessas MPs pode estar relacionada com inflamação na malária. É importante ressaltar ainda que, apesar das MPs identificadas nos pacientes controles (com carcinoma de ovário) encontraram-se aumentadas, nos pacientes infectados pelo *P. vivax* este aumento foi ainda maior (Figura 3).

5.1.3 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE AS MPs E A MORBIDADE NA MALÁRIA AGUDA POR *P. vivax*

Com o objetivo de avaliar o papel das MPs na patogênese da malária por *P. vivax*, foi analisado se o aumento de MPs durante a infecção aguda pelo *P. vivax* estava relacionada com os parâmetros demográficos, clínicos, hematológicos e parasitológicos relacionados à malária (Tabela 2 da seção Materiais e Métodos). Como dito anteriormente, a frequência das PMPs, EMPs e LMPs foi significativamente maior entre os indivíduos infectados pelo *P. vivax* quando comparadas ao grupo controle negativo. Porém, nenhuma associação foi encontrada entre estas subpopulações de MPs e os parâmetros hematológicos ou parasitológicos. Entretanto, observou-se uma relação linear positiva entre febre e a presença de PMPs no plasma (Regressão linear: $\beta = 0,06$; $p < 0,0001$) (Figura 5A).

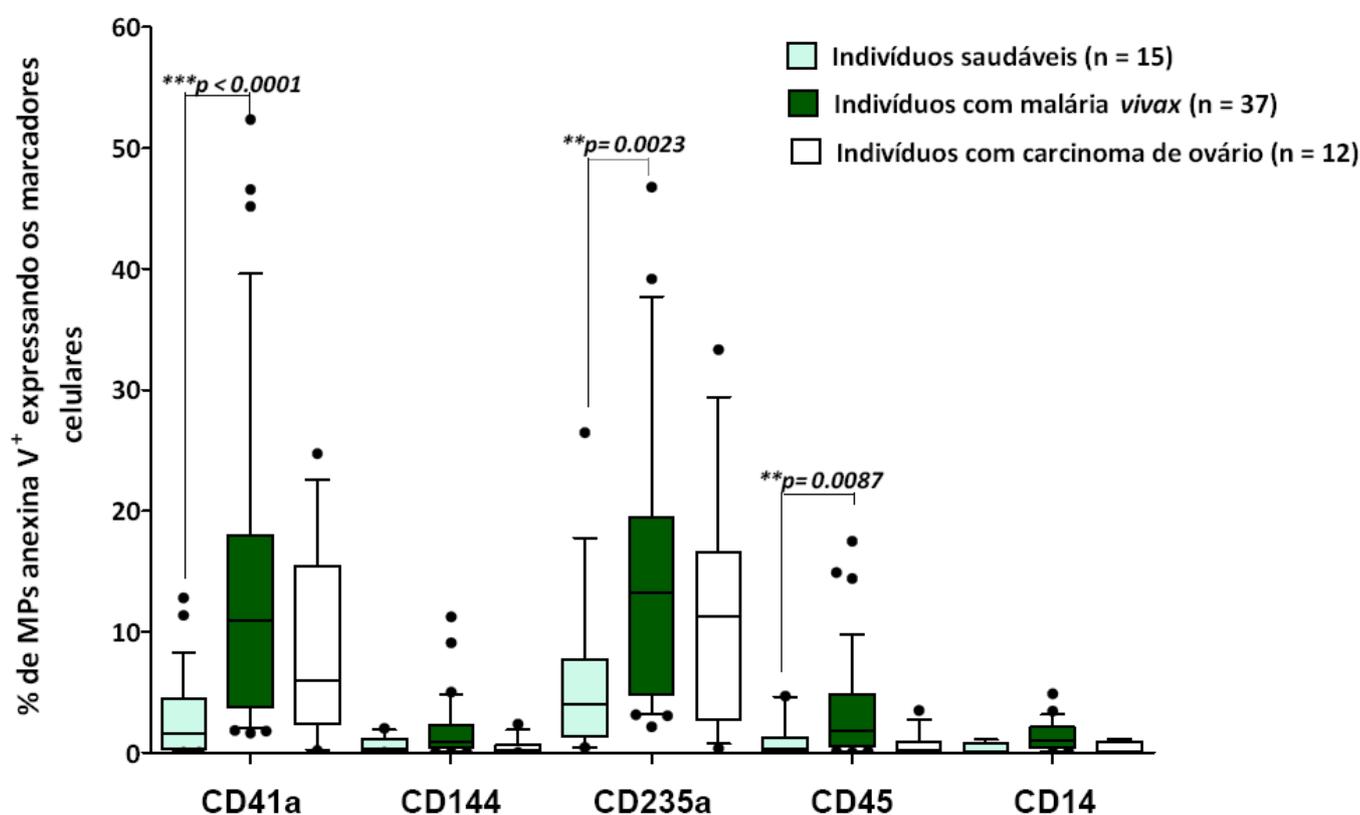


Figura 3: Imunofenotipagem das MPs no plasma de indivíduos infectados pelo *P. vivax*. Anticorpos monoclonais conjugados com FITC foram utilizados para a marcação específica de cada tipo celular: CD41 (plaquetas), CD144 (células endoteliais), CD235a (eritrócitos), CD45 (leucócitos) e CD14 (monócitos). A porcentagem de eventos positivos para anexina V e para cada um dos marcadores foi comparada entre os indivíduos infectados, os não infectados e os com carcinoma de ovário (controle positivo). As caixas representam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças nas médias entre os grupos foram analisadas pelo teste *Mann Whitney*. O valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

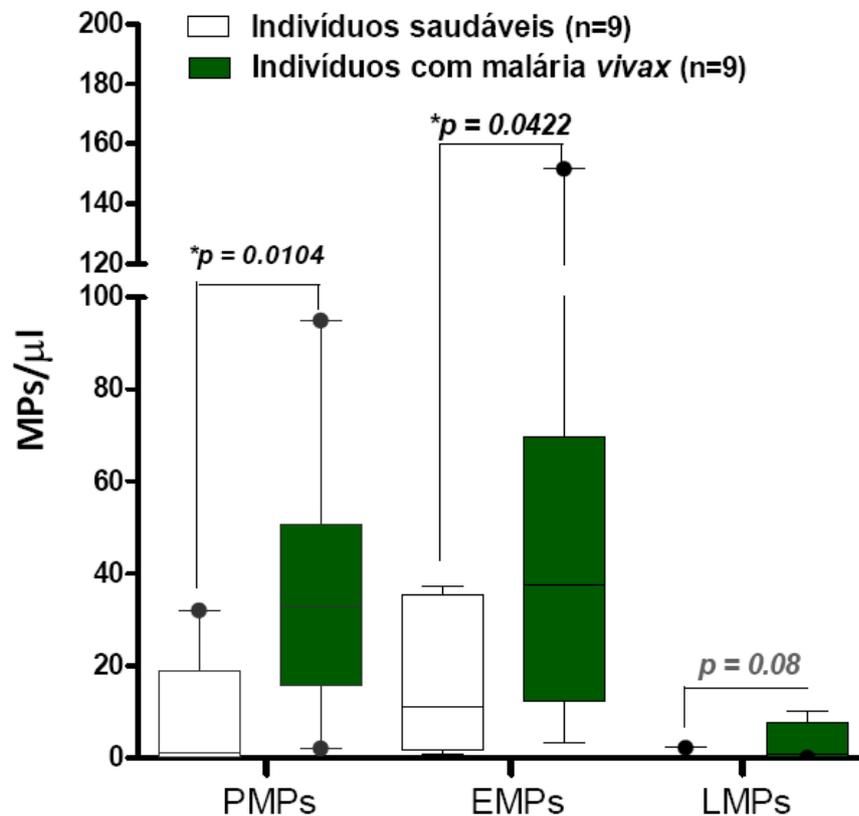


Figura 4: Avaliação do número absoluto de MPs no plasma de indivíduos com malária *vivax*. O aumento do número de MPs no plasma dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* foi confirmado utilizando-se o número de MPs/ μ l de plasma. As caixas representam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças nas médias entre os grupos foram analisadas pelo teste *Mann Whitney*. O valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

Além disso, uma correlação estatisticamente significativa foi observada entre a frequência de PMPs e o número de dias com sintomas de malária aguda (Regressão linear: $\beta=0,36$, $p < 0,0001$) (Figura 5B), ou seja, indivíduos com relato de mais que 6 dias de sintomas da doença tiveram maiores níveis de PMPs quando comparado com aqueles com um menor tempo. Além disso, observou-se uma correlação negativa entre os níveis de PMPs e o número

de episódios prévios de malária, ou seja, quanto mais episódios de malária o indivíduo relatou, menor foi a frequência de PMPs no plasma (Análises de regressão linear: $\beta = 0,07$, $p < 0,003$) (Figura 5C). Entretanto, nenhuma associação foi encontrada entre os níveis de PMPs e os dias desde o último episódio de malária (Figura 5D).

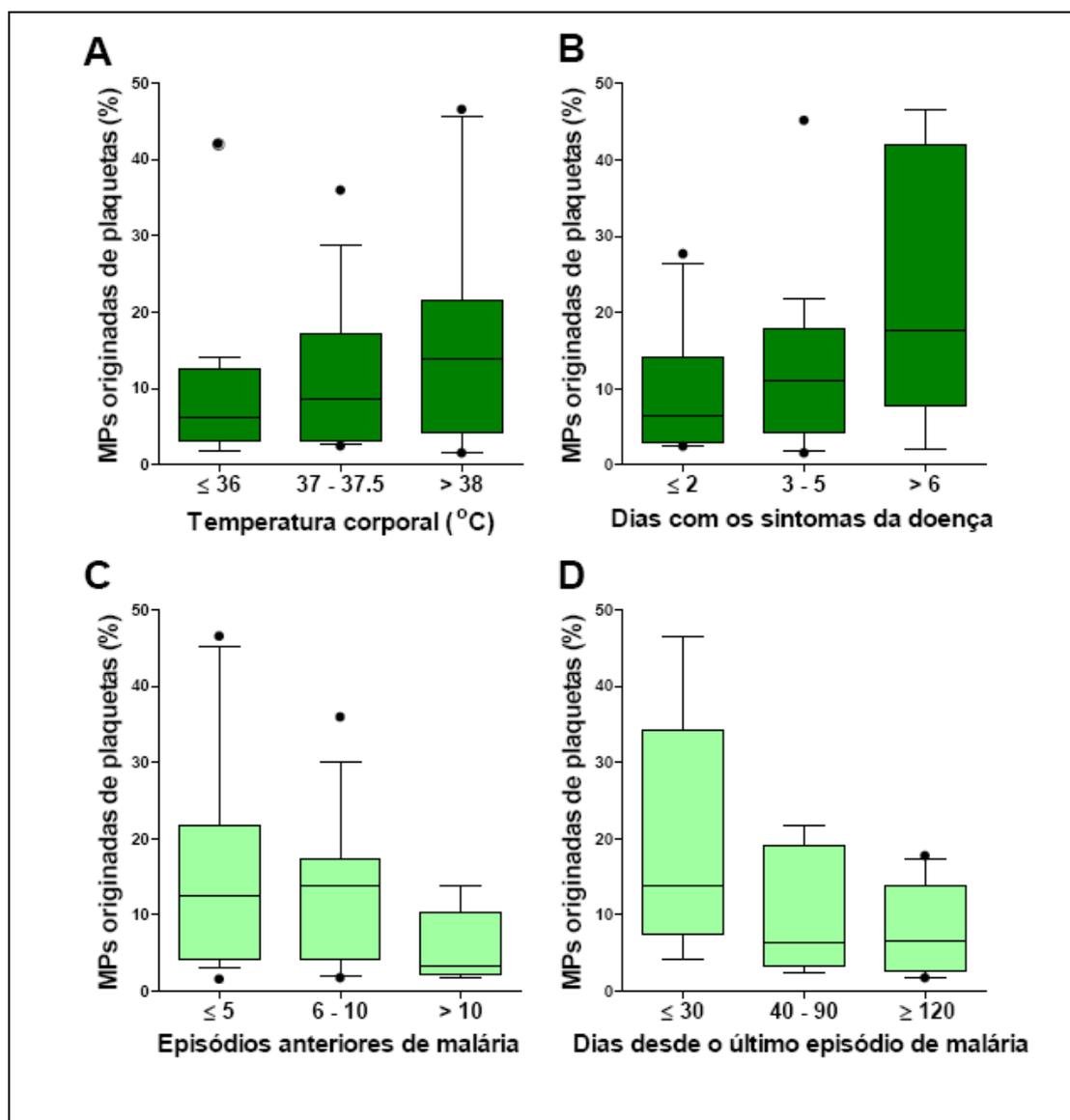


Figura 5: Associação das PMPs com a morbidade na malária aguda causada pelo *P. vivax*. Os indivíduos infectados pelo *P. vivax* foram categorizados de acordo com a temperatura corporal (A), com os dias apresentando os sintomas da doença (B), com o número de episódios anteriores de malária (C) e com os dias desde o último episódio de malária (D). As caixas representam a mediana e o intervalo interquartil. Os dados foram transformados em logaritmo neperiano antes da análise de regressão linear. O valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

É importante ressaltar que embora os sintomas de malária aguda avaliados neste trabalho possam ser influenciados por fatores como idade do paciente e número de episódios de malária anterior, análises multivariadas de regressão linear, que excluíram a influência desses fatores, confirmaram uma associação independente entre febre, dias com sintoma de malária aguda e níveis de PMPs ($p < 0,001$). A avaliação das EMPs e LMPs não mostrou associação com nenhum dos parâmetros analisados (dados não mostrados).

5.1.4 AVALIAÇÃO DAS MPS ANTES E APÓS O TRATAMENTO ANTIMALÁRICO

Em 5 indivíduos infectados pelo *P. vivax*, foi possível avaliar os níveis de MPs no plasma antes (tempo 0) e 7 e 21 dias após o tratamento com antimaláricos. Os resultados mostraram que no 7º dia de tratamento os níveis de MPs permaneceram semelhantes aqueles encontrados antes do tratamento (dados não mostrados). Entretanto, os níveis de todas as MP do plasma estudadas (PMPs, EMPs e LMPs) diminuem após o 21º dia de tratamento (Figura 6). Entretanto esta redução só foi significativa para as MP de origem plaquetária ($p = 0,0043$).

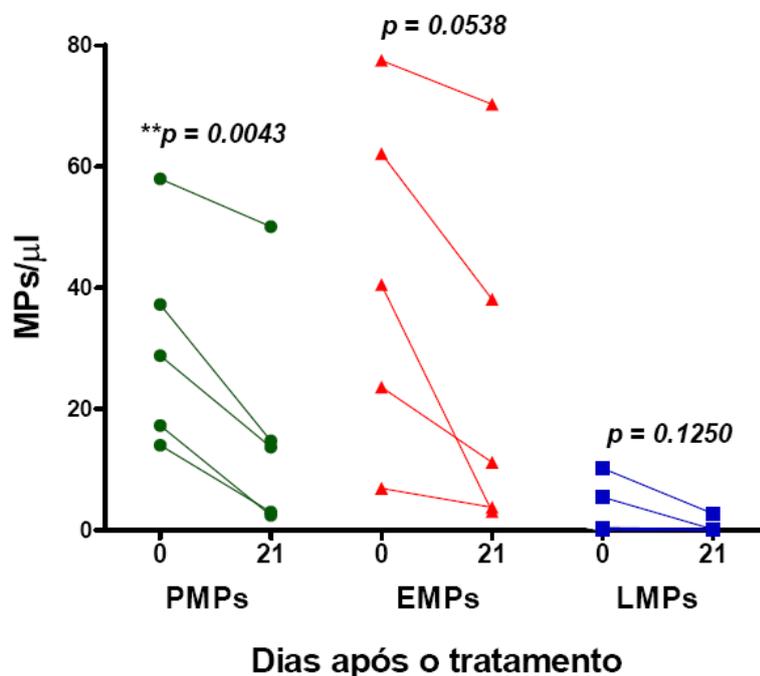


Figura 6: Avaliação das MPs antes e após o tratamento antimalárico. Os níveis plasmáticos de MPs de plaquetas, eritrócitos e leucócitos foram quantificados no plasma de 5 indivíduos com malária aguda por *P. vivax* antes (tempo 0) e após (21 dias) o tratamento. O valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

5.2 ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES (CNAs) NO PLASMA DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *P. vivax*

Os resultados referentes ao estudo dos CNAs foram recentemente publicados (Franklin *et al.*, 2011) e o artigo foi incluído no ANEXO 8.2.2 desta tese (pagina 105).

5.2.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CNAs NO PLASMA DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *P. vivax*

Os níveis de CNAs foram quantificados no plasma dos pacientes infectados pelo *P. vivax* através de duas metodologias diferentes, o PCR em tempo real (qPCR) e a metodologia do *PicoGreen*. No qPCR amplificou-se o gene de cópia única da telomerase humana (hTERT) e no *PicoGreen* foram quantificados os níveis totais de DNA dupla fita (dsDNA).

No qPCR, os resultados foram analisados através do *cycle threshold* (δ Ct), que é o limiar de detecção (número mínimo de ciclos necessários para detecção da fluorescência resultante da amplificação da hTERT). Diante disso, os resultados do qPCR mostraram que os Cts correspondentes aos CNAs dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* foram significativamente menores (média de $28,6 \pm 1,5$) quando comparado aos Cts dos indivíduos saudáveis (média de $31,5 \pm 0,79$) ($p < 0,0001$) (Figuras 1A e 1C, ANEXO 8.2.2, pagina 106). Como a quantidade de DNA teoricamente é duplicada a cada ciclo durante a fase exponencial da PCR, estes resultados sugerem que os níveis de CNAs nos indivíduos infectados pelo *P. vivax* são pelo menos oito vezes maiores que nos indivíduos saudáveis. Essa diferença foi confirmada quando foi feita uma curva padrão construída a partir da diluição seriada de uma amostra amplificada da sequência da hTERT, onde a concentração de CNAs no plasma dos pacientes foi de 1,278 pg/mL quando comparada a concentração de 0,1098 pg/mL dos indivíduos saudáveis, (dados não mostrados). Ou seja, houve um aumento de 11,6 vezes nos níveis de hTERT nos indivíduos infectados pelo *P. vivax* em relação aos não infectados. Para normalizar a quantidade de CNAs purificada do plasma utilizadas nos experimentos de qPCR, 5 ng de DNA de esperma de salmão foram adicionados às amostras de plasma antes da purificação dos CNAs (Figura 1B, ANEXO 8.2.2, pagina 106). Os resultados mostraram que a sequência específica do DNA de esperma de salmão foi igualmente amplificada nos plasmas dos pacientes infectados e dos indivíduos saudáveis ($p = 0,6925$) (Figura 1B e 1C, ANEXO 8.2.2, pagina 106).

O aumento dos níveis de CNAs total nos plasmas dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* foi confirmado pela quantificação do dsDNA com o reagente PicoGreen ($1494,7 \pm 1169,7$ nos paciente X $689,03 \pm 131,54$ ng/mL nos indivíduos saudáveis) ($p < 0,0001$) (Figura 1D, ANEXO 8.2.2, pag 106).

5.2.2 ANÁLISE DOS CNAs EM FUNÇÃO DA MORBIDADE DA MALÁRIA POR *P. vivax*

Para investigar o potencial dos CNAs como biomarcadores para a morbidade na malária por *P. vivax*, os níveis de CNAs foram comparados no plasma de indivíduos infectados com diferentes manifestações clínicas e pontuados de acordo com os parâmetros clínicos e hematológicos (escore clínico) (Tabela 2, ANEXO 8.2.2, pagina 110). A Figura 2A (ANEXO 8.2.2, pagina 107) ilustra a amplificação por qPCR da seqüência genômica hTERT no plasma de quatro indivíduos infectados pelo *P. vivax* e quatro indivíduos saudáveis. Foram observadas mudanças nos Cts do gene da hTERT a medida que o escore clínico aumentava. Além disso, níveis significativamente maiores de CNAs foram encontrados no plasma de indivíduos que apresentaram febre no momento da coleta de sangue, em comparação com amostras de plasma de indivíduos sem febre. Essa diferença pode ser vista pelas duas metodologias utilizadas no nosso estudo: qPCR utilizando hTERT ($p= 0,0376$) e PicoGreen ($p= 0,0023$) (Figura 2B, ANEXO 8.2.2, pagina 107). Para confirmar se os níveis de CNAs refletem a morbidade da doença, a soma dos pontos atribuídos a cada paciente (escore clínico) foi plotada contra os níveis de CNAs detectados no plasma com a metodologia de PicoGreen e contra o limite de detecção (Ct) visto através da amplificação da seqüência genômica do gene hTERT por qPCR (Figura 2C, ANEXO 8.2.2, pagina 107). Foi encontrada uma significativa correlação positiva moderada (r de Spearman= $0,4795$, $p= 0,0324$) entre os níveis de CNAs e a gravidade da malária. Estes dados foram confirmados por uma correlação negativa muito forte entre o Ct da seqüência do gene hTERT e os níveis de CNAs (r de Pearson= $-0,7111$, $p= 0,0004$) (Figura 2C, ANEXO 8.2.2, pagina 107).

5.2.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CNAs EM FUNÇÃO DOS NÍVEIS PLAQUETÁRIOS DURANTE A MALÁRIA AGUDA

Como as plaquetas parecem estar envolvidas na patogenia da malária, investigou-se aqui se os níveis de CNAs estavam associados à trombocitopenia e/ou outros parâmetros hematológicos tais como contagem de eritrócitos, níveis de HB e HTC, hemoglobina corpuscular média (MHC) e volume médio de plaquetas (MPV). Entre todos os parâmetros avaliados, encontrou-se uma forte correlação negativa (r de Spearman = -0,6451, p = 0,0021) entre os níveis de CNAs (quantificados por *PicoGreen*) e a contagem de plaquetas (Figura 3A, ANEXO 8.2.2, página 108). Estes resultados foram confirmados quando os Cts obtidos pela amplificação do gene hTERT por qPCR foram plotados contra os níveis de plaquetas (r de Pearson = 0,6479, p = 0,0027) (Figura 3B, ANEXO 8.2.2, página 108).

5.2.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CNAs ANTES E APÓS O TRATAMENTO ANTIMALÁRICO

Em seis indivíduos infectados pelo *P. vivax* os níveis de CNAs foi posteriormente avaliado sete dias após o tratamento. Como mostrado na figura 4A (ANEXO 8.2.2, página 108), os níveis de CNAs diminuíram após o tratamento quimioterápico anti-malárico (p = 0,0428). Esses resultados foram confirmados quando foram comparados os Cts obtidos da amplificação do gene hTERT por qPCR antes e após o tratamento (p = 0,0243) (Figura 4B, ANEXO 8.2.2, página 108). Além disso, a contagem de plaquetas foi normalizada no sétimo dia após o tratamento, observando-se uma diferença significativa antes e após o tratamento (p = 0,0024) (Figura 4C, ANEXO 8.2.2, página 108).

5.2.5 ANÁLISE DE CNAs DE *P. vivax* NO PLASMA DE INDIVÍDUOS COM MALÁRIA

Para determinar se sequências genômicas de *P. vivax* estavam presentes entre os CNAs dos pacientes com malária, analisou-se os níveis de CNAs originados de *P. vivax*. Como esperado, a amplificação desta sequência genômica não foi detectada em amostras de indivíduos não infectados (Figura 5A, ANEXO 8.2.2, página 109). Embora os níveis específicos de CNAs do parasita tenham sido associados com a presença de febre no momento da coleta de sangue (Figura 5B, ANEXO 8.2.2, página 109), nenhuma associação

significativa entre CNAs do parasita e escore clínico da doença ($r = -0,3604$, $p = 0,2056$) (Figura 5C, ANEXO 8.2.2, página 109). Além disso, os CNAs do parasito não foram correlacionados com a parasitemia periférica do paciente ($r = -0,3735$, $p = 0,1884$).

5.3 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GENES DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Em uma segunda parte do estudo, investigou-se a possível associação entre morbidade por *P. vivax* e polimorfismos genéticos em genes humanos relacionados à resposta imune e à função plaquetária.

5.3.1 VARIABILIDADE NO MICROSSATÉLITE: MIF-794 (CATT)₅₋₈

5.3.1.1 IDENTIFICAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR ELETROFORESE CAPILAR E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS MIF-794 (CATT)₅₋₈ NA POPULAÇÃO ESTUDADA.

Neste estudo optou-se por otimizar o protocolo descrito por (Baugh *et al.*, 2002) . Para isto, foram feitas algumas alterações no protocolo original, conforme descrito anteriormente (materiais e métodos), e a partir dessas modificações, foram identificadas as melhores condições de amplificação. O resultado da amplificação da região -794 (contendo o polimorfismo CATT₅₋₈) gerou como esperado um fragmento de cerca de 350 pb (dados não mostrados). O tamanho exato dos fragmentos foi determinado através da eletroforese capilar utilizando um dos iniciadores fluorescentes e analisados no sequenciador automático de DNA.

A figura 7 ilustra o resultado da genotipagem de dois pacientes, sendo cada um deles portador de um genótipo diferente. Analisando-se o gráfico na figura 3A observa-se a presença de apenas um pico na região correspondente ao tamanho de 345,5 bp equivalente ao alelo contendo 6 unidades do microsatélite CATT, o que indica ser um paciente homozigoto (genótipo 6,6). Por outro lado, a figura 4B apresenta dois picos nas regiões correspondentes a 341,6 e 345,6 bp referentes a presença de 5 e 6 cópias da unidade repetitiva (CATT) respectivamente, o que revela ser um paciente heterozigoto (genótipo 5,6).

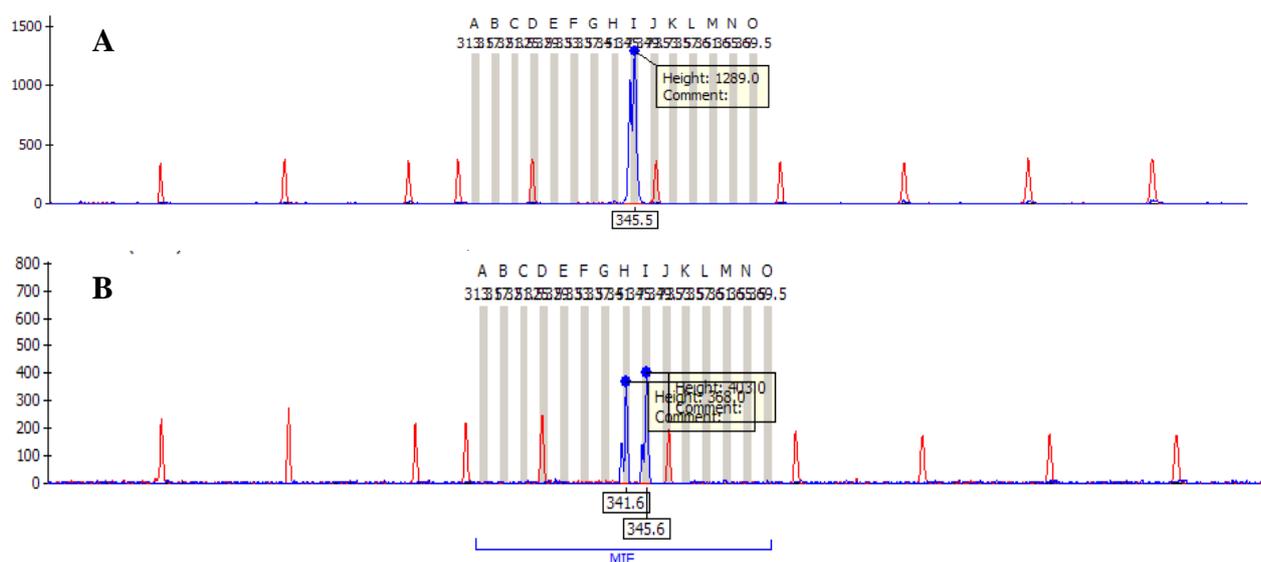


Figura 7: Genotipagem do polimorfismo repetitivo do gene MIF-794 (CATT)₅₋₈ em dois pacientes infectados por *P. vivax*. (A) paciente homocigoto para o alelo 6-CATT (genótipo 6,6) e (B) heterocigoto portador dos alelos 5-CATT e 6-CATT (genótipo 5,6).

A genotipagem por eletroforese capilar para a análise do polimorfismo de microssatélite do gene MIF-794 (CATT)₅₋₈ foi realizada em 173 indivíduos infectados pelo *P. vivax*.

A distribuição dos diferentes genótipos do gene MIF-794 (CATT)₅₋₈ nos pacientes infectados pelo *P. vivax* é mostrada na tabela 5. O genótipo mais frequente na população infectada foi o -794 (CATT)_{6,6} (42%), seguido pelo -794 (CATT)_{5,6} (24%). A frequência do genótipo -794 (CATT)_{6,7} foi de 15% e o genótipo menos frequente foi o -794 (CATT)_{6,8} (2%). Agrupando os genótipos quanto a presença ou não do aumento no número de unidades repetitivas (considerando 5 repetições o número selvagem), podemos observar que os indivíduos que possuem apenas o alelo 5 constituem 38% da população e a maioria dos indivíduos possuem pelo menos um alelo com mais de 5 repetições.

Análises estatísticas preliminares mostraram que não houve associação entre o número de repetições CATT com os parâmetros clínicos e hematológicos analisados ($p > 0,5$), ou seja, os polimorfismo de tamanho observados neste locus não se relacionaram com a aspectos da malária clínica. Entretanto, apesar do nosso banco de dados contar com somente 2 indivíduos

que apresentavam anemia severa ($Hb \leq 7$ e $HTC \leq 20$), os mesmos eram portadores de genótipos associados a uma maior produção de MIF, ou seja dois alelos com mais de 5 repetições ($>5, >5$).

Tabela 5- Frequências dos genótipos e alelos MIF-794 (CATT)₅₋₈

MIF -794 genótipos	Frequência, n° (%)
5,5	13 (7,5)
5,6	42 (24)
5,7	11 (6,5)
6,6	74 (42)
6,7	26 (16)
6,8	3 (1,7)
7,7	4 (2,3)
Total	173 (100)
MIF -794 alelos	
5	79 (22,8)
6	219 (63)
7	45 (13,4)
8	3 (0,8)
Total	346

5.3.2 ANÁLISES DO POLIMORFISMO G-173C NO GENE MIF

5.3.2.1. IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA G-173C POR PCR-RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS MIF G-173C NA POPULAÇÃO ESTUDADA E ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS

As reações de PCR foram feitas de acordo com o protocolo estabelecido por (Donn *et al.*, 2001). A amplificação gerou um fragmento de 268 pb em todos os indivíduos infectados pelo *P. vivax*. A figura 8 ilustra o resultado obtido da reação de PCR- RFLP em gel de poliacrilamida 10% com pacientes infectados pelo *P. vivax*, analisando o polimorfismo na posição -173 do promotor do gene codificador do MIF.

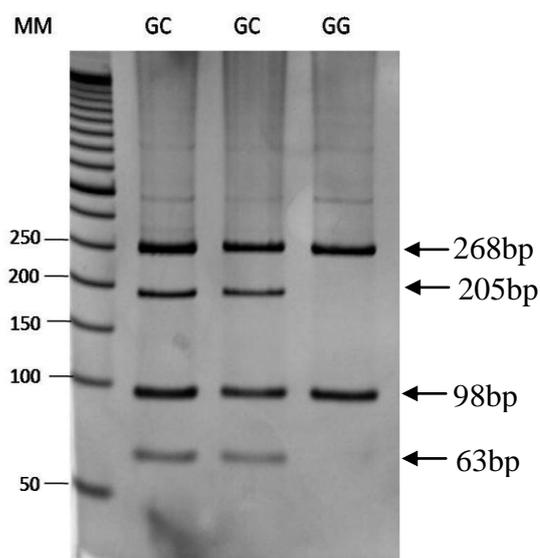


Figura 8: Resultado da reação de PCR- RFLP correspondente ao produto da digestão da enzima *AluI* na região do promotor do gene MIF G-173C em amostras de 3 indivíduos infectados com *P. vivax*. Indivíduos 1 e 2 apresentam genótipo GC (presença da mutação). O indivíduo 3 pertence ao genótipo GG (ausência da mutação). Gel de poliacrilamida 10% corado pela prata. (MM= Marcador de peso molecular de 50 pb).

Indivíduos infectados pelo *P. vivax* (n= 173) foram genotipados para o polimorfismo G-173C no gene MIF. Destes, 88 (51%) apresentaram o genótipo GG, 75 (43%) o genótipo GC e 10 (6%) o genótipo CC. Baseado em estudos prévios que mostram a associação entre a presença da mutação neste locus com a susceptibilidade a várias doenças inflamatórias, os indivíduos infectados pelo *P. vivax* foram estratificados em função dos níveis de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, temperatura corporal (presença ou ausência de febre) e número de dias com sintomas de malária aguda. Testes estatísticos mostraram que não houve associação entre as frequências dos genótipos obtidos para este locus com os parâmetros laboratoriais analisados (dados não mostrados). Entretanto, quando analisamos a distribuição dos alelos G-173C MIF em relação às taxas de hematócrito, verificamos a existência de uma correlação linear entre a frequência dos indivíduos que apresentam a mutação G-173C MIF e as menores taxas de hematócrito (Figura 9) (χ^2 de tendência= 5,4, p= 0,019).

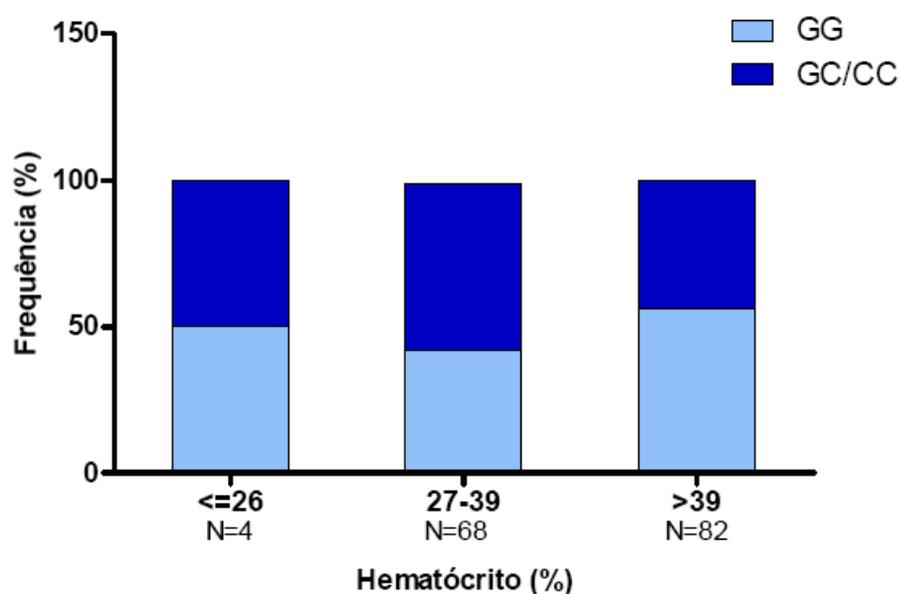


Figura 9: Distribuição da frequência alélica do gene MIF G-173C nos indivíduos infectados pelo *P. vivax* em função do hematócrito. χ^2 de tendência= 5,4, p= 0,019.

Análises subseqüentes demonstraram que indivíduos que possuem pelo menos um alelo mutado apresentaram níveis médios de Hb e de HTC no sangue menores do que os indivíduos que possuem apenas o alelo selvagem (p= 0,03 e p= 0,01 respectivamente, teste de Mann-Whitney) (Tabela 6). Além disso, houve uma fraca associação negativa entre os níveis de Hb (r de Spearman= -0,2057, p= 0,0105) e as taxas de HTC (r de Spearman= -0,1782, p= 0,0270) com a presença da mutação MIF G-173C (dados não mostrados).

Tabela 6- Comparação dos níveis de hemoglobina e hematócrito nos indivíduos sem (GG) e com a mutação (GC/CC) do gene MIF G-173C.

	Genótipo			p*
	GG (N= 88)	GC (N=75)	CC (N=10)	
Hemoglobina	13,19	12,7	11,78	0,024
Hematócrito	39,5	38	35	0,003

*As diferenças nas médias entre os grupos foram analisadas pelo teste *Mann Whitney*. O valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

Em resumo, os resultados mostraram que os indivíduos que apresentam pelo menos um alelo contendo a mutação G-173C no gene MIF possuem níveis mais baixos de hemoglobina e hematócrito, o que sugere uma associação entre este polimorfismo e à anemia na malária por *P. vivax*.

5.3.3 HAPLÓTIPOS DO GENE MIF DO HOSPEDEIRO E ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS

Para avaliar o efeito das interações entre o polimorfismo nos loci -794 (microsatélite) e -173 (SNP) do gene MIF e a susceptibilidade/resistência à malária, foram construídos os haplótipos. O haplótipo 6G, que é a interação entre 6 repetições do polimorfismo de microsatélite (CATT₆) com o alelo G (não mutado), foi o haplótipo mais freqüente (55,4%) e o menos freqüente foi o 8G (< 1%) (Tabela 7). Analisou-se ainda o desequilíbrio de ligação (DL) entre estes dois loci estudados no gene MIF. Os resultados mostraram um forte DL entre os lócus, o que sugere que a combinação entre estes dois alelos ocorre mais frequentemente do que o esperado através da formação aleatória dos haplótipos.

Tabela 7- Distribuição dos haplótipos MIF-794/-173 na população estudada.

Haplótipos MIF -794/-173	Frequência dos haplótipos, no. (%)
5G	51 (17,5)
5C	19 (6,5)
6G	162 (55,5)
6C	18 (6,1)
7G	5 (1,7)
7C	34 (11,6)
8G	1 (0,3)
8C	2 (0,8)
Total	292 (100)

Para determinar se os haplótipos MIF -794/-173 estão associados com os parâmetros clínicos e hematológicos na malária, investigou-se as relações entre os diferentes haplótipos encontrados e as variáveis estudadas. Diante disso, estratificou-se a população estudada de acordo com os níveis de Hb, HTC, plaquetas, leucócitos e tempo com sintomas de malária aguda (em dias). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a frequência dos haplótipos e os diferentes parâmetros analisados. Entretanto, observou-se que a frequência dos indivíduos que possuem o haplótipo 6G (sem a presença da mutação) foi maior entre o grupo sem anemia e do haplótipo 7C (com a mutação) maior entre o grupo com anemia (Figura 10), apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa.

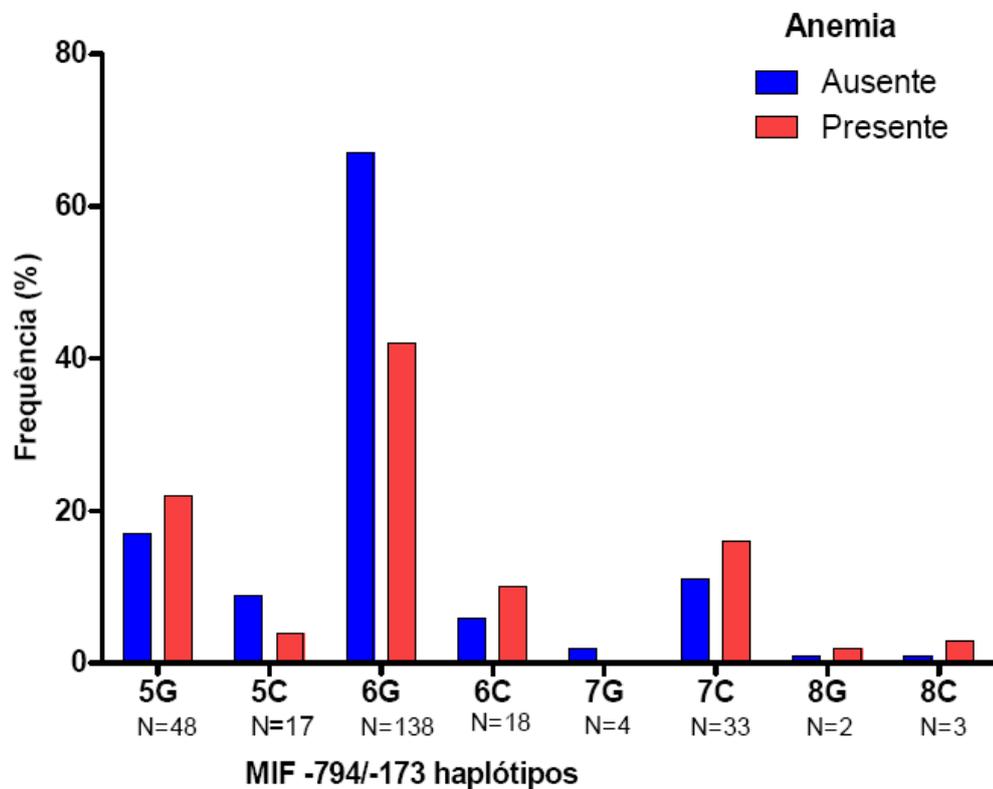


Figura 10: Associação entre os haplótipos MIF -794/-173 e presença de anemia ($Hb \leq 12$ g/dL, $HTC \leq 35$ %) nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*. Os haplótipos foram construídos com auxílio do programa PHASE e as frequências de cada haplótipo nos indivíduos com e sem anemia estão expressas em porcentagem. As diferenças entre as frequências nos dois grupos foi comparada pelo teste χ^2 .

Observou-se ainda que indivíduos portadores do haplótipo 6G apresentaram maiores níveis médios de Hb e taxas de hematócrito do que indivíduos do haplótipo 7C ($p = 0,0158$ e $p = 0,01$ respectivamente, teste de Mann-Whitney) (dados não mostrados).

Análises adicionais utilizando o modelo de regressão logística, que levou em consideração variáveis de confusão como a idade e o sexo, mostraram que indivíduos com o haplótipo 7C tem 6x mais chance de terem anemia do que indivíduos com os outros haplótipos ($p < 0,0001$, 95% IC: 3,32-10,9). Por outro lado, indivíduos com o haplótipo 6G tem uma chance menor (0,3 *versus* 1) de terem anemia quando comparado com indivíduos de outros haplótipos ($p < 0,0001$, 95% IC: 0,18-0,52).

5.3.4 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DO GENE TNF- α

5.3.4.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS GENES TNF- α T-1031C E TNF- α G-308A E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS TNF- α NA POPULAÇÃO ESTUDADA EM FUNÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS

Com o objetivo de verificar se os polimorfismos na região do promotor do gene TNF- α (TNF T-1031C e TNF G-308A) estão associados com os parâmetros clínicos e hematológicos na malária causada pelo *P. vivax*, esses polimorfismos foram genotipados na população estudada. A amplificação da região -1031 do gene gerou um fragmento de 264 pb, enquanto que da região -308, um fragmento de 196 pb. A figura 11A ilustra o resultado obtido da reação de PCR- RFLP após a digestão com a enzima *NcoI* para o polimorfismo no promotor G-308A do gene do TNF- α . A figura 11B ilustra os resultados para o polimorfismo T-1031C referentes ao mesmo gene.

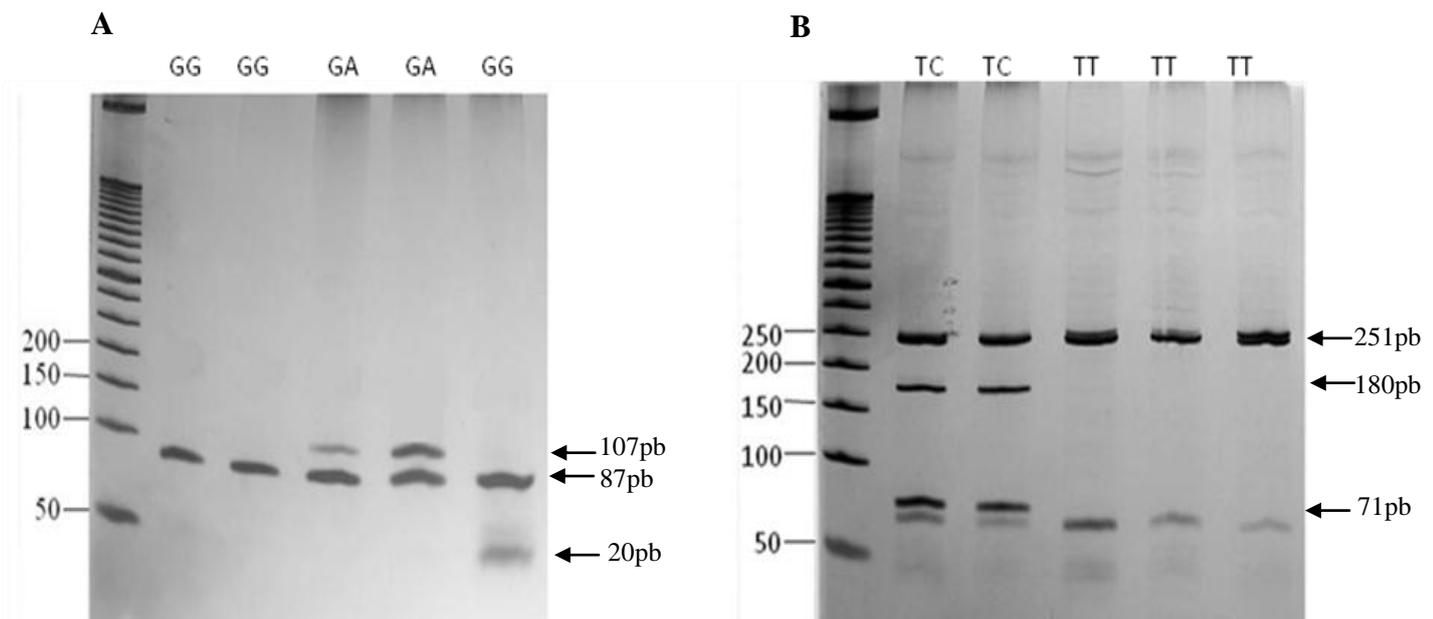


Figura 11: Resultado da reação de PCR- RFLP correspondente à digestão do produto da amplificação da região do promotor do gene TNF- α . Polimorfismo na posição G-308A (A) e na posição T-1031C (B) em amostras de 5 indivíduos infectados com *P. vivax*. A- Indivíduos 1, 2 e 5 são GG (ausência do alelo mutante A). Indivíduos 3 e 4 são GA (presença de um alelo mutante A) B- Indivíduos 1 e 2 são TC (presença do alelo mutante C) e indivíduos 3-5 são TT (ausência do alelo mutante C). Gel de poliacrilamida 10% corado pela prata. PM= Padrão de peso molecular de 100pb.

Neste estudo, foram genotipados 170 indivíduos para o gene TNF- α T-1031C. Destes, 105 (61%) apresentaram o genótipo TT, 65 (39%) apresentaram o genótipo TC e o genótipo CC não foi detectado na população estudada. Para o gene G-308A, foram genotipados 153 indivíduos, sendo 78 (51%) portadores do genótipo GG, 74 (48%) do genótipo GA e 1 (0,6%) do genótipo AA. Os indivíduos infectados pelo *P. vivax* foram estratificados em função dos níveis de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, temperatura corporal (presença ou ausência de febre). Em relação ao polimorfismo TNF- α T-1031C, testes estatísticos mostraram que houve associação entre as frequências do polimorfismo com a temperatura corporal (Figura 12). Quando analisamos a distribuição dos alelos TNF- α T-1031C em relação a presença ou ausência de febre, verificamos que a frequência dos indivíduos que apresentam a mutação é maior quando a temperatura é maior ($> 38^{\circ}\text{C}$) ($p=0,030$).

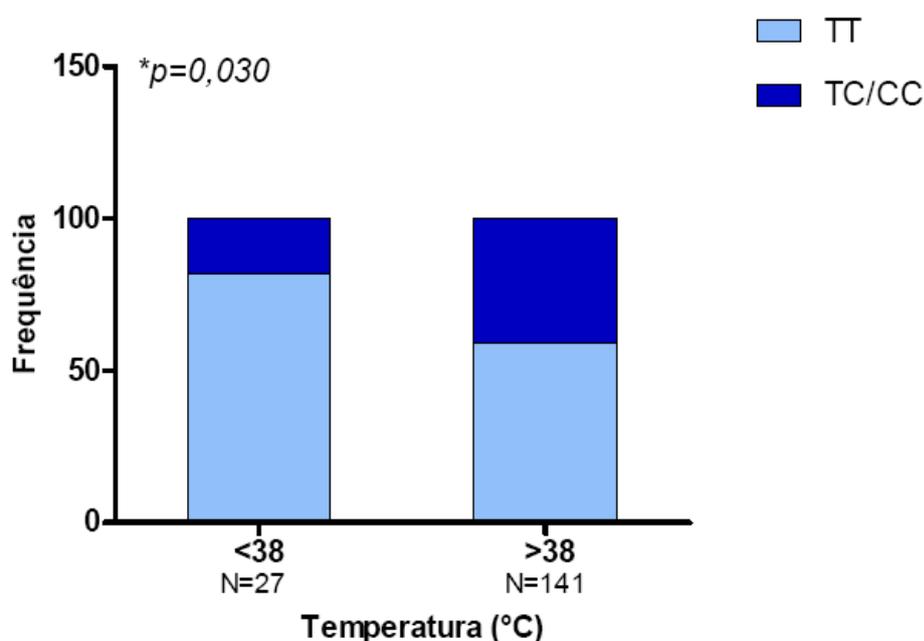


Figura 12: Distribuição da frequência alélica do polimorfismo TNF- α T-1031C na amostra estudada. Os indivíduos infectados pelo *P. vivax* ($n=171$) foram categorizados em função da presença ou ausência de febre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$).

No que diz respeito ao polimorfismo TNF- α G-308A, observou-se o efeito contrário, isto é, a frequência do genótipo mutado A foi maior entre os indivíduos sem febre, quando comparado ao grupo com febre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) ($p=0,0001$) (Figura 13A). Nas análises de níveis de plaquetas, também foi observado efeito semelhante, pois a presença da mutação parece proteger contra a trombocitopenia severa (plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$) (Figura 13B). Observou-

se uma fraca associação negativa entre o escore clínico e a presença da mutação TNF- α G-308A (r de Spearman= -0,2, $p= 0,01$) (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a mutação TNF- α T-1031C parece estar relacionada a uma maior susceptibilidade a presença de febre, enquanto a mutação TNF- α G-308A parece estar relacionada à diminuição temperatura e níveis de plaquetas. Para os outros parâmetros analisados, não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa para nenhum dos dois polimorfismos (dados não mostrados).

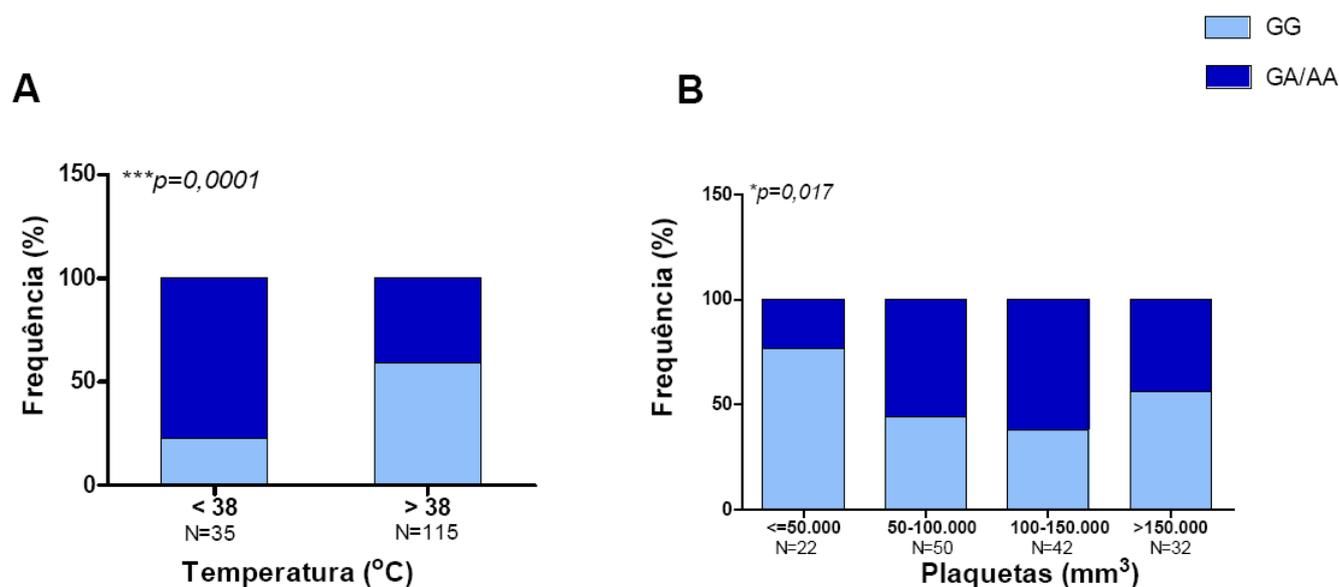


Figura 13: Distribuição da frequência dos alelos TNF- α -G308A na amostra estudada. Os indivíduos infectados pelo *P. vivax* ($n= 154$) foram categorizados em função da presença de febre ($\ge 38^{\circ}\text{C}$) (A) e dos níveis de plaquetas (B). Diferença nas frequências entre os grupos foi comparada pelo teste de χ^2 .

5.3.5 HAPLÓTIPOS DO GENE TNF- α E ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS

Para avaliar o efeito das interações entre os polimorfismos presentes nos loci -308 e -1031 do gene TNF- α e a susceptibilidade/resistência à malária clínica, haplótipos envolvendo esses dois loci foram construídos. O haplótipo mais freqüente na população estudada foi o 308G:1031T (60%) e o menos freqüente foi o 308G:1031C (18%) (Tabela 8). A distribuição

da frequência dos haplótipos foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Análises de desequilíbrio de ligação mostraram que não houve desequilíbrio entre os dois loci.

Tabela 8- Distribuição dos haplótipos TNF 308:1031 na população estudada.

TNF -308/-1031 haplótipos	Frequência (%)
TA	55 (22)
TG	149 (60)
CG	44 (18)
Total	248 (100)

Nas análises subsequentes, a associação dos 3 diferentes haplótipos TNF 308:1031 com os parâmetros clínico e hematológicos estudados neste trabalho. Os resultados mostraram que a frequência dos indivíduos portadores do haplótipo 308G:1031T foi maior entre os indivíduos com trombocitopenia e que a frequência do haplótipo 308A:1031T foi maior entre os indivíduos sem trombocitopenia (Figura 14). Além disso, indivíduos portadores do haplótipo 308G:1031T apresentaram menores níveis médios de plaquetas no sangue, ao contrário dos indivíduos que possuem o genótipo 308A:1031T, que possuem níveis mais elevados de plaquetas ($p = 0,0338$ - teste de Mann-Whitney) (dados não mostrados). Utilizando o modelo de regressão logística, que eliminou a influência de variáveis de confusão (idade e sexo), verificou-se que indivíduos com o haplótipo 308G:1031T tem 2,3x mais chance ($p = 0,0145$, 95% IC: 1,22-4,36) de terem trombocitopenia do que indivíduos com os outros haplótipos. Já os indivíduos com o haplótipo 308A:1031T possuem uma chance menor de terem trombocitopenia quando comparado com indivíduos dos outros haplótipos ($p = 0,0235$, 95% IC: 0,20-0,84).

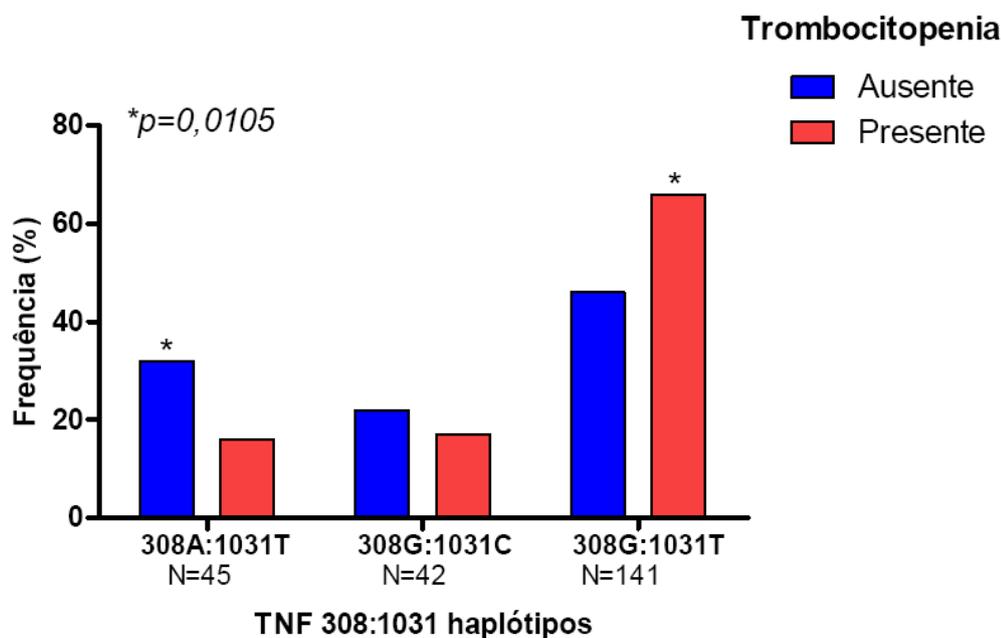


Figura 15: Frequência de a trombocitopenia nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*. Os haplótipos foram construídos com auxílio do programa PHASE e as frequências de cada haplótipo nos indivíduos com e sem trombocitopenia estão expressas em porcentagem. Diferenças nas frequências entre os grupos foram observadas pelo teste de χ^2 .

Em resumo, os resultados indicam que indivíduos carreadores do haplótipo 308A:1031T parecem ter certa proteção contra a trombocitopenia. Entretanto, os indivíduos carreadores do haplótipo mais freqüente (308G:1031T), a trombocitopenia não parece ser influenciada por esses polimorfismos do gene TNF- α .

5.3.6 ANÁLISE DO POLIMORFISMO G-1082A DO GENE IL-10

5.3.6.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS G-1082A NA POPULAÇÃO ESTUDADA

As reações de PCR foram feitas de acordo com (Koch *et al.* 2001). A amplificação por PCR gerou um fragmento de 377 pb em todos os indivíduos infectados pelo *P. vivax*. A figura 15 revela o resultado obtido por meio da reação de PCR- RFLP com a enzima *Eco*NI após a amplificação por PCR, para pacientes infectados pelo *P. vivax*, analisando o polimorfismo do gene IL-10 G-1082A.

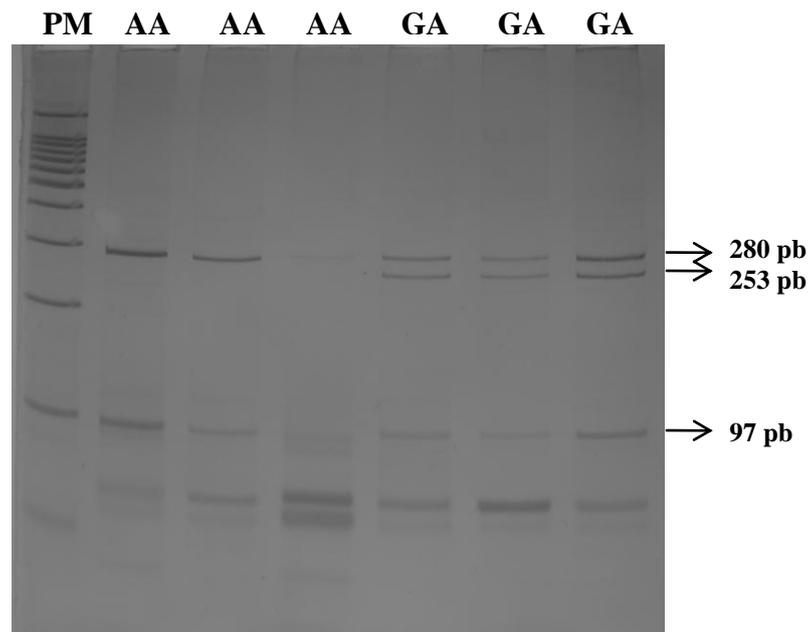


Figura 15: Resultado da reação de PCR- RFLP, correspondente ao produto da digestão da região onde se encontra o polimorfismo do gene IL-10 (G-1082A), para amostras de 6 indivíduos infectados pelo *P. vivax*. Os indivíduos 1, 2 e 3 apresentam genótipo AA, o que indica presença de mutação. Pacientes 4, 5 e 6 foram genotipados como GA. Gel de poliacrilamida 15% corado pela prata. (PM= Padrão de peso molecular de 100pb).

Cerca de 146 indivíduos foram genotipados para o polimorfismo IL-10 G-1082A. O genótipo mais freqüente foi o AA (57%), seguido pelo GA (39%), e GG (4%). Para a análise da distribuição genotípica do IL-10 G-1082A, os pacientes foram estratificados em função dos parâmetros clínicos e hematológicos analisados neste trabalho. Análises estatísticas não mostraram associação do polimorfismo com os parâmetros analisados. Entretanto, análises de correlação mostraram uma associação positiva entre os níveis de plaqueta no sangue e a presença do polimorfismo (r de Spearman= 0,23, $p= 0,0357$). Com relação aos demais parâmetros analisados, não foram observadas associações estatisticamente significativas (dados não mostrados).

5.3.7 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DO GENE TGF- β

5.3.7.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS TTGF- β C NA POPULAÇÃO ESTUDADA

Com o objetivo de analisar se os polimorfismos na região codificante do gene TGF- β estão relacionados com a os parâmetros clínicos, laboratoriais e hematológicos estudados, selecionamos a mutação na posição T869C, o que cria um sítio reconhecido pela enzima de restrição *MspA1I*. O resultado da reação de PCR correspondente ao produto de amplificação da região 869 gerou um produto correspondente ao tamanho de 207 pb. A figura 16 mostra o resultado obtido da reação de PCR- RFLP com pacientes infectados com *P. vivax*, analisando o polimorfismo T869C do TGF- β .

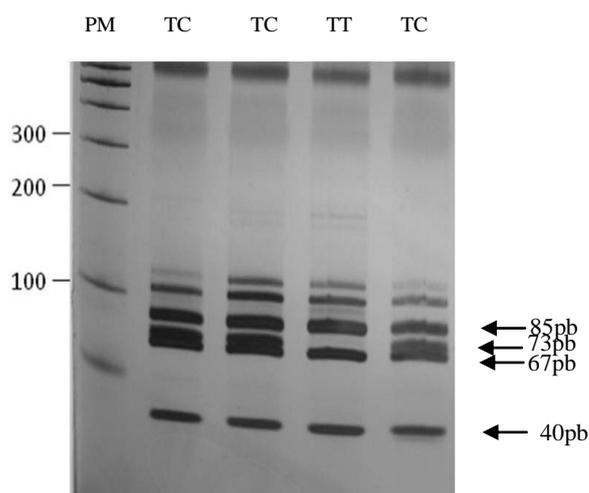


Figura 16: Resultado da reação de PCR- RFLP correspondente ao produto da digestão da região +869 do gene TGF- β em 4 amostras de indivíduos infectados com *P. vivax*. Indivíduos 1, 2 e 4 são TC (presença do alelo mutante C). Indivíduo 3 é TT (ausência do alelo mutante C). Gel de poliacrilamida 15% corado pela prata. (PM= Padrão de peso molecular de 100pb).

Para o gene da citocina antiinflamatória TGF- β foram realizadas as genotipagens e análises de 185 indivíduos infectados pelo *P. vivax*, sendo 34% do genótipo TT, 62% do genótipo TC e 3% do genótipo CC. Análises estatísticas não mostraram associação entre o polimorfismo estudado com os parâmetros clínicos analisados ($p > 0,05$).

É importante ressaltar que as análises de todos os genes acima mencionados foram realizadas levando-se em consideração a carga parasitária e os níveis de leucócitos, mas nenhuma associação foi encontrada entre a presença das mutações e os parâmetros analisados (dados não mostrados).

5.3.8 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DAS GLICOPROTEÍNAS DE PLAQUETAS GPIA/IIA C807T E GPIIB/IIIA C1565T

5.3.8.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR- RFLP E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS GPIA/IIA C807T E GPIIB/IIIA C1565T NA POPULAÇÃO DE ESTUDO

As reações de PCR foram baseadas no protocolo original de Jimenez *et al* (2008). A amplificação por PCR gerou um fragmento de 115 pb para o gene GPIa/IIa C807T e um de 266 pb para o gene GPIIb/IIIa C1565T em todas as amostras estudadas. A figura 17 revela o resultado obtido por meio da reação de PCR- RFLP, após digestão com as enzimas de restrição *TaqI* e *MspI* respectivamente, para pacientes infectados com *P. vivax*, analisando o polimorfismo do complexo GPIa/IIa C807T (figura 17A) e o polimorfismo do complexo GPIIb/IIIa C1565T (figura 17B).

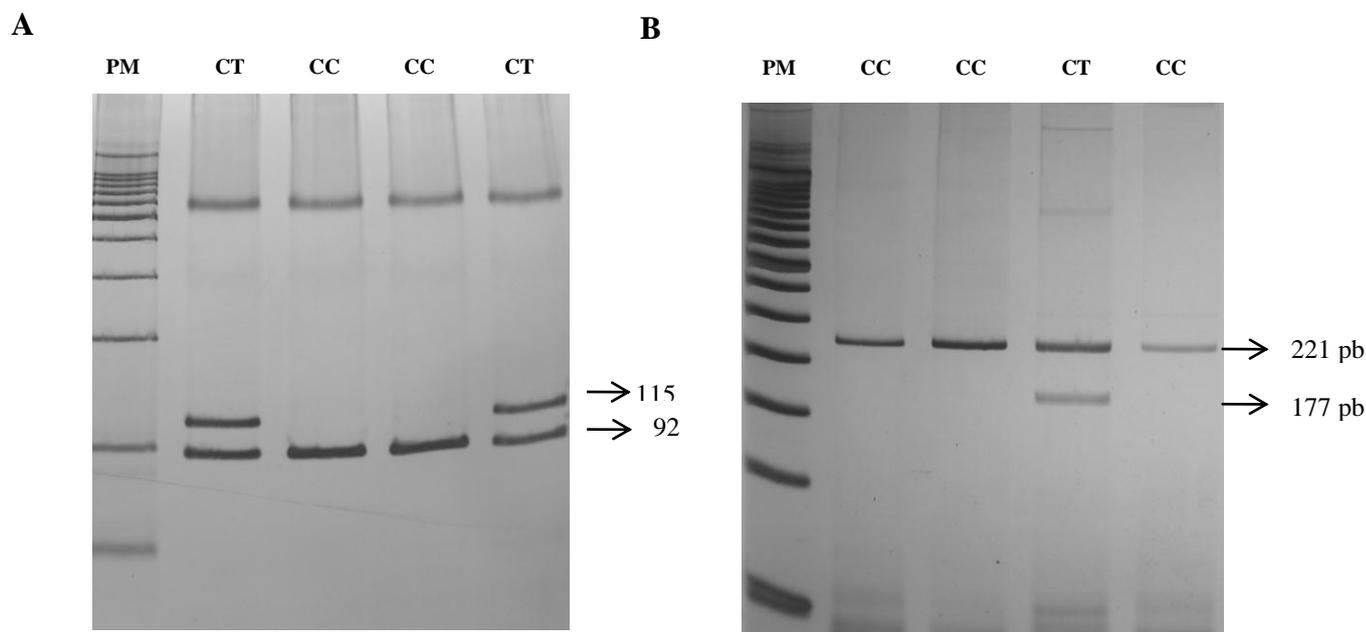


Figura 17: Resultado da reação de PCR- RFLP, correspondente ao produto da digestão da região onde se encontra o polimorfismo do complexo GPIa/IIa C807T (**A**) e GPIIb/IIIa C1565T (**B**) para amostras de 4 indivíduos infectados pelo *P. vivax*. **A-** indivíduos 2 e 3 apresentam genótipo CC, o que indica ausência de mutação. Indivíduos 1 e 4 foram genotipados como CT. **B-** indivíduo 3 apresenta genótipo CT, o que indica presença de mutação. Indivíduos 1, 2 e 4 foram genotipados como CC. Gel de poliacrilamida 15% corado pela prata. (PM= Padrão de peso molecular de 100pb).

173 indivíduos foram genotipados para os genes GPIa/IIa e GPIIb/IIIa. No que diz respeito ao gene GPIa/IIa, a distribuição dos genótipos foi de 36% CC, 54% CT e 9,1% TT. Para o gene GPIIb/IIIa, 82% dos indivíduos apresentaram o genótipo CC, 18% o genótipo CT e apenas 0,7% o genótipo TT. Para ambos os polimorfismos, os indivíduos infectados pelo *P. vivax* foram estratificados em função dos parâmetros clínicos e hematológicos estudados neste trabalho. Em relação ao polimorfismo GPIIb/IIIa C1565T, testes estatísticos mostraram que não houve associação do mesmo com nenhum dos parâmetros analisados (dados não mostrados). Para o gene GPIa/IIa C807T observou-se uma associação entre a presença do

polimorfismo e os níveis de plaqueta no sangue (Figura 18). Os resultados mostraram que houve uma tendência decrescente significativa entre a presença da mutação e os níveis de plaquetas ($p= 0,0166$, χ^2 de tendência= 5,74). Além disso, a média do número de plaquetas foi menor entre os indivíduos com a mutação quando comparado com aqueles sem a mutação ($p= 0,0471$ - teste de Mann-Whitney) (dados não mostrados). Análises de correlação mostraram que houve uma associação positiva fraca mas significativa entre o escore clínico e a presença da mutação GPIa/IIa C807T (r de Spearman= 0,2, $p= 0,01$) (dados não mostrados). Não foram encontradas associações entre a presença do polimorfismo GPIa/IIa C807T e os demais parâmetros analisados (dados não mostrados).

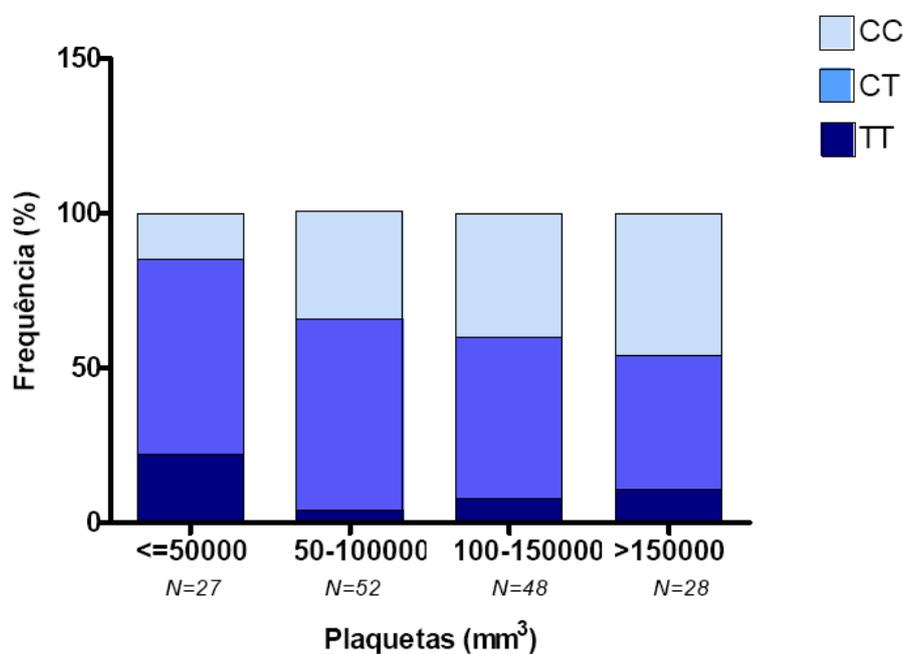


Figura 18: Distribuição da frequência dos genótipos GPIa/IIa C807T na amostra estudada. Os indivíduos infectados pelo *P. vivax* ($n= 173$) foram categorizados em função dos níveis de plaquetas.

Nossos resultados sugerem que o polimorfismo GPIa/IIa C807T pode estar associado à baixa de plaquetas nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*. A tabela 9 resume os principais achados relacionando-se os polimorfismos estudados e os parâmetros clínicos e hematológicos analisados neste trabalho.

Tabela 9- Principais associações encontradas entre os polimorfismos estudados e os parâmetros clínicos e hematológicos analisados.

Gene	Polimorfismo	Associação
MIF	-794 (CATT)5-8	Não encontrada
	G-173C	HB e HTC
TNF- α	T-1031C	Febre
	G-308A	Febre
IL-10	G-1082A	Plaqueta
GPIa/IIa	C807T	Plaqueta
GPIIb/IIIa	C1565T	Não encontrada
TGF- β	T869C	Não encontrada

6 Discussão

Os casos de malária grave por *P. vivax* tem sido descritos em todo o mundo, incluindo os casos de infecção por parasitos multi-resistente às drogas (Genton *et al.*, 2008; Tjitra *et al.*, 2008). No Brasil, estudos retrospectivos têm demonstrado também um agravamento da malária por *P. vivax* (Alexandre *et al.*, 2010). Diante disso, torna-se grande a importância de estudos que busquem contribuir para a compreensão dos aspectos patogênicos da malária causada pelo *P. vivax*. No presente trabalho, investigou-se os aspectos do hospedeiro vertebrado associados à morbidade da malária *vivax*. Mais especificamente pretendeu-se identificar marcadores potenciais de morbidade, bem como indivíduos geneticamente mais susceptíveis à malária clínica por *P. vivax*.

6.1 FATORES PLASMÁTICOS DA INFLAMAÇÃO QUE PODEM SER BIOMARCADORES DA MORBIDADE NA MALÁRIA POR *P. vivax*: MICROPARTÍCULAS E ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES

Inicialmente, pretendeu-se identificar biomarcadores potenciais de morbidade na malária *vivax*. Para isto, a contribuição de MPs foi estudada. As MPs, apesar serem originadas de processos fisiológicos, tem sido encontradas aumentadas em diferentes condições patológicas, principalmente processos e doenças inflamatórias e sistêmicas, sugerindo sua participação na patogênese destas doenças (Vasina *et al.*, 2010). Neste grupo de doenças inclui-se a malária por *P. falciparum*, onde as MPs tem sido associadas a patogenia (Combes *et al.* 2005). Assim, a hipótese de trabalho foi que as MPs poderiam estar presentes na malária por *P. vivax* sintomática. Os resultados encontrados demonstraram um aumento expressivo das MPs durante a malária aguda pelo *P. vivax*. De importância, demonstrou-se ainda que as MPs de diferentes origens celulares (leucócitos, plaquetas e hemácias) estavam aumentadas no plasma dos pacientes com *P. vivax*, o que sugere a participação de diferentes células ativadas nos processos inflamatórios induzidos durante a infecção pelo *P. vivax*.

Após demonstrar que as MPs estavam circulando no sangue dos pacientes infectados com o *P. vivax*, avaliou-se o papel das mesmas na morbidade da doença. Os resultados demonstraram que o aumento das micropartículas de plaquetas (PMPs) estava relacionado com algumas manifestações clínicas da doença, tais como febre e período de tempo com sintomas da doença aguda. Aqui, a presença de MPs no plasma durante a febre está de acordo com os achados de Wijesekera e colaboradores (1996) que mostraram que o paroxismo malárico por *P. vivax* está associado com alguns componentes plasmáticos de origem até

então desconhecida. De importância, Karunaweera e colaboradores (2007) sugeriram que tais componentes formariam agregados de leucócitos e poderiam ser constituídos de material particulado contendo lipídeos. Diante disso, acredita-se que as MPs possam fazer parte destes compostos particulados podendo contribuir para o paroxismo na malária por *P. vivax*. Um resultado interessante observado neste trabalho foi o aumento das MPs derivadas de leucócitos durante a malária aguda causada pelo *P. vivax*. O papel dos leucócitos na patogenia da malária ainda é pouco compreendido, entretanto, estas células são as principais produtoras de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α , que é uma citocina altamente pirogênica (Nyangoto, 2005). Sendo assim, a presença de MPs derivadas de leucócitos pode ser um indício do seu envolvimento na ativação da resposta inflamatória na malária por *P. vivax*. Entretanto, é importante ressaltar que o paroxismo malárico é um fenômeno complexo, que pode envolver vários fatores tais como a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α (Wijesekera *et al.*, 1996).

Embora o presente trabalho seja a primeira demonstração do envolvimento de MPs na morbidade da malária por *P. vivax*, as mesmas tem sido bem caracterizadas na malária por *P. falciparum*. Estudos recentes mostraram que as PMPs estão envolvidas na patogenia desta doença (Cox *et al.*, 2010). Na malária cerebral por *P. falciparum*, altos níveis de PMPs foram correlacionados com trombocitopenia e coma (Mfonkeu *et al.*, 2010). Acredita-se que as PMPs possam aumentar as complicações durante a malária cerebral contribuindo para o aumento da citoadesão de eritrócitos infectados ao endotélio do cérebro. Sendo assim, Mfonkeu e colaboradores (2010) sugeriram que as MPs podem ser um bom marcador biológico para a malária cerebral, e o bloqueio da sua produção pode ser um dos alvos terapêuticos contra o desenvolvimento desta forma mais grave da doença.

Baseado em evidências recentes de sequestro pelo *P. vivax* (Anstey *et al.*, 2007), poder-se-ia especular um papel das PMPs na adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio pulmonar. Por outro lado, um papel das PMPs na resposta inflamatória observada durante a infecção pelo *P. vivax* não pode ser descartado (Miller *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2010).

O presente trabalho mostrou o envolvimento das PMPs na malária aguda causada pelo *P. vivax*. Fato interessante observado no presente trabalho foi que os níveis de MPs circulantes diminuíram após o tratamento antimalárico específico. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar os mecanismos pelos quais as MPs possam estar envolvidas na patogenia da malária *vivax*. Além disto, este trabalho pode contribuir ainda para a busca de alternativas para o tratamento da malária por *P. vivax*, pois se nossa hipótese

estiver correta - micropartículas estão envolvidas na patogenia induzida pelo *P.vivax*, a modulação da vesiculação poderia representar uma nova perspectiva terapêutica no combate as complicações imunopatológicas da infecção causada pelo *P.vivax*. Sendo assim, mais estudos são necessários para confirmar se as PMPs podem atuar como biomarcadores ou mediadores da inflamação na malária *vivax*.

Na busca por biomarcadores plasmáticos na malária por *P. vivax*, investigou-se ainda se os ácidos nucleicos circulantes (CNAs) poderiam estar associados as manifestações clínicas da doença. O termo “ácidos nucleicos circulantes (CNAs)” se refere a segmentos de DNA ou RNA extracelulares encontrados na circulação sanguínea e que cujos níveis parecem diretamente associados à gravidade de várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral (AVC) (Rainer *et al.*, 2003), diabetes (Gahan *et al.*, 2008) e vários tipos de cânceres (Leon *et al.*, 1977; revisado por Fleischhacker and Schmidt, 2007). Os resultados aqui descritos demonstraram, pela primeira vez, que os níveis de CNAs dos pacientes infectados pelo *P. vivax* aumentavam com o espectro clínico da doença, ou seja, quanto maior as manifestações clínicas do paciente, maiores os níveis de CNAs detectados no plasma. Este fato foi confirmado por duas metodologias diferentes, o PicoGreen, que detecta os níveis de CNAs totais, e o PCR quantitativo em tempo real, quem tem como alvo um gene de cópia única humano (Transcriptase reversa telomerase humana- hTERT), que tem sido utilizado com sucesso nos estudos de câncer (Sozzi *et al.*, 2002). De fato, CNAs tem sido utilizados como uma ferramenta prognóstica não invasiva em diferentes processos e doenças (Jung *et al.*, 2004; Sozzi *et al.*, 2001; Ellinger *et al.*, 2008). Diante disso, acredita-se que este marcador de morbidade também possa ser utilizado nos casos de malária como um indicador sensível de inflamação.

Além das MPs e CNAs descritos aqui, outros fatores plasmáticos tem sido propostos como biomarcadores na malária por *P. vivax*, incluindo a enzima superóxido dismutase-1 (Andrade *et al.*, 2010). Estes autores demonstraram que os níveis da enzima foram associados com as manifestações clínicas desta doença. Entretanto, acredita-se que os CNAs constituem uma ferramenta mais sensível como biomarcadores de morbidade, uma vez que a amplificação do gene de cópia única humano hTERT, por PCR em tempo real, foi capaz de detectar níveis muito baixos (cerca de 100 fentogramas) de CNAs no plasma dos pacientes infectados pelo *P. vivax*.

Um achado interessante no presente trabalho foi que os níveis de CNAs correlacionaram com a trombocitopenia. De fato, após o tratamento antimalárico específico os níveis de CNAs no plasma retornaram aos valores normais. Diante disso, acredita-se que os

CNAs possam contribuir de alguma forma para a ativação plaquetária e para a inflamação na malária *vivax*, embora os dados apresentados aqui não sejam suficientes para se afirmar sobre as relações entre plaquetas e CNAs. Entretanto é importante ressaltar que no estudo de MPs feito pelo nosso grupo, foi mostrado que os níveis de micropartículas de plaquetas (PMPs) estão associados com o espectro clínico da doença, como febre e dias com sintomas. Diante disso, acredita-se que possa existir uma possível associação entre PMPs e CNAs. Além disso, alguns estudos mostraram que as MPs podem funcionar como carreadoras de ácidos nucleicos, hormônios e outros mediadores, sendo utilizadas com sucesso em protocolos de vacinação gênica (Anker e Stroun, 2002). A associação entre CNAs e MPs é principalmente relevante quando se considera seu potencial inflamatório para a ativação de TLR9 ou outros receptores de ácidos nucleicos durante a imunidade inata (Wu *et al.*, 2010).

Apesar da fonte dos CNAs ser desconhecida na malária *vivax*, pode-se apenas especular sobre sua origem. Alguns trabalhos mostraram que há três fontes principais de CNAs: apoptose, necrose e liberação ativa de células vivas (van der Vaart *et al.*, 2008). Sabe-se que a apoptose celular pode induzir a clivagem de moléculas de DNA em fragmentos pequenos, de até 180 pb em média. Diante disso, apesar dos estudos realizados aqui não poderem afirmar que a apoptose pode contribuir para a liberação de CNAs durante a malária, os pequenos fragmentos observados através da metodologia de PCR em tempo real não permitem descartar esta hipótese. Além do mais, análises de expressão gênica diferencial através da metodologia de microarranjo de DNA mostraram que, durante a infecção malárica aguda, tanto em modelos de malária experimental quanto em humanos, ocorre a expressão diferencial de genes relacionados a apoptose (Lovegorve *et al.*, 2007; Miu *et al.*, 2008). Mais recentemente, outros estudos sugeriram que a apoptose e a necrose podem não ser as principais fontes de CNAs no plasma de pacientes com outras infecções, sendo esta característica resultado da liberação ativa de células vivas (van der Vaart *et al.*, 2008). Portanto, estudos futuros fazem-se necessários para identificar a fonte de CNAs na malária.

Os resultados apresentados permitiram mostrar ainda que, como esperado, CNAs do parasito estão presentes no plasma de pacientes com malária aguda. Entretanto, nenhuma associação significativa foi encontrada entre estes CNAs do parasito e o escore clínico da doença, sendo observada apenas uma associação com a presença de febre. A presença de CNAs do parasito associado à febre não é um resultado inesperado, pois o paroxismo malárico está associado a uma sequencia de eventos envolvidas na ruptura dos eritrócitos infectados e liberação de antígenos dos parasitos expostos ao sistema imune do hospedeiro.

Em resumo, o presente estudo mostrou-se que os níveis de CNAs e de PMPs estão

aumentados no plasma de pacientes com malária vivax e parecem associados a morbidade da doença. Diante disso, acredita-se que os CNAs e as PMPs de *P. vivax* possam dar importantes informações sobre a progressão da gravidade da doença e tem potencial como biomarcadores de morbidade para a malária causada pelo *P. vivax*.

6.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO NA MALÁRIA POR *P. vivax*

Há muito tempo é conhecido o fato de que alguns indivíduos infectados por espécies de *Plasmodium* podem desenvolver complicações graves da malária enquanto outros podem permanecer assintomáticos ou desenvolverem uma doença não complicada, sendo os fatores responsáveis por estas diferenças ainda não completamente esclarecidos (Revisto por Lopez *et al.*, 2010). Este fato reforça os achados de que além do meio ambiente e dos fatores do próprio parasito, características genéticas do hospedeiro desempenham um papel fundamental no prognóstico da malária humana (Randall *et al.*, 2010). Diante disso, a identificação de genes do hospedeiro vertebrado que possam estar envolvidos em uma maior susceptibilidade e/ou resistência à infecção malárica tem aberto novos caminhos para uma melhor compreensão dos aspectos patogênicos da doença, particularmente na malária por *P. falciparum* (Cserti-Gazdewich *et al.*, 2011). Sendo assim, no presente trabalho foram estudados os polimorfismos em genes de importantes citocinas pró (MIF, TNF- α) e anti (TGF- β e IL-10) inflamatórias bem como de glicoproteínas de plaquetas (GPIa/IIa e GPIIb/IIIa) na infecção pelo *P. vivax*.

Poucos são os estudos associando-se os polimorfismos do gene MIF com a malária (Jain *et al.*, 2009). Diante disso, neste trabalho, foram avaliados dois polimorfismos na região promotora do gene MIF, sendo um de microssatélite (MIF-794 (CATT)_{5,8}) e outro de base única (MIF G-173C), previamente associados a diferentes níveis de expressão de MIF (Baugh *et al.* 2003, Donn *et al.* 2004). As genotipagens por eletroforese capilar para a análise do polimorfismo MIF-794 (CATT)_{5,8} mostraram que o genótipo mais freqüente na população estudada foi o -794 (CATT)_{6,6} e o menos freqüente o -794 (CATT)_{6,8}. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Baugh e colaboradores (2002), analisando a distribuição dos genótipos MIF-794 (CATT)_{5,8} em indivíduos com artrite reumatóide na Ásia. Além disso, Lehmann e colaboradores (2009) mostraram que o genótipo -794 (CATT)_{6,6} foi o mais freqüente entre os pacientes com choque séptico na Europa. Entretanto, em um estudo feito associando-se os polimorfismos do gene MIF com a susceptibilidade a anemia grave na

malária por *P. falciparum* em crianças da África, Awandare e colaboradores (2009) encontraram o genótipo -794 (CATT)_{5,6} como o mais freqüente. Sendo assim, estes dados sugerem uma diferença na distribuição geográfica dos genótipos MIF-794 (CATT)_{5,8} entre diferentes populações. Entretanto, os tipos de estudos conduzidos aqui não permitem inferir sobre a distribuição alélica deste polimorfismo de microssatélite na população em geral.

No presente trabalho foram analisadas as associações entre os genótipos MIF-794 (CATT)_{5,8} e os parâmetros clínicos e hematológicos na infecção pelo *P. vivax*. Os resultados mostraram que não houve associação do polimorfismo estudado com os parâmetros analisados. Apesar disto, outros autores mostraram que na malária por *P. falciparum* indivíduos carreadores dos alelos CATT₇ e CATT₈ foram mais susceptíveis a anemia grave na malária (Awandare *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que a regulação da transcrição do gene MIF é complexa e a consequência do polimorfismo de microssatélite no promotor deste gene deve ser melhor investigada.

Um dado de extrema relevância observado no presente trabalho foi que o polimorfismo de base única MIF G-173C parece estar associado com anemia na infecção por *P. vivax*, uma vez que indivíduos que apresentaram esta mutação no gene possuem menores níveis de hemoglobina e menores taxas de hematócrito no sangue. Em concordância com os estes achados, Awandare e colaboradores (2009) mostraram que houve uma significativa relação entre anemia grave na malária causada por *P. falciparum* e a mutação G173C no gene MIF. Os níveis de MIF também foram associados com mortalidade por malária cerebral em indivíduos da Índia (Jain *et al.*, 2009). Este achado é relevante, embora os aspectos patogênicos que causam a anemia na malária sejam complexos, a anemia é uma das principais causas de morbidade por *P. falciparum* em regiões de alta endemicidade (Awandare *et al.*, 2011). Clark e colaboradores propuseram que a anemia grave e a malária cerebral causadas pela infecção por *P. falciparum* poderiam ser consequência da liberação exagerada de citocinas pró-inflamatórias do hospedeiro vertebrado. Martiney e colaboradores (2000) mostraram que na infecção experimental utilizando camundongos como modelo, o MIF inibiu a eritropoiese. Além disso, McDevitt e colaboradores (2006) sugeriram que o MIF pode auxiliar na supressão da eritropoiese durante a infecção malárica por *P. falciparum*. Diante disso uma hipótese a ser levantada na malária por *P. vivax* é de que a presença da mutação pode aumentar a expressão do gene MIF e consequentemente os níveis da citocina, o que pode levar a supressão da eritropoiese e ao desenvolvimento da anemia. Assim, embora os mecanismos envolvidos na anemia por *P. vivax* tenham sido pouco estudados e esclarecidos, os resultados apresentados aqui sugerem um papel do MIF como contribuidor neste processo.

Além de estudar os polimorfismos do gene MIF individualmente, uma outra abordagem utilizada no presente trabalho foi a construção de haplótipos bem como análises de desequilíbrio de ligação dos dois loci polimórficos deste gene (MIF G-173C e MIF-794 (CATT)₅₋₈) com a finalidade de avaliar o efeito das interações entre estes dois loci e a susceptibilidade/resistência à malária clínica. Os resultados mostraram que o haplótipo 6G (sem a mutação de SNP) foi o mais freqüente (55,4%) e o 8G, o menos freqüente (< 1%). O haplótipo 6G, que foi o mais freqüente no presente estudo, foi o segundo de maior freqüência tanto na população da África quanto no Japão (Awandare *et al.*, 2009; Hizawa *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que parece haver uma variação geográfica na distribuição dos haplótipos MIF (Renner *et al.*, 2005). De fato, Awandare e colaboradores (2009) mostraram que o haplótipo 5C foi o mais freqüente e o 8G o menos freqüente entre indivíduos infectados pelo *P. falciparum* na África.

De importância, os resultados aqui observados mostraram que nos indivíduos pertencentes ao haplótipo mais freqüente 6G, a anemia foi menos freqüente, enquanto nos pertencentes ao haplótipo 7C (com a mutação de SNP), a freqüência de anemia foi maior. Em resumo, estes dados sugerem que indivíduos carreadores do haplótipo 7C parecem estar mais susceptíveis ao desenvolvimento de anemia enquanto indivíduos carregando o haplótipo 6G podem estar protegidos do desenvolvimento de anemia na infecção por *P. vivax*. Estes resultados estão de acordo com os observados por Awandare e colaboradores (2009), na malária por *P. falciparum*. Os autores mostraram que o haplótipo 7C estava associado com o desenvolvimento de anemia grave nas crianças africanas, sendo o haplótipo 6G associado com a proteção ao desenvolvimento de anemia grave. Além disso, o haplótipo 7C tem sido relacionado a diferentes processos e/ou doenças inflamatórias incluindo a artrite idiopática juvenil (Donn *et al.*, 2004), lúpus eritematoso (Sánchez *et al.*, 2006) e risco de morte por sepsis (Lehmann *et al.*, 2009). De fato, estudos funcionais utilizando linhagens de células epiteliais mostraram que a associação entre o aumento do número de repetições no gene MIF-794(CATT) e o alelo -173C aumentaram a expressão do gene MIF; entretanto, o efeito desta interação variou com a linhagem celular estudada (Donn *et al.*, 2004).

As análises de desequilíbrio de ligação mostraram um forte desequilíbrio entre os locos analisados, o que sugere que a combinação entre estes dois alelos ocorre mais freqüentemente do que o esperado pela formação aleatória dos haplótipos. Estes dados são corroborados pela observação de associações mais fortes e significativas utilizando os haplótipos do que os locos individuais, o que reforça a hipótese de que os haplótipos 7C e 6G

estão associados com a susceptibilidade ou proteção a anemia na malária por *P. vivax* respectivamente.

Embora o presente trabalho tenha estudado o papel do MIF do hospedeiro vertebrado na malária por *P. vivax*, estudos recentes tem mostrado que o *P. falciparum* apresenta o gene MIF e polimorfismos no gene MIF, os quais podem estimular o sistema imune do hospedeiro. Recentemente, Han e colaboradores (2010) mostraram que os níveis circulantes de MIF de *P. falciparum* estão associados com os níveis de parasitemia na infecção malárica, o que sugere que o MIF do parasito também tem um importante papel na patogenia da malária causada por *P. falciparum*. Em conjunto, estes achados reforçam a importância da resposta imune inflamatória na malária por *P. vivax*.

Devido ao seu importante papel nas doenças infecciosas, auto-imunes e na malária por *P. falciparum*, os polimorfismos da citocina TNF- α foram avaliados no presente estudo. No presente trabalho, os polimorfismos de base única G-308A e T-1031C, presentes na região promotora do gene TNF- α , previamente associados com malária grave causada pelo *P. falciparum*, foram analisados quanto à sua associação com a infecção causada pelo *P. vivax*. Em relação ao polimorfismo TNF- α T-1031C, foi observada uma associação entre a presença da mutação e febre, uma vez que a frequência dos indivíduos que apresentam a mutação foi maior no grupo febril (≥ 38 °C). Entretanto nos indivíduos estudados não foi identificado nenhum homocigoto para a mutação. De fato, dados da literatura mostraram que a frequência do genótipo CC é extremamente baixa em muitas populações (Sanchez *et al.*, 2009). No que diz respeito ao polimorfismo TNF- α G-308A, observou-se o efeito contrário, isto é, a frequência da mutação foi maior entre os indivíduos com ausência de febre. De fato, observou-se ainda uma fraca associação negativa entre o escore clínico e a presença da mutação TNF- α G-308A. Além disso, nas análises de níveis de plaquetas também foi observado efeito semelhante, pois a maioria dos indivíduos que possui a trombocitopenia não apresenta a mutação TNF- α G-308A. Vários estudos têm sido realizados com os polimorfismos no gene TNF- α , alguns mostrando que os mesmos estão associados a uma maior susceptibilidade enquanto outros mostrando uma associação com proteção às doenças inflamatórias. Até o momento um único trabalho buscou associação entre polimorfismos de TNF- α e a malária por *P. vivax*. Sohail e colaboradores (2008) verificaram uma associação entre a mutação na posição -1031 do gene TNF- α e sintomas clínicos tais como febre, em pacientes com malária *P. vivax* na Índia. Estes polimorfismos já foram também associados a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de malária cerebral por *P. falciparum* (Randall *et al.*, 2010; Kuesap *et al.*, 2010). Por outro lado, McGuire e colaboradores (1994)

não encontraram associação entre o polimorfismo TNF- α G-308A e o desenvolvimento de anemia grave em malária por *P. falciparum*. Estudos funcionais sugerem que os alelos TNF- α -308A e TNF- α -1031C estão relacionados a uma maior produção da citocina TNF- α (Wilson *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 1998), enquanto outros mostram que estes alelos não alteram a produção de TNF- α (Mycko *et al.*, 1998). De interesse para o presente estudo, Yen e colaboradores (2001) mostraram que a proximidade do locus TNF- α com o locus MHC pode alterar a expressão do gene TNF- α . Estes autores sugeriram que os indivíduos portadores do genótipo HLA DR4 negativo são mais susceptíveis a artrite reumatóide quando comparado com indivíduos portadores do genótipo HLA DR4 positivo, independente do alelo encontrado no gene TNF- α (-308G ou -308A). Estes dados sugerem que o fenótipo de proteção (contra a trombocitopenia grave) observado no presente estudo, conferido pelo alelo A, pode ser resultado da interferência de outros genes na expressão do gene TNF- α .

As análises dos haplótipos dos locos -308 e -1031 do gene TNF- α mostraram que o haplótipo -1031T:-308G foi mais freqüente na amostra estudada, incluindo os indivíduos com e sem trombocitopenia. Portanto, baseado apenas nestes dois polimorfismos de TNF- α , as mutações de SNPs estudadas aqui não contribuíram significativamente para a trombocitopenia observada. Concordando com estes dados, recentemente, Randall e colaboradores (2010) analisaram 10 polimorfismos de base única no promotor do gene TNF- α em indivíduos com malária por *P. falciparum*. Os autores não encontraram associação entre estes polimorfismos e o desenvolvimento de malária grave. Estes resultados sugerem que a existência de vários polimorfismos na região promotora do gene TNF- α , juntamente com um alto desequilíbrio de ligação observado entre eles, faz com que os mecanismos de transcrição deste gene sejam difíceis de serem analisados. Por outro lado, nos poucos indivíduos pertencentes ao haplótipo 308A:1031T a presença da mutação parece ter protegido da trombocitopenia.

Ubalee e colaboradores (2001) encontraram associação entre polimorfismos no promotor do gene e malária cerebral. Neste trabalho foram analisados 5 diferentes polimorfismos entre eles, os dois estudados no nosso trabalho. Entretanto o alelo associado à maior produção de TNF e associado a maiores chances de desenvolvimento de malária cerebral foram os dois alelos do tipo selvagem, sugerindo o envolvimento das outras mutações não estudadas. Assim, os resultados apresentados sugerem que devido a complexidade desta família de citocinas, os estudos de poucos polimorfismos podem não ser apropriados para concluir sobre susceptibilidade e resistência à doença clínica.

A citocina IL-10 tem um importante papel na regulação da resposta imune, principalmente atuando na inibição da produção de citocinas pró -inflamatórias. Entretanto, a

associação de polimorfismos no gene IL-10 e malária *P. vivax* ainda não foi demonstrada. Para o presente estudo, foi escolhido o polimorfismo IL-10 G-1082A que está associado com um aumento da susceptibilidade e/ou resistência a várias doenças inflamatórias (Yang *et al.*, 2010). Observou-se uma fraca associação positiva entre os níveis de plaqueta no sangue e a presença da mutação, o que sugere que indivíduos portadores do alelo mutado poderiam ter uma certa proteção contra a trombocitopenia da malária por *P. vivax*. Mirghani e colaboradores (2010) mostraram que os níveis de IL-10 foram maiores entre pacientes com malária grave causada pelo *P. falciparum* quando comparado com aqueles com a forma branda da doença. Acredita-se que a mutação A na posição -1082 do gene IL-10 possa estar contribuindo para um efeito antiinflamatório evitando assim a queda de plaquetas no sangue do hospedeiro vertebrado.

Assim como a IL-10, o TGF- β é uma citocina pleiotrópica caracterizada principalmente por uma resposta anti-inflamatória. Na malária por *P. falciparum* foi observado que uma atividade antiinflamatória do TGF- β 1 que parece estar associada com uma redução dos sintomas clínicos em crianças infectadas com *P. falciparum* (Hunt e Grau, 2003). Vários polimorfismos tem sido descritos no gene TGF- β 1 e acredita-se que possam influenciar a expressão do mesmo. O polimorfismo TGF- β 1 T869C tem sido associado com a patogenia de inúmeras doenças inflamatórias tais como diabetes (Valladares-Salgado *et al.*, 2010) e hipertensão arterial (Yang *et al.*, 2010). Diante disso, no presente trabalho pretendeu-se analisar se o polimorfismo TGF- β 1 T869C, esta associado com a morbidade na malária causada pelo *P. vivax*. Os resultados mostraram que não houve associação entre o polimorfismo estudado com os parâmetros clínicos e hematológicos analisados. Entretanto, os resultados apresentados no presente trabalho dizem respeito a somente um polimorfismo de base única do gene TGF- β 1. Estes resultados sugerem que o gene TGF- β , principalmente por fazer parte de uma família de mais de 40 membros, possui um mecanismo complexo de regulação da expressão gênica, o que dificulta o entendimento do seu papel da patogenia da malária. De fato, Sambo e colaboradores (2010) estudando 9 polimorfismos no gene TGF- β 2 mostraram que variações neste gene estão associadas com o aumento do risco de desenvolvimento da malária cerebral por *P. falciparum* em crianças angolanas. Diante disso, acredita-se que estudos englobando mais polimorfismos e haplótipos do gene TGF- β 1 podem auxiliar no melhor entendimento do papel deste gene na morbidade da malária causada pelo *P. vivax*.

Apesar de evidências de que as plaquetas apresentam um papel importante na patogênese da malária, polimorfismos nos genes das glicoproteínas plaquetárias ainda não

foram estudados na malária. Os polimorfismos GPIa/IIa C807T e GPIIb/IIIa C1565T têm sido relacionados com as complicações clínicas de inúmeros distúrbios circulatórios, tais como doença coronariana, trombose e hipertensão arterial (Ashavaid *et al.*, 2010). Diante disso, no presente trabalho, pretendeu-se investigar polimorfismos GPIa/IIa C807T e GPIIb/IIIa C1565T na infecção pelo *P. vivax*. Os resultados mostraram que não foram encontradas associações entre o polimorfismo GPIIb/IIIa C1565T com nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, para o gene GPIa/IIa C807T observou-se uma associação entre a presença do polimorfismo e os baixos níveis de plaqueta no sangue. Estes dados sugerem que o polimorfismo GPIa/IIa C807T pode estar associado à trombocitopenia nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*. As causas da plaquetopenia na malária parecem ser múltiplas, envolvendo a possível destruição desencadeada por mecanismos imunitários, além da destruição não-específica pelo baço e a presença de distúrbios de coagulação (de Mast *et al.*, 2010). Entretanto, não está esclarecido se auto anticorpos anti-plaqueta contribuem para a trombocitopenia, apesar de relatos esporádicos de anticorpos contra receptores plaquetários em pacientes com malária (Rios-Orrego *et al.*, 2005). Diante disso, é importante investigar se a associação entre a mutação GPIa/IIa C807T com a trombocitopenia vista no presente trabalho pode ser devido, por exemplo, a destruição por auto-anticorpos contra as glicoproteínas de plaquetas. É importante ressaltar ainda que este foi o primeiro estudo a sugerir uma associação entre a mutação GPIa/IIa C807T com a trombocitopenia na infecção pelo *P. vivax*.

Os resultados apresentados aqui constituem importantes achados no que diz respeito a morbidade na infecção malárica por *P. vivax*. Foi observado que as MPs e os CNAs estão aumentados na infecção pelo *P. vivax*, o que sugere um importante papel destes fatores plasmáticos na morbidade da malária *vivax*. Além disso, foram encontradas associações entre variações genéticas em alguns genes do hospedeiro vertebrado, relacionados à resposta inflamatória e função plaquetária, com os aspectos clínico e laboratoriais dos indivíduos infectados pelo *P. vivax*. Diante disso, acredita-se que os resultados observados no presente trabalho possam contribuir no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na patogenia do *P. vivax*.

7 Conclusões

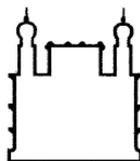
Os resultados obtidos ao final deste trabalho permitiu concluir que:

1. Os níveis plasmáticos de MPs de plaquetas, leucócitos e eritrócitos, bem como de ácidos nucléicos circulantes (CNAs) estão aumentados durante a malária por *P. vivax*
2. A presença de micropartículas de plaquetas (PMPs) e CNAs no plasma se associa as manifestações clínicas da malária por *P. vivax*.
3. Os níveis de MPs e CNAs diminuíram após o tratamento antimalárico específico, o que sugere que os mesmos possam constituir potenciais biomarcadores de prognóstico quando associados ao diagnóstico da malária sintomática.
4. O polimorfismo de base única MIF G-173C parece estar associado com anemia na infecção por *P. vivax*, uma vez que indivíduos que apresentaram a mutação neste gene possuem menores níveis de hemoglobina e menores taxas de hematócrito no sangue.
5. Análises haplotípicas dos polimorfismos de base única e microssatélite do gene MIF mostraram que o haplótipo 6G (sem a presença da mutação pontual) parece estar associado com a proteção contra a anemia na infecção por *P. vivax*, enquanto o haplótipo 7C associado a susceptibilidade.
6. O polimorfismo TNF- α T-1031C parece estar associado com susceptibilidade aos sinais e sintomas da malária vivax, uma vez que houve associação entre as frequências do polimorfismo com a presença de febre. Por outro lado, os resultados encontrados para o polimorfismo TNF- α G-308A indicaram que esta mutação possa estar envolvida na proteção contra a trombocitopenia observada nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*.
7. Os resultados do polimorfismo no gene da citocina IL-10 (G-1082A) indicam uma associação positiva entre os níveis de plaqueta no sangue e a presença do polimorfismo, sugerindo um papel protetor deste polimorfismo.
8. Não foram encontradas associações entre o polimorfismo TGF- β T869C com os parâmetros clínicos e hematológicos analisados neste trabalho.

9. Verificou-se uma associação entre o polimorfismo das glicoproteínas plaquetárias, GPIa/IIa C807T, e trombocitopenia nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*.

8 Anexos

8.I PARECERES DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

PARECER Nº 07/2006 – CEPESH- CPqRR**Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 01/2006****Projeto de Pesquisa:** "Plasmodium vivax na Região Amazônica e extra-Amazônica brasileira: anticorpos bloqueadores da infecção e polimorfismos funcionais"**Pesquisador Responsável:** Luzia Helena Carvalho**Instituição:** Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ**Data de entrada no CEP:** 14/02/2006

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, após consideradas as respostas as pendências anteriores, constatou-se que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

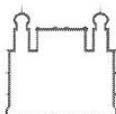
Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: PROJETO APROVADO

Belo Horizonte, 8 de maio de 2006.

João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEPESH- CPqRR

Dr. João Carlos Pinto Dias
Pesquisador Titular
SIAPE 0319611 - CRM-MG 3698
LTEDC - CPqRR / FIOCRUZ



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Comitê de Ética

PARECER Nº 03/2008 – CEPESH- CPqRR

Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 05/2008

Projeto de Pesquisa: "Estudo da resposta imune-inflamatória na patogênese da malária humana causada pelo *Plasmodium vivax*"

Pesquisador Responsável: Luzia Helena Carvalho

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

Data de entrada no CEP: 14/02/2008

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, constatou-se que o projeto atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto, bem como do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação: **PROJETO APROVADO**

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2008.

João Carlos Pinto Dias
Coordenador

Dr. João Carlos Pinto Dias
COORDENADOR
COMITÊ DE ÉTICA

8.2 ARTIGOS PUBLICADOS

8.2.1 MICROPARTÍCULAS

Campos et al. *Malaria Journal* 2010, **9**:327
<http://www.malariajournal.com/content/9/1/327>



RESEARCH

Open Access

Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection

Fernanda MF Campos^{1†}, Bernardo S Franklin^{1†}, Andréa Teixeira-Carvalho¹, Agnaldo LS Filho³, Sálua CO de Paula³, Cor J Fontes², Cristiana F Brito¹, Luzia H Carvalho^{1*}

Abstract

Background: In the last few years, the study of microparticles (MPs) - submicron vesicles released from cells upon activation or apoptosis - has gained growing interest in the field of inflammation and in infectious diseases. Their role in the human malaria parasite *Plasmodium vivax* remains unexplored. Because acute vivax malaria has been related to pro-inflammatory responses, the main hypothesis investigated in this study was that *Plasmodium vivax* infection is associated with elevated levels of circulating MPs, which may play a role during acute disease in non-immune patients.

Methods: Plasma MPs were analysed among thirty-seven uncomplicated *P. vivax* infections from an area of unstable malaria transmission in the Brazilian Amazon. The MP phenotype was analysed by flow cytometry using the classical MP marker, annexin, and fluorochrome-labeled monoclonal antibodies against specific cell surface markers. The frequencies of plasma MPs in *P. vivax* patients (n = 37) were further compared to malaria-unexposed controls (n = 15) and ovarian carcinoma patients (n = 12), a known MPs-inducing disease non-related to malaria.

Results: The frequencies of plasma circulating MPs were markedly increased in *P. vivax* patients, as compared to healthy age-matched malaria-unexposed controls. Although platelets, erythrocytes and leukocytes were the main cellular sources of MPs during vivax malaria, platelet derived-MPs (PMPs) increased in a linear fashion with the presence of fever at the time of blood collection ($\beta = 0.06$, $p < 0.0001$) and length of acute symptoms ($\beta = 0.36$, $p < 0.0001$). Finally, the results suggest that plasma levels of PMPs diminish as patient experience more episodes of clinical malaria ($\beta = 0.07$, $p < 0.003$).

Conclusions: Abundant circulating MPs are present during acute *P. vivax* infection, and platelet derived-MPs may play a role on the acute inflammatory symptoms of malaria vivax.

Background

Plasmodium vivax is the most widespread *Plasmodium* species being responsible for up to 390 million clinical cases each year [1,2]. For long, *P. vivax* infection was considered a benign and self-limited disease, especially when compared to the burden of *Plasmodium falciparum* infection. Recent studies from Indonesia, Papua New Guinea and India have, however, highlighted the association between vivax malaria and life-threatening manifestations, such as respiratory distress, severe anaemia, and neurological manifestations with coma [3-5],

placing *P. vivax* infection in a higher status as a global health concern.

An additional neglected effect of the "benign" *P. vivax* infection concerns its poorly explored pathogenesis. While a large bulk of literature on the immunological and inflammatory patterns of falciparum malaria is available, the pathogenesis of vivax malaria was not submitted to such scrutiny. It is, nevertheless, intriguing that *P. vivax* infection triggers fever with a lower peripheral parasitaemia [6-8]. The few studies that had addressed the pathogenesis of vivax malaria had shown that *P. vivax* infection induces greater host inflammatory responses compared to *P. falciparum* malaria [9-11] with pro-inflammatory cytokines levels being closely associated with disease severity in some studies [10-13]. Hence, the different clinical presentations of vivax malaria infection may be related to the

* Correspondence: lhcavalho@cpqrr.fiocruz.br

† Contributed equally

¹Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



intensity of pro-inflammatory responses. In this regard, the search for sensitive and predictive inflammatory biomarkers in vivax malaria may enhance early detection of severe cases.

Cellular microparticles (MPs) - submicron ($< 1 \mu\text{m}$) membrane vesicles released from cells into the blood stream in response to a variety of stimuli, i.e. cell activation, stress, serine proteases, pro-inflammatory cytokines and apoptosis, have emerged as potential inflammatory biomarkers as elevated levels are found in plasma during many diseases of inflammatory etiology [14]. Consequently, this heterogeneous population of small, membrane-coated vesicles has been used as sensitive markers of diverse process, such as inflammation, coagulation, vascular function and apoptosis. In addition, MPs are important carriers of membrane components or bioactive molecules [15] being involved in a series of "gain of function" phenomena [16]. As an example, MPs derived from activated platelets have been shown to play a role on the pathogenesis of *P. falciparum* cerebral malaria by transferring platelet antigens to the surface of iRBCs and dramatically enhancing their cytoadherence to endothelial cells within brain micro vessels [17,18]. MPs have also been shown to contribute to inflammation during *P. berghei* malaria by inducing potent activation of macrophages [19]. However, their role in vivax malaria pathogenesis has not been investigated.

The main hypothesis to be investigated here is that *P. vivax* infection is associated with elevated levels of circulating MPs of different cellular origins, and those MPs play a role in *P. vivax* induced inflammation. For this purpose, the phenotype of circulating MPs in plasma from *P. vivax* malaria patients in a hypoendemic area of the Brazilian Amazon was assessed. As control, the plasma MP phenotype from healthy malaria-unexposed donors and patients with ovarian carcinoma, a known MPs-inducing disease non-related to malaria, was simultaneously investigated. The results showed that platelet (PMPs), erythrocyte (EMPs) and leukocyte (LMPs) derived-MPs are significantly increased in plasma from *P. vivax* patients as compared to healthy donors. Interestingly, the frequencies of annexin V/CD41a double-positive MPs (PMPs) were associated with the length of acute illness and the presence of fever at the time of blood collection. The results presented here comprise the first evidence of the presence of MPs during vivax malaria and offer a new tool for the study of the pro-inflammatory patterns of *P. vivax* infection.

Methods

Study site and subjects

This study was conducted between January and November 2008, in the outpatient clinic of the Tropical Medicine Center of Porto Velho (CEMETRON), the capital of

Rondônia State, Brazilian Amazon area. In the Amazon area, malaria is mainly an occupational disease, with population at risk largely represented by adult males. Low rates of transmission occur throughout the year with large dominance of vivax over falciparum malaria [20]. The main vector is *Anopheles darlingi* and the number of infective bites associated with malaria is estimated to be between 2 to 10 per inhabitant per year [21].

Individuals who sought care at CEMETRON and whose thick blood smear was positive for *P. vivax*, were invited to participate in the study. Selected volunteers were all negative for *P. falciparum* and/or *Plasmodium malariae* infection by both microscopic examination and a nested-PCR, carried-out latter. Thirty-seven patients, aging 15 to 66 years, were enrolled in the study after the written informed consent, in accordance with guidelines for human research, as specified by the Brazilian National Council of Health (Resolution 196/96). Antimalarial and supportive therapies were given according to standard protocols.

Clinical and demographical data were acquired through a standardized questionnaire, and the haematological profile was assessed by automated complete blood count carried-out at CEMETRON's hematology facility. Table 1 summarizes demographic, epidemiological, parasitological and hematological data of *P. vivax* infected-volunteers.

In the studied area, subjects were migrants from malaria-free areas. Consequently, their ages do not necessarily correlate with malaria exposure. Cumulative exposure to malaria was, therefore, based on self-reported number of lifetime malaria episodes. As their previous malaria experience showed a variable number of infections, extreme values and the possibility of recall bias were avoided by categorizing patients into three groups: i) five or less previous malaria episodes (PME); ii) 6 to 10 PME; and iii) more than 10 PME. Venous blood was obtained from patients on admission, and in those with fever (above 37.5°C) at the time of blood collection. In five patients it was possible to take additional samples, during convalescence, on day 7 and 21 after treatment. Plasma samples from fifteen age-matched malaria-unexposed donors were used as baseline control. As MPs positive samples plasma from 12 patients, aging 45 to 65 years, diagnosed with ovarian carcinoma, as it has been shown that cancer cells from this highly lethal gynaecological malignancy can release MPs [22].

Purification of MPs from plasma

MPs were prepared as described elsewhere [17,19]. Briefly, Citrated blood (0.5 mL) was centrifuged at $1,500 \times g$ for 15 min, and plasma was then cooled to -20°C before storage at -80°C . Samples were further centrifuged at $13,000 \times g$ for 3 min to obtain platelet-free plasma. The latter was diluted 1:3 in citrated PBS containing heparin and

Table 1 Characteristics of the thirty seven uncomplicated *Plasmodium vivax* patients

CHARACTERISTICS	
Gender, male:female	27:1
Median Age, years (range)	36 (15–66)
N° of previous malaria episodes, n (%)	
≤ 5	19 (51.3)
6 – 10	13 (35.1)
> 10	5 (13.5)
N° of days of acute illness, n (%)	
≤ 2	10 (26)
3 – 5	19 (51.3)
> 6	8 (21.6)
Symptoms in the last 3 days, n (%)	
Fever	37 (100)
Headache	33 (89.1)
Chills	35 (94.6)
Myalgia	32 (86.4)
Anorexia	24 (64.8)
Nausea	13 (35.1)
Diarrhoea	7 (18.9)
Vomiting	6 (16.2)
Dyspnea	4 (10.8)
Parasitaemia, parasites/μl of blood, n (%)	
≤ 500	10 (27.0)
500 – 10,000	10 (27.0)
> 10,000	17 (45.9)
Body temperature (°C)	
≤ 36	8 (21.6)
37 – 37.8	14 (37.8)
> 37.8	15 (40.5)
Haemoglobin levels g/dL, median (range)	13.26 (9.7–16.6)
Platelet counts ×1000/mm ³ , median (range)	115 (53–208)
Leukocyte counts ×100/mm ³ , median (range)	52 (23–117)
Haematocrit %, median (range)	41 (32.2– 50.6)

centrifuged at 14,000 xg for 90 min at 15°C. The resultant MP pellet was then resuspended in 1× annexin V binding buffer (BD Biosciences, California, US).

Flow cytometry assays

Unless otherwise stated, all reagents and mAbs used in the Flow cytometry experiments were from BD Biosciences. MPs isolated from plasma were gated (R1) based on their forward (FSC) and side (SSC) scatter distribution as compared to the distribution of synthetic 0.7 - 0.9 μm SPHERO™ Amino Fluorescent Particles (Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, US) (Figure 1A). Taking into account the presence of PS residues in MPs surface, events present in R1 were accessed for their positive staining for annexin V (BD Bioscience) - a classical marker for micro-particles - using PE-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) (Figure 1B). Mouse IgG PE conjugated isotype

control mAbs were used to properly place gates. Annexin V⁺ events gated within the R2 region were further assessed for immunolabeling with FITC-conjugated mAbs against the cell markers CD41a (platelets), CD144 (endothelial cells), CD235a (erythrocytes), CD45 (leukocytes) and CD14 (monocytes) or the correspondent mouse IgG FITC-conjugated isotype control mAbs. The samples were analysed in a Flow Cytometry FACSCalibur (Becton-Dickinson, California, US). Over 100,000 events were acquired on each sample, to reach at least 2,000 events within the MPs gate.

Quantification of plasma MPs levels

To confirm if the absolute numbers of plasma MPs were different between malaria patients and healthy donors, as well as to determinate the numbers of plasma MPs per microliter (MPs/μl), the cytometer was set to operate at a high flow rate setting for 60 seconds for each sample. The number of MPs/μl of plasma was calculated as described elsewhere [18]: $MPs/\mu l = (N \times 400)/(60 \times 100)$, in which N is the number of events, 400 is the total volume of in the tube before analysis, 60 is the sample volume analysed, and 100 is the original volume of MPs suspension.

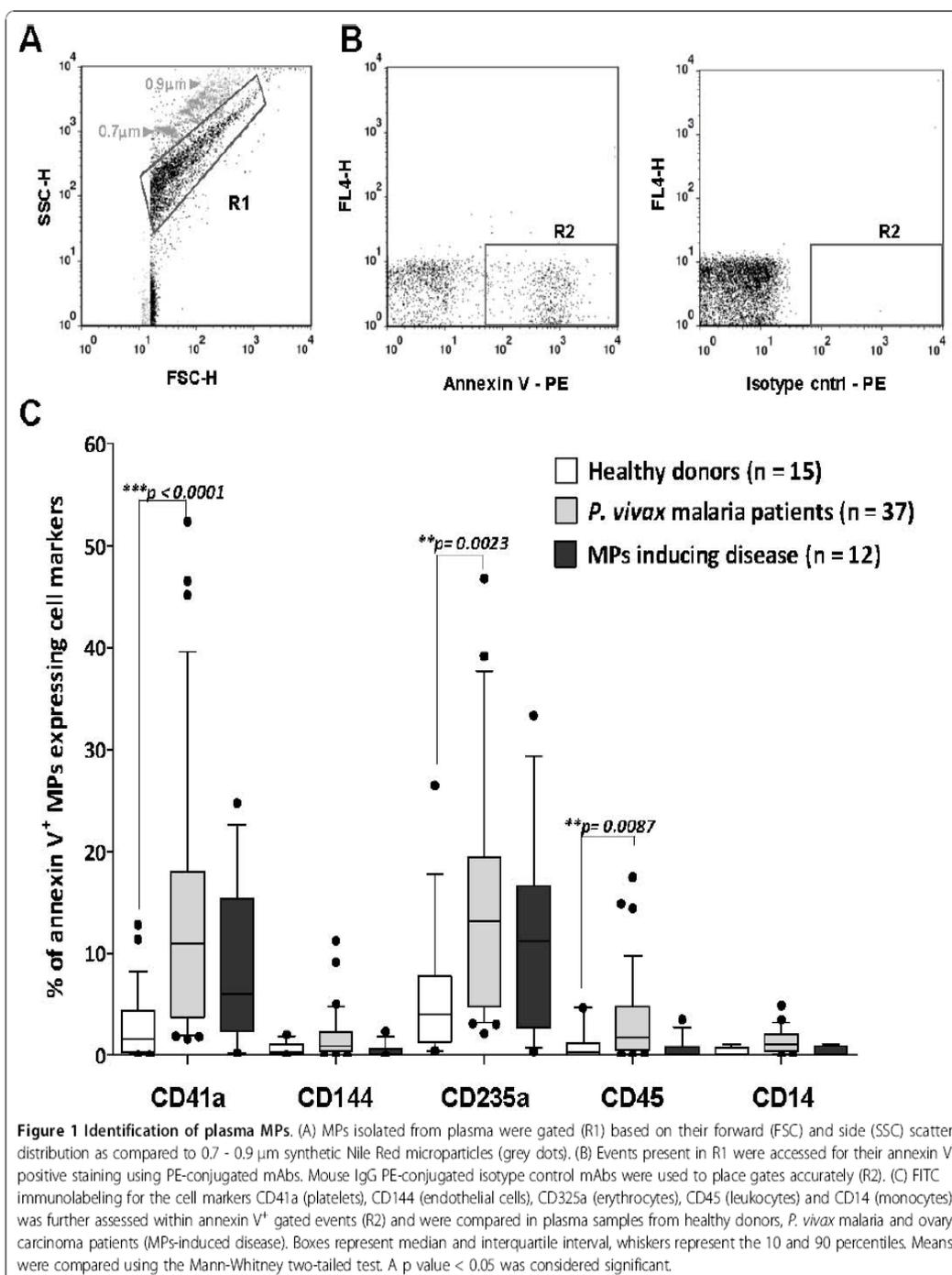
Statistical analysis

Data were analysed using Graph pad Instat 4.0 and SPSS 15.0 statistical software. Differences in the means of the frequencies (double staining for annexin V and cell markers) between groups were analysed using two-tailed student's t test or Mann-Whitney when data did not fit a Gaussian distribution. The log-transformation of data was applied for situations where variances normality assumptions failed followed by linear regression to investigate the association between the clinical parameters and MPs levels. Pairwise correlations were evaluated with Pearson's correlation coefficient ρ . Multiple linear regression models with stepwise backward deletion were built to describe independent associations between covariates (fever, age and number of previous malaria episodes) and the presence of PMPs. A P value < 0.05 was considered to be statistically significant. For illustration purpose (as shown in Table 1 and Figure 2) the patients were categorized into sub-groups according to their body temperature, the numbers of previous malarial episodes, length of symptoms (in days), and days since last malarial episode.

Results

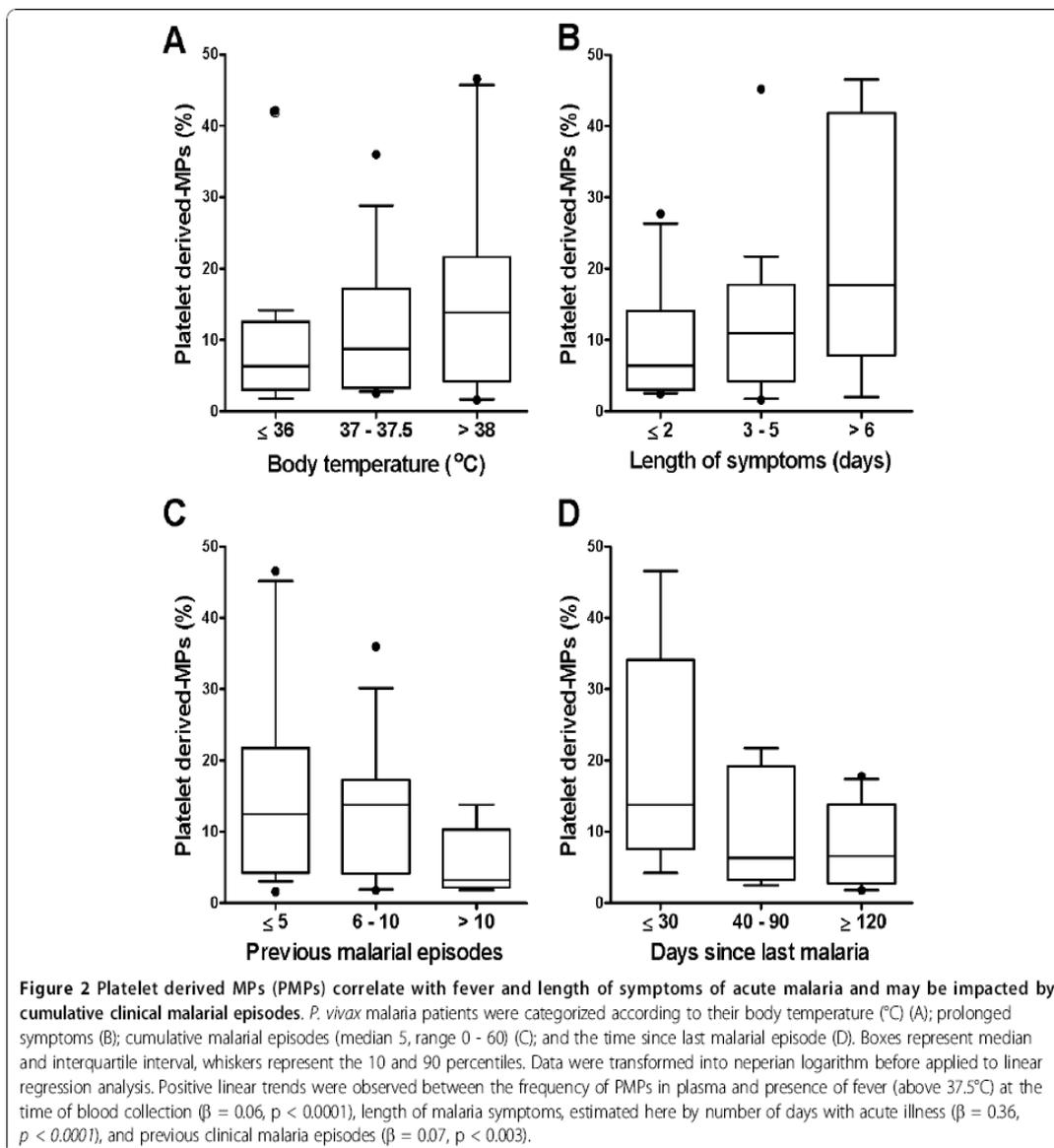
Platelet, erythrocyte and leukocytes are the main sources of plasma MPs during acute *P. vivax* malaria

The phenotype of plasma circulating MPs during acute vivax malaria was investigated, with specific mAbs for cell markers i.e. CD41a, CD235a, CD45, CD144 and CD14 were used to discriminate the cellular sources of



annexin V⁺ MPs. The percentages of annexin V⁺ MPs stained for each cell marker was compared between samples from *P. vivax* malaria patients, healthy donors or samples from a MPs-induced disease non-related to malaria (Figure 1C).

The frequency of platelet (PMPs) ($p < 0.0001$), erythrocyte (EMPs) ($p = 0.0023$) and leukocyte derived-microparticles (LMPs) ($p = 0.0087$) were significantly increased in plasma samples from malaria patients as compared to healthy donors. The increased levels of



PMPs, EMPs and LMPs were confirmed when the absolute number of MPs per μl of plasma was calculated (additional file 1). As expected, the frequencies of PMPs and EMPs, but not LMPs, were also significantly increased in plasma from patients with ovarian carcinoma ($p < 0.05$). These results suggest that platelets, erythrocytes and leukocytes are the main source of plasma circulating MPs during acute *P. vivax* malaria and its presence may be associated with inflammation.

Plasma MPs associate with acute malaria symptoms

To investigate the role of MPs in the pathogenesis of vivax malaria, potential factors that could be associated

with the presence of circulating MPs in acute *P. vivax* infection were analysed, including demographic, clinical, haematological and parasitological parameters. No association was found between levels of MPs and haematological (haemoglobin levels, haematocrit, platelet or leukocyte counts) or parasitological data. Of note, positive linear trends were observed between the presence of fever at the time of blood collection and the frequency of PMPs in plasma ($\beta = 0.06$, $p < 0.0001$) (Figure 2A). Significant association was also observed between higher frequencies of PMPs and prolonged malaria symptoms, estimated here by number of days with acute illness ($\beta = 0.36$, $p < 0.0001$) (Figure 2B).

More specifically, patients reporting symptoms in the last four or more days before seeking care at CEMETRON had significant higher levels of PMPs in plasma when compared to patients reporting more immediate symptoms. Apparently, the levels of PMPs in plasma diminish as previous clinical malaria episodes increases ($\beta = 0.07$, $p < 0.003$) (Figure 2C). No significant association was found between PMP levels and days elapsed since last malarial episode (Figure 2D).

Although manifestation of acute malaria such as fever can be influenced by different factors including host age and immunological background - evaluated here by previous malaria experience - multiple linear regression models confirmed the independent association between fever and microparticles, as well as length of symptoms and microparticles ($p < 0.001$).

Plasma MPs levels decrease after anti-malarial chemotherapy

In five *P. vivax* patients, plasma MPs levels were assessed 7 and 21 days after anti-malarial chemotherapy. The levels of plasma MPs remain unchanged at 7 days post infection; however, as shown in Figure 3, the levels of plasma MPs decreases after 21 days post treatment.

Discussion

Despite increasing evidence of multidrug-resistant *P. vivax* associated with severe and fatal disease, little is known about its pathogenesis. This study provides the first evidence that microparticles (MPs) from leukocytes, platelets, and erythrocytes are significantly increased in plasma from acute *P. vivax* malaria patients. These results are consistent with the observation that active, non-cytokine, factors are present in paroxysm plasma from non-immune patients with acute *P. vivax* infections [23,24]. As some of the active components in paroxysm plasma are lipids, of unknown nature, and, importantly, are present in particulate form [24], MPs could contribute to *P. vivax* paroxysms. However, at this time, it is not possible to conclude on the role of MPs during paroxysm, because it remains as undefined complex phenomenon, which involves several components, including host-derived cytokines [24].

As virtually all cell types can release MPs, the presence of MPs of different origins circulating during acute *P. vivax* malaria is not unexpected. It rather suggests that different cell types are activated and participate in the myriad of inflammatory processes induced by *P. vivax* parasites/infection. In fact, these data are in concordance with a recently published study reporting that children infected with *P. falciparum* presents high levels of circulating MPs, including those from platelet, erythrocytes, endothelial cells and leukocytes [25]. In these infected Cameroonian's children, MPs levels

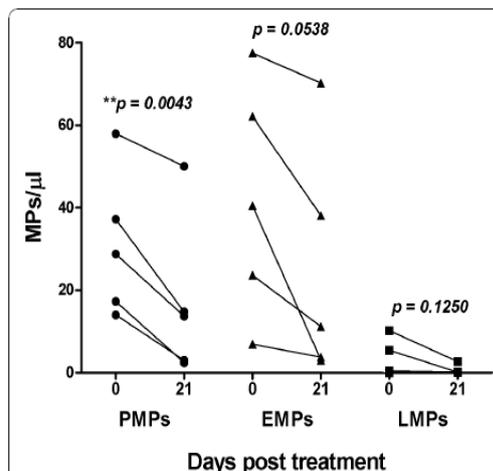


Figure 3 Plasma MPs levels decrease after anti-malarial chemotherapy. Levels of platelet (PMPs), erythrocyte (EMPs) and leukocyte derived-MPs (LMPs) were quantified in plasmas from five patients at the acute phase of *P. vivax* infection (0) and after 21 days of anti-malarial chemotherapy. MP levels were calculated and expressed as number/μl of plasma as detailed in Methods. Statistical analyses were performed using the two-tailed paired t-test. A p value < 0.05 was considered significant.

returned to normal when the patients were cured. This results are in line with the observations described here with *P. vivax*, and by others with *P. falciparum* [17], which shown that the levels of MPs significantly decrease after 19 - 21 days post treatment.

In the present study, elevated levels of platelet-derived microparticles (PMPs) were associated with clinical manifestation of disease, such as fever and prolonged time with malaria symptoms. At this time, the significance of this finding in *P. vivax* infection is not clear, but they are of particular interests as both platelets [26] and PMPs [18] have been shown to play a role in the pathogenesis of malaria caused by *P. falciparum*. Moreover, MPs have been shown to be mediators of the inflammatory process that occur during infection with *Plasmodium berghei* in mice [18]. Recently, Boilard and colleagues [27] provides strong evidence for the pathogenic role of PMPs, confirming their contribution as "incendiary devices" in the conflagration of a hot, swollen, and painful rheumatoid joint.

Although evidence for a role of microparticles in human malaria diseases at present is still only limited, new evidence is accumulating rapidly to support this theory. In Cerebral Malaria, the most severe complications of *P. falciparum* infection, PMPs levels significantly correlated with coma depth and thrombocytopenia [25]. Consequently, these authors have been proposed cell-specific MPs as biological marker for cerebral dysfunctions

in severe falciparum malaria, and intervention to block MP production as a new therapeutic target against cerebral malaria.

As in *P. falciparum* PMPs facilitate cytoadherence of iRBCs to brain endothelial [18], it is reasonable to speculate that, similarly, they might be involved in the underlying mechanisms driving pulmonary vascular sequestration in *P. vivax* malaria as suggested by Anstey *et al* [7]. However, as cytoadherence is not a common feature of vivax-infected RBCs and evidences for their microvascular accumulation is, at best, modest [28], it is conceivable that PMPs may be merely an epiphenomenon of the pro-inflammatory response previously observed in vivax malaria [12,29-31]. Further studies will be required to investigate if circulating PMPs from *P. vivax* patients may act either as biomarker or mediator of inflammation/disease (or both).

A potential limitation of the statistics analysis performed here was that multiple comparison were realized, aiming to find possible associations between MPs and clinical/biological parameters; however, it should be taken in consideration that these significant findings were hypothesis-generating, and, consequently, its represent a realistic interpretation of the facts. In addition, multiple linear regression models confirmed the independent association between fever and length of symptoms with platelets-derived microparticles.

An interesting finding was the presence of leukocyte and erythrocyte derived-MPs during acute *P. vivax* malaria. The role of leukocytes in malaria pathogenesis is still not fully understood; nevertheless, it has been shown that these cells are the main source of pro-inflammatory cytokines, especially TNF α which is highly pyrogenic [32]. The presence of MPs derived from these cells provides evidence for their activation in acute vivax malaria. Perhaps, an attractive field of study is to investigate whether or not EMPs might contribute to the distinct erythrocyte destruction commonly observed in vivax malaria [33]. Although severe anemia can be produced by both *P. vivax* and *P. falciparum* infections, malariatherapy studies have shown greater destruction of non-infected RBCs per infected erythrocyte in *P. vivax* as compared to *P. falciparum* malaria [33]. Accordingly, in the present study, the frequency of erythrocyte derived MPs in plasma was not associated with parasitaemia. Actually, the absence of correlation between MPs and parasitaemia is not unexpected, because in the Brazilian Amazon area the wide range of parasitaemia found in *P. vivax* infection does not enable to conclude on the value of this variable as determinant of severity [34].

While it is not possible at this time to characterize the mechanism by which MPs might be involved in the pathogenesis of *P. vivax* malaria, the data shown here

raise important questions on the role of cell derived MPs in malaria pathogenesis revealing a fruitful area for investigation. Thus, the potential of circulating cell derived-MPs as non-invasive inflammatory marker of *P. vivax* morbidity is likely.

Conclusions

This paper describes the initial attempts made at characterization of the MP phenotype in vivax malaria. It is shown here that the plasma levels of platelet, erythrocyte and leukocyte-derived MPs are increased during acute uncomplicated vivax malaria. In *P. vivax* patients platelets derived-MPs were significantly correlated with fever and length of symptoms. Elucidation of the microparticles composition and the mechanisms involved in exertion of their effects could contribute to additional intervention strategies against malaria.

Additional material

Additional file 1: Quantification of platelet, erythrocyte and leukocyte derived-MPs levels in plasma from *P. vivax* patients, before and after antimalarial treatment. Plasma levels of platelet, erythrocyte and leukocyte derived-MPs were calculated as described in Methods; results are expressed as MPs/ μ l. The absolute numbers of plasma MPs was compared among healthy donors and *P. vivax* malaria patients. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney two-tailed test. A p value < 0.05 was considered significant. Supplementary Figure.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Marcus Lacerda for his critical suggestions, and Danubia L. Gomes for helping statistical analysis. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health - PDTIS - FIOCRUZ for use of its facilities. This work was supported by the Research Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG, PPM II), The Brazilian National Research Council (CNPq), and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, PAPER V), Pronex Malaria, DECIT/MS, scholarships from FAPEMIG (FMFC), CNPq-FIOCRUZ (BSF), and CNPq (LHC, ATC, and CFAB) are also acknowledged.

Author details

¹Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil. ²Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Mato Grosso, Rua Luiz Phelipe Pereira Leite sn, Alvorada, Cuiaba, MT, 78048-902, Brazil. ³Departamento de Ginecologia e Obstetria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

Authors' contributions

FFMC and BSF were involved in all stages of this study. CJF coordinated the field study. ATC and CFAB gave substantial constructive advice in the initial design of the project. ALSF and SCOP selected clinically the ovary carcinoma patients. LHC accepts direct responsibility for the conception and coordination of the study. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 13 August 2010 Accepted: 16 November 2010
Published: 16 November 2010

References

- Hay S, Guerra C, Tatem A, Noor A, Snow R: The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 2004, **4**:327-336.
- Price R, Tjitra E, Guerra C, Yeung S, White N, Anstey N: Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:79-87.
- Price R, Douglas N, Anstey N: New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis* 2009, **22**:430-435.
- Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder J, Alpers M, Müller I: *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 2008, **5**:e127.
- Tjitra E, Anstey N, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah D, Price R: Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 2008, **5**:e128.
- Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Kenangalem E, Wariker N, Maristela R, Umana KG, Vemuri R, Okosey MJ, Penttinen PM, Ebsworth P, Sugiarto P, Anstey NM, Tjitra E, Price RN: Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2008, **7**:148.
- Anstey N, Handoyo T, Pain M, Kenangalem E, Tjitra E, Price R, Maguire G: Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* 2007, **195**:589-596.
- Anstey N, Russell B, Yeo T, Price R: The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* 2009, **25**:220-227.
- Yeo T, Lampah D, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, Kenangalem E, Price R, Anstey N: Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis* 2010, **202**:109-112.
- Hemmer C, Holst F, Kern P, Chiwakata C, Dietrich M, Reisinger E: Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or ovale than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 2006, **11**:817-823.
- Karunaweera N, Grau G, Gamage P, Carter R, Mendis K: Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:3200-3203.
- Andrade B, Reis-Filho A, Souza-Neto S, Clarendo J, Camargo L, Barral A, Barral-Netto M: Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 2010, **9**:13.
- Brown A, Teja-Isavadharm P, Webster H: Macrophage activation in vivax malaria: fever is associated with increased levels of neopterin and interferon-gamma. *Parasite Immunol* 1991, **13**:673-679.
- Doeuvre L, Plawinski L, Toti F, Anglés-Cano E: Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J Neurochem* 2009, **110**:457-468.
- Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J: Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004, **11**:156-164.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:581-593.
- Combes V, Taylor T, Juhan-Vague I, Mège J, Mwenchanya J, Tembo M, Grau G, Molyneux M: Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *JAMA* 2004, **291**:2542-2544.
- Faillon D, Combes V, Mitchell A, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi M, Chimini G, Fusai T, Grau G: Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J* 2009, **23**:3449-3458.
- Couper K, Barnes T, Hafalla J, Combes V, Ryffel B, Secher T, Grau G, Riley E, de Souza J: Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1000744.
- Katsuragawa T, Gil L, Tada M, de Almeida e Silva A, Costa J, Araújo MS, Escobar A, da Silva L: The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One* 2010, **5**:e9245.
- Gil L, Tada M, Katsuragawa T, Ribolla P, da Silva L: Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:271-276.
- Yokota N, Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Kikuchi K, Ruf W, Sakuma Y, Tsuchiya E, Miyagi Y: Self-production of tissue factor-coagulation factor VII complex by ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2009, **101**:2023-2029.
- Wijesekera S, Carter R, Rathnayaka L, Mendis K: A malaria parasite toxin associated with *Plasmodium vivax* paroxysms. *Clin Exp Immunol* 1996, **104**:221-227.
- Karunaweera N, Wanasekara D, Chandrasekharan V, Mendis K, Carter R: *Plasmodium vivax*: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation. *Malar J* 2007, **6**:62.
- Pankoui Mfonkeu J, Gouado I, Fotso Kuate H, Zambou O, Amvam Zollo P, Grau G, Combes V: Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria. *PLoS One* 2010, **5**:e13415.
- Cox D, McConkey S: The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**:557-568.
- Boilard E, Nigrovic P, Larabee K, Watts G, Cobllyn J, Weinblatt M, Massarotti E, Remold-O'Donnell E, Farndale R, Ware J, Lee DM: Ware J et al: Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010, **327**:580-583.
- Carvalho B, Lopes S, Nogueira P, Orlandi P, Bargieri D, Blanco Y, Mamoni R, Leite J, Rodrigues M, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, del Portillo HA, Araújo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Rênia L, Costa FT: On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes. *J Infect Dis* 2010, **202**:638-47.
- Francischetti I, Seydel K, Monteiro R, Whitten R, Ersson C, Noronha A, Ostera G, Kamiza S, Molyneux M, Ward JM, Taylor TE: *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce tissue factor expression in endothelial cells and support the assembly of multimolecular coagulation complexes. *J Thromb Haemost* 2007, **5**:155-165.
- Miller L, Baruch D, Marsh K, Doumbo O: The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002, **415**:673-679.
- Newton C, Taylor T, Whitten R: Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg* 1998, **58**:673-683.
- Nyangoto E: Cell-mediated effector molecules and complicated malaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2005, **137**:326-342.
- Collins W, Jeffery G, Roberts J: A retrospective examination of anemia during infection of humans with *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:410-412.
- Alexandre M, Ferreira C, Siqueira A, Magalhães B, Mourão M, Lacerda M, Alecrim M: Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:1611-1614.

doi:10.1186/1475-2875-9-327

Cite this article as: Campos et al: Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal* 2010 **9**:327.

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

8.2.2 ÁCIDOS NUCLÉICOS CIRCULANTES

OPEN ACCESS Freely available online



Plasma Circulating Nucleic Acids Levels Increase According to the Morbidity of *Plasmodium vivax* Malaria

Bernardo S. Franklin^{1*}, Barbara L. F. Vitorino¹, Helena C. Coelho², Armando Menezes-Neto¹, Marina L. S. Santos¹, Fernanda M. F. Campos¹, Cristiana F. Brito¹, Cor J. Fontes³, Marcus V. Lacerda², Luzia H. Carvalho^{1*}

1 Laboratório de Malária, Centro de Pesquisa René, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Gerência de Malária, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, **3** Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

Abstract

Background: Given the increasing evidence of *Plasmodium vivax* infections associated with severe and fatal disease, the identification of sensitive and reliable markers for vivax severity is crucial to improve patient care. Circulating nucleic acids (CNAs) have been increasingly recognized as powerful diagnostic and prognostic tools for various inflammatory diseases and tumors as their plasma concentrations increase according to malignancy. Given the marked inflammatory status of *P. vivax* infection, we investigated here the usefulness of CNAs as biomarkers for malaria morbidity.

Methods and Findings: CNAs levels in plasma from twenty-one acute *P. vivax* malaria patients from the Brazilian Amazon and 14 malaria non-exposed healthy donors were quantified by two different methodologies: amplification of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) genomic sequence by quantitative real time PCR (qPCR), and the fluorometric dsDNA quantification by Pico Green. CNAs levels were significantly increased in plasma from *P. vivax* patients as compared to healthy donors ($p < 0.0001$). Importantly, plasma CNAs levels were strongly associated with vivax morbidity ($p < 0.0001$), including a drop in platelet counts ($p = 0.0021$). These findings were further sustained when we assessed CNAs levels in plasma samples from 14 additional *P. vivax* patients of a different endemic area in Brazil, in which CNAs levels strongly correlated with thrombocytopenia ($p = 0.0072$). We further show that plasma CNAs levels decrease and reach physiological levels after antimalarial treatment. Although we found both host and parasite specific genomic sequences circulating in plasma, only host CNAs clearly reflected the clinical spectrum of *P. vivax* malaria.

Conclusions: Here, we provide the first evidence of increased plasma CNAs levels in malaria patients and reveal their potential as sensitive biomarkers for vivax malaria morbidity.

Citation: Franklin BS, Vitorino BLF, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos MLS, et al. (2011) Plasma Circulating Nucleic Acids Levels Increase According to the Morbidity of *Plasmodium vivax* Malaria. PLoS ONE 6(5): e19842. doi:10.1371/journal.pone.0019842

Editor: Fabio T. M. Costa, State University of Campinas, Brazil

Received: December 2, 2010; **Accepted:** April 18, 2011; **Published:** May 17, 2011

Copyright: © 2011 Franklin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Research Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG), The Brazilian National Research Council (CNPq), and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, PAPES V), Pronex Malaria, CNPq/DEQ/MS; scholarships from FAPEMIG (FMFC), CNPq-FIOCRUZ (BSF), and CNPq (LHC, ATC, and CFAB) are also acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bernardo@cpqrr.fiocruz.br (BSF); lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br (LHC)

Introduction

Plasmodium vivax malaria threatens almost 40% of the world's population, with an upper estimate of 300 million cases each year [1]. Fortunately, after a long time being neglected under the contemptible designation of benign infection, vivax malaria has gained increasing attention in recent years.

In the last decade, a series of case reports and longitudinal studies carried out in India [2,3], Papua in Indonesia [4,5], Papua New Guinea [6] and Brazil [7] have demonstrated association of *P. vivax* infections with severe or even fatal outcomes, with incidence and morbidity rates similar to those for *P. falciparum*. Consequently, costs due to hospitalization have significantly raised as well as the need for intensive care, which helped vivax malaria to be placed in a higher status of public health emergency [7].

Compared to falciparum malaria, there are remarkably large knowledge gaps in the pathophysiology of vivax malaria, and the

true spectrum of clinical disease in endemic areas remains unknown [8]. The few studies that have addressed the pathogenesis of vivax malaria showed that the different clinical presentations of vivax malaria might be related to the intensity of pro-inflammatory responses [9,10,11,12]. Inflammatory cytokines such as TNF-alpha and antioxidant agents have been associated with clinical severity of *P. vivax* infections [13,14]. Nevertheless, data validating their sensitivity and reliability as predictors of severe disease are scarce. Consequently, the identification of highly sensitive biomarkers for malaria vivax morbidity is crucial to prevent life threatening complications.

Most of the DNA and RNA in the human body are located within cells, but small physiologic amounts of nucleic acids can also be found circulating freely in the blood. These DNA, RNA, and small RNA molecules may arise from both: i) active release of nucleic acids from living cells, or ii) break down of dying cells that release their contents into the blood. The term Circulating Nucleic

Acids (CNAs) refers to cell free segments of DNA or RNA found in the bloodstream. Their existence in human plasma was first reported more than 60 years ago [15], however, no interest was shown in the presence of DNA in the circulatory system until high DNA levels were demonstrated in the blood of patients with cancer [16]. Elevated plasma CNAs levels have now been detected during other acute illnesses and injuries. Examples include lupus erythematosus [17,18], diabetes [19], trauma [20], stroke [21], and myocardial infarction [22,23]. Furthermore, high usefulness of CNAs levels in the diagnosis of infections in febrile patients and as a prognostic marker in septic patients has been shown [24]. Their applications in clinical diagnosis and prognosis have continuously grown and further studies on CNAs showed that these nucleic acids could be a powerful non-invasive approach to a wide range of clinical disorders [25].

Aiming at finding sensitive and reliable biomarkers for *P. vivax*, herein we tested the usefulness of plasma CNAs levels as markers for the morbidity of vivax malaria. We investigated the CNAs levels in plasma from *P. vivax* infected patients with different clinical presentations and found significant higher levels of CNAs in *P. vivax* infected patients, as compared to age-matched healthy donors. We found that plasma CNAs levels were closely correlated with variations in body temperature, platelets counts, and increased in a linear fashion with the clinical spectrum of vivax

malaria, evaluated here by scoring patients' clinical and hematological parameters.

Results

CNAs levels were measured in plasma from *P. vivax* patients by qPCR amplification of the genomic sequence of the human single copy gene hTERT and by fluorometric quantification of the dsDNA content with the Quant-iT™ Pico Green Reagent. The amplification plot of hTERT shows that the mean cycle threshold (Ct) achieved in CNAs samples from *P. vivax* patients (mean Ct 28.6 ± 1.5) was significantly lower than the one reached in samples from healthy donors (mean Ct 31.5 ± 0.79) ($p < 0.0001$) (Fig. 1A and 1C). As the amount of DNA theoretically doubles every cycle during the exponential phase of qPCR, these results suggest that the levels of this target sequence in the CNAs preparation from *P. vivax* patients are at least 8-fold higher than in healthy donors. In fact, a difference of 11.6× between the hTERT levels in plasma from *P. vivax* patients (1.278 pg/ml) and healthy donors (0.1098 pg/ml) was confirmed when a standard curve, built from a serial dilution of an amplified sample of hTERT sequence, was used to interpolate the hTERT concentrations in the samples (Figure S1). To normalize the amount of nucleic acids purified and inputted in qPCR experiments, 5 ng of salmon sperm DNA was

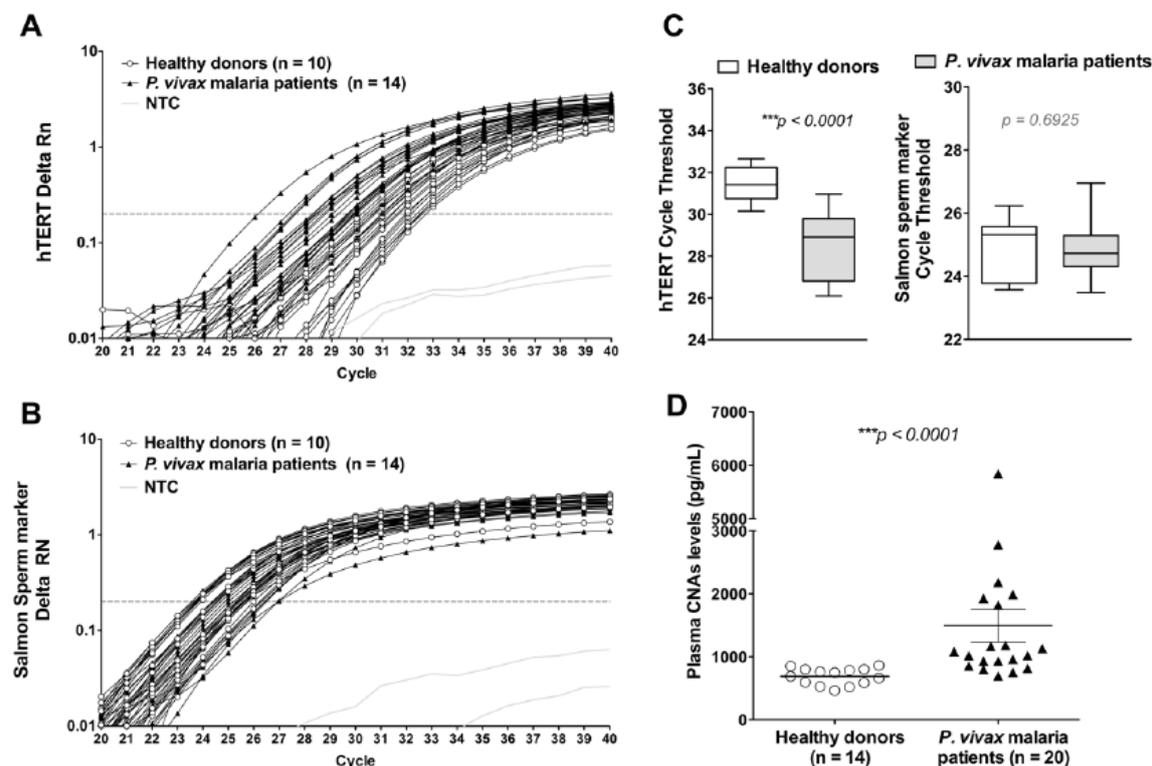


Figure 1. Increased CNAs levels in plasma from *P. vivax* patients. CNAs levels were quantified in plasma from acute *P. vivax* patients or healthy donors by measuring the amplification of the hTERT human genomic sequence (A) as compared to the amplification of the *O. keta* Y chromosome marker (B) for the salmon sperm DNA spiked into plasma samples before CNAs purification. (C) Comparison of the mean cycle threshold (Ct) from the hTERT or the *O. keta* Y chromosome marker in CNAs samples purified from *P. vivax* patients or non-exposed healthy donors. (D) Fluorometric dsDNA quantification of CNAs levels in plasma by the Quant-iT™ Pico Green methodology. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. A p value < 0.05 was considered significant. doi:10.1371/journal.pone.0019842.g001

spiked into plasma samples before CNAs purification (Fig. 1B). As expected, the specific sequence of salmon sperm DNA was similarly amplified in *P. vivax* patients and healthy donors plasmas (Fig. 1B and 1C, $p = 0.6925$).

The increased levels of total CNAs in plasma from *P. vivax* patients were confirmed by quantification of dsDNA with Quant-iT™ Pico Green Reagent (Fig. 1D) (1494.7 ± 1169.7 in vivax patient vs. 689.03 ± 131.54 pg/ml in healthy donors, $p < 0.0001$).

To investigate the potential of CNAs as biomarkers for malaria morbidity, we compared the levels of CNAs in plasma from patients with different clinical presentations, and scored according to clinical and hematological parameters (Table S1). Figure 2A illustrates the qPCR amplification of the hTERT genomic sequence in plasma from four *P. vivax* patients and four unexposed-controls. Sensitive changes in hTERT amplification were observed according to the slightest increase in the clinical score. Furthermore, significantly higher levels of CNAs were found in plasma isolated from patients who presented fever at the time of blood collection (febrile patients) compared to plasma samples from non-febrile patients, as revealed by the two different methodologies: amplification of hTERT genomic sequence by qPCR ($p = 0.0376$) and the quantification of dsDNA content with Quant-iT™ Pico Green ($p = 0.0023$) (data not shown).

To confirm whether CNAs levels reflect disease morbidity, the sum of scores attributed to each patient (Table S1) was plotted against the CNAs levels detected in plasma with the Quant-iT™ Pico Green or the mean cycle threshold detected by qPCR amplification of the hTERT genomic sequence (Fig. 2B). A clear correlation (Spearman $r = 0.4795$, $p = 0.0034$) was found between the CNAs levels and the intensity of clinical malaria. These data were confirmed when the Cts from the amplification of hTERT were analyzed (Pearson $r = -0.7111$, $p < 0.0001$) (Fig. 2B).

Platelet activation exerts thrombotic and pro-inflammatory functions and their unbalanced activation contributes to life-threatening outcomes in diseases such as heart attack, stroke, and

cancer [26]. Both platelets [27] and platelet derived microparticles (PMPs) [10] have been associated with clinical manifestations of malaria. We thus investigated if plasma CNAs levels may be associated with thrombocytopenia and/or others hematological parameters, such as WBC and RBC counts, hemoglobin and hematocrit levels, mean corpuscular hemoglobin (MHC) and mean platelet volume (MPV). Among all parameters investigated, we found a strong negative correlation between CNAs levels, assessed by dsDNA quantification with Pico Green, and platelet counts (spearman $r = -0.6451$, $p = 0.0021$) (Fig. 3A). These findings were confirmed when the mean Ct obtained after qPCR amplification of the genomic sequence for hTERT gene was plotted against platelet levels (Pearson $r = 0.6479$, $p = 0.0027$) (Fig. 3B).

To further confirm the association between CNAs levels and *P. vivax* morbidity, we assessed the CNAs levels in plasma from an additional group of *P. vivax* patients whose selection was carried-out in a different hospital of the Amazon area, Cuiaba, MT (~1500 miles from Manaus, AM). Once the clinical protocol used at the hospital in Cuiaba was different from Manaus (FMT-HVD), we were unable to build a similar clinical score. For this reason, we compared the CNAs levels in these samples with thrombocytopenia, a common hematological disturbance seen in malaria morbidity in the Amazon area [28]. By analyzing the amplification of hTERT, it was possible to demonstrate a significant correlation (Pearson $r = 0.745$, $p = 0.0072$) between CNAs levels and thrombocytopenia in *P. vivax* patients from Cuiaba (Figure S2A).

As this study provides the first description of circulating nucleic acids in malaria infection, we evaluate CNAs levels in a small group of *P. falciparum* patients who sought for care at Cuiaba's hospital ($n = 9$). CNAs levels were significantly higher in samples from falciparum malaria patients as compared to healthy donors ($p = 0.038$; not shown). Importantly, CNAs levels in patient's plasma clearly correlated with thrombocytopenia (Figure S3A) and the occurrence of fever during acute *P. falciparum* infection (Figure S3B).

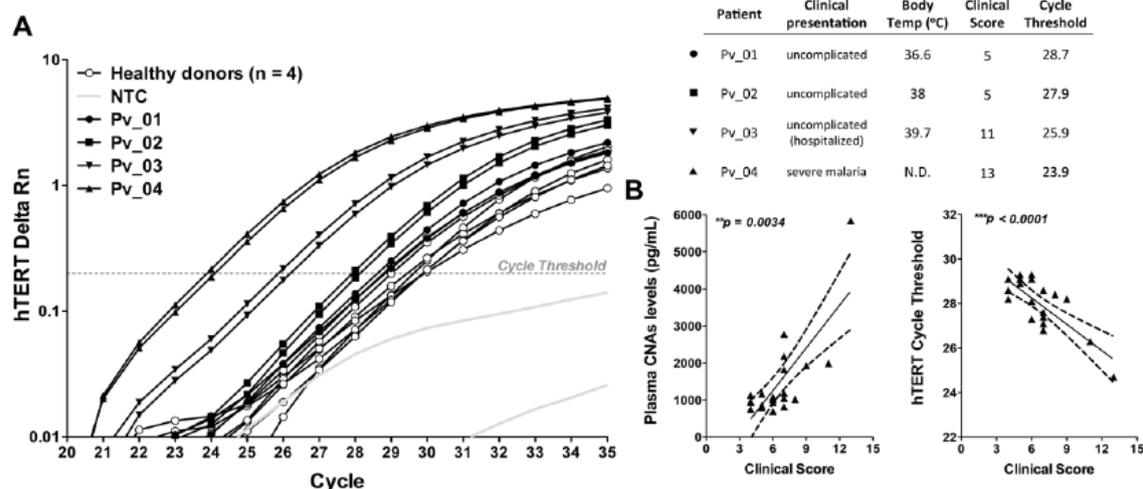


Figure 2. Plasma CNAs levels reliably correlate with the *P. vivax* clinical spectrum. CNAs levels were quantified in plasma from *P. vivax* patients with different clinical presentations. (A) Amplification of the genomic sequence of hTERT by qPCR in four healthy controls, and *P. vivax* patients (Pv_01 to 04) scored according to clinical/hematological parameters. Only four patients are shown for illustration purposes. (B) Correlation between the final clinical score of *P. vivax* patients ($n = 21$) and their plasma CNAs levels (pg/ml) (Spearman $r = 0.6092$, $p = 0.0034$), or their Ct for the amplification of the hTERT (Pearson $r = -0.7897$, $p < 0.0001$). doi:10.1371/journal.pone.0019842.g002

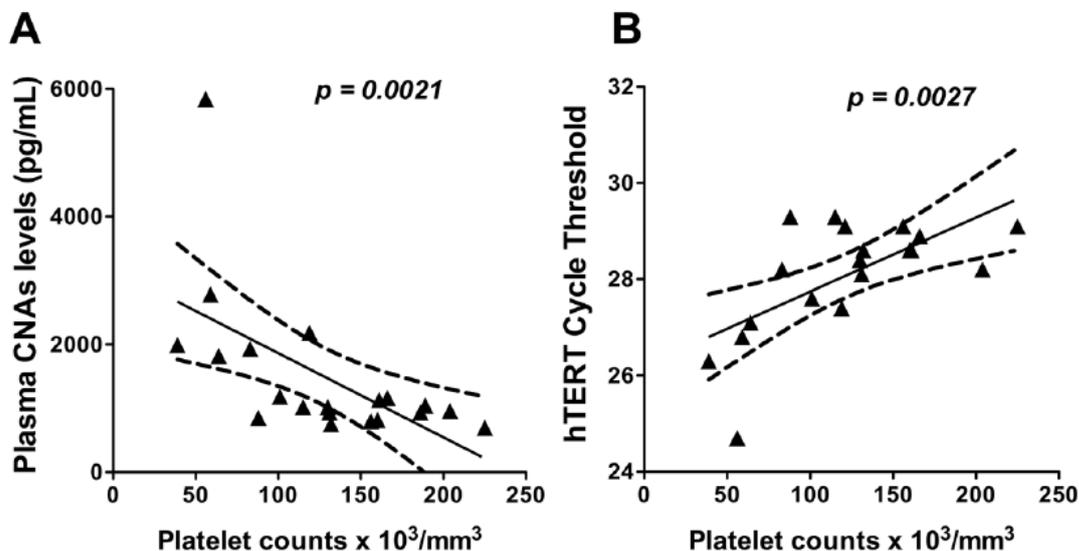


Figure 3. Correlation between plasma CNAs levels and malaria vivax thrombocytopenia. Correlation of plasma CNAs levels with platelet counts in symptomatic vivax malaria patients. The dsDNA levels measured by Pico Green (A) and the mean cycle threshold for hTERT amplification (B) were plotted against the platelet counts. Spearman ($r = -0.6451$) and Person ($r = 0.6479$) correlations were used respectively in A and B. A p value < 0.05 was considered significant. doi:10.1371/journal.pone.0019842.g003

In six patients attended at the FMT-HVD (Manaus, AM), the CNAs levels were further assessed 7 days after antimalarial chemotherapy. As shown in Fig. 4A, CNAs levels decreased after specific treatment ($p = 0.0428$). The comparison of the mean Ct obtained after qPCR amplification of the hTERT in plasma samples from acute vs. treated patients confirmed these findings ($p = 0.0243$) (Fig. 4B). Seven days post-treatment, the platelet counts returned to physiological levels (Fig. 4C). These data were further confirmed in patients from Cuiaba area ($n = 10$) (Figure S2B). In those samples, CNAs levels were significantly diminished after 7–10 days of chemotherapy.

It is reasonable to speculate that parasite specific DNA is present among the CNAs circulating in plasma. To confirm this, we assessed the levels of *P. vivax* derived-CNAs in plasma in an attempt to investigate their use as a streamline diagnostic and prognostic tool. For this purpose, specific primers were designed to amplify a genomic sequence unique to *P. vivax*. As expected, amplification of this genomic sequence was not detected in samples from healthy donors (Fig. 5A). Furthermore, although parasite specific CNAs levels were weakly associated with the presence of fever at the time of blood sampling (Ct vs. body temperature, $r = -0.5535$, $p = 0.0497$) (Fig. 5B), they were not

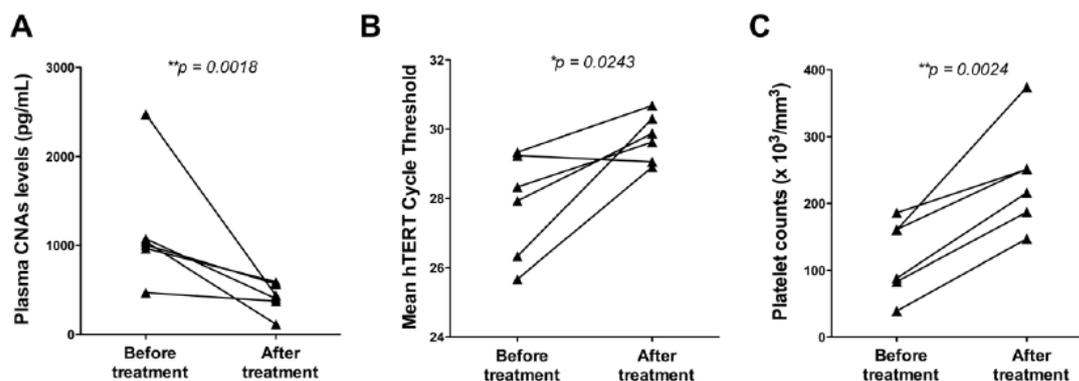


Figure 4. Plasma CNAs levels decrease after anti-malarial chemotherapy. For 6 patients who showed up during convalescence, the CNAs levels in plasma were assessed by (A) fluorescence quantification of dsDNA with the Pico Green methodology or (B) comparison of the mean cycle threshold for the qPCR amplification of hTERT genomic sequence. (C) platelet counts measured during admission and convalescence. Statistics were performed as follows: Mann-Whitney test for panel A, and two tailed t test for panels b and C. A p value < 0.05 was considered significant. doi:10.1371/journal.pone.0019842.g004

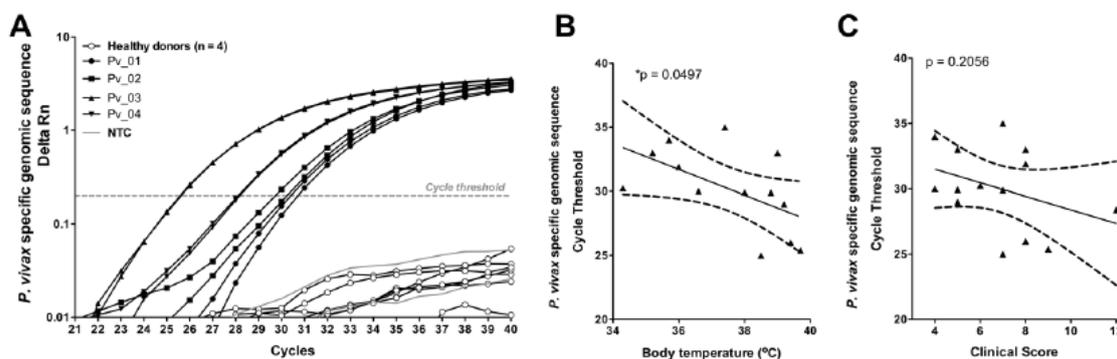


Figure 5. *Plasmodium* specific genomic sequences circulating in plasma from *P. vivax* patients. The presence and levels of *P. vivax* specific plasma CNAs were investigated in samples from *P. vivax* patients with different clinical presentations by qPCR amplification of a specific *P. vivax* genomic sequence. (A) For illustration purpose, qPCR amplification of a *P. vivax* specific genomic sequence in four healthy controls, and four *P. vivax* patients (Pv_01 to 04) scored according to clinical/hematological parameters is shown. (B) Pearson correlation between the Ct of parasite specific genomic sequence and the body temperature measured at the time of blood collection ($r = -0.5535$, $p = 0.0497$) or the clinical score of the patients ($r = -0.3604$, $p = 0.2056$). A p value < 0.05 was considered significant. doi:10.1371/journal.pone.0019842.g005

associated with the clinical spectrum of the disease ($r = -0.3604$, $p = 0.2056$) (Fig. 5C). Also, parasite specific CNAs genomic sequences did not reflect peripheral parasitemia ($r = -0.3735$, $p = 0.1884$).

Discussion

This study is the first to investigate the use of plasma levels of cell-free circulating nucleic acids (CNAs) as a marker of *P. vivax* malaria morbidity. We show here that CNAs levels in plasma from *P. vivax* patients increase linearly with the clinical spectrum of the disease. This confirms that this powerful marker can also be used in malaria as a sensitive indicator of inflammation and injury. In fact, plasma CNAs levels have been regarded as a noninvasive universal cancer biomarker [29] as their levels have been shown to be distinctly increased in most patients with solid tumors (E.g. lung [30], colon [31], cervical [32], ovarian [33], breast [34], testis [35], bladder [36], and prostate [37]), allowing their discrimination from patients with nonmalignant disease or healthy individuals. Plasma CNAs levels have also been associated with the severity of several other inflammatory disorders [17,18,19,20,21,22,23].

Other molecules circulating in plasma, such as adhesion molecules [38], pro-inflammatory cytokines [39], the superoxide dismutase-1 [14], and, more recently, microparticles [10], have been suggested as biomarkers for human *P. vivax* malaria as their levels are often associated with malaria clinical manifestations. Nevertheless, we believe that CNAs offer a more sensitive tool since qPCR amplification of hTERT, a specific single copy human genomic sequence, revealed that levels as low as 100 femtogram of CNAs could be detected circulating in plasma, and were able to discriminate different degrees of disease morbidity (Figure S1).

We show here that plasma CNAs reach physiologic levels after 7–10 days of antimalarial chemotherapy and patient's recovery. It has been shown that clearance of cell-free DNA from the bloodstream occurs rapidly; the half-life time of fetal DNA in the blood of mothers after delivery was approximately 16 minutes [40]. Cell-free DNA seems to be eliminated by different manners including renal and hepatic mechanisms as well as degradation by plasma nucleases [29]. It is unknown whether a different clearance time is also contributing to the higher levels of cell-free DNA in

malaria patients. The kinetics by which CNAs levels rise and fall during acute malaria requires further investigation.

The source of CNAs levels during malaria remains unknown. Apoptosis and necrosis have been pointed as the main source of cell-free DNA circulating in blood [41,42]. Usually apoptosis-induced cleavage of DNA results in DNA fragments of approximately 180 bp; thus, quantification of a small and a long PCR product allows indirect inferences about the underlying cell-death entity. Although apoptosis has not been directly addressed in this study, our results do not rule out this possibility, as most of the fragments amplified were in the range of 90 bp to be suitable for qPCR analysis. In malaria, apoptosis is a process highly represented in the annotation of gene expression profile of acute infection as revealed by several microarray studies involving both human and mouse models [43,44]. Nevertheless, it was recently shown that apoptosis and or necrosis might not be the main sources of CNAs in plasma of patients with a variety of other conditions, and active release of free circulating DNA by living cells was pointed as a plausible mechanism [45]. At this time, it is unknown whether apoptosis and/or DNA release contribute to the higher levels of cell-free DNA observed here in *P. vivax* patients.

Thrombocytopenia (platelet counts $< 150,000/\text{mm}^3$) is a common hematological finding in patients with *Plasmodium* infection particularly in vivax malaria [28,46]. Recent studies carried out in northwest India highlighted the higher occurrence of severe thrombocytopenia in *P. vivax* in comparison to either *P. falciparum* mono-infection or mixed infections [47,48]. We show here that CNAs levels in vivax malaria strongly correlate with a drop in platelet counts, a data confirmed in two different hospitals of the Amazon area. Although it is not possible, at this point, to speculate on the role of platelets in the increase of CNAs levels in plasma, our results indicate that CNAs might contribute to cell activation and inflammation that are associated with malaria infection.

Although *P. falciparum* infection was not the main scope of the present study, by having access to a small group of patients, it was possible to demonstrate that CNAs levels are increased during acute *P. falciparum* infection. In this malaria model, increased CNAs levels in plasma were associated with thrombocytopenia and the occurrence of fever at the time of blood collection (Figure

S3). While these results support the association between CNAs and malaria, the size of our sample precludes any definitive comparison between *P. falciparum* and *P. vivax* infection. Further studies will be required to properly address this question.

In uncomplicated *P. vivax* malaria, we have recently shown that the levels of circulating platelet-derived microparticles (PMPs) are associated with the clinical spectrum of disease, including fever and prolonged time with malaria symptoms [10]. The fact that CNAs levels as well as PMPs were higher in febrile and symptomatic vivax patients suggests a possible association with PMP and CNAs. MPs are important carriers of membrane components or bioactive molecules and their association with nucleic acids has been proposed [49]. The presence of host and/or parasite DNA associated with MPs circulating in plasma and their role in inflammation is currently being addressed in your laboratory.

To investigate if parasite derived-sequences are part of the pool of nucleic acids circulating in blood during vivax malaria, and if these sequences correlate with disease morbidity, we assessed the levels of a parasite specific single copy genomic sequence in CNAs purified from *P. vivax* patients. Although our results revealed that host and parasite sequences are part of the total plasma CNAs levels in acute *P. vivax* infected patients, the levels of a host specific (hTERT) but not parasite specific sequence correlated with vivax clinical disease. These results are in agreement with a recently study carried out in the Amazon area in which high parasitemia was not the rule among patients with severe disease according to the WHO criteria [50].

Whether CNAs are merely inert debris of cellular injury, or if they possess pro-inflammatory properties and are, therefore, players in the immunopathogenic basis of malaria requires further investigation. Although at this point is not possible to draw conclusions, their role in the inflammatory response during malaria cannot be ruled out. In fact, it is well known that dying cells spill their content and release a myriad of endogenous pro-inflammatory danger signals, including proteins, nucleic acids, extracellular matrix components, lipid mediators and adenosine triphosphate (ATP) [51]. These endogenous danger signals have been shown to play important roles in inflammation [51,52,53]. As human and parasite derived nucleic acid sequences have been shown to possess immune-stimulatory properties, the implication of CNAs in cellular activation and in innate immunity is likely. Likewise, the frequency of immune stimulatory vs. non-stimulatory circulating nucleic acids in plasma from patients with different clinical outcomes would provide important insights into the role of CNAs in malaria pathogenesis.

In conclusion, we show that host circulating nucleic acids in plasma constitute a reliable and non-invasive biomarker to evaluate vivax malaria morbidity. CNAs levels were closely associated with *P. vivax* malaria clinical spectrum, and may have a role in malaria-induced inflammation. Given the enormous economic scourge of *P. vivax* in endemic areas, plasma CNAs levels provide a welcome prognostic tool to rapidly identify potentially severe cases and improve clinical management.

Materials and Methods

Study area and subjects

This study was conducted in May 2010, at Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), a tertiary care center for infectious diseases in Manaus (3°8'S, 60°1'W), the capital of the state of Amazonas, Brazil. Manaus is clearly part of a new frontier in the economic development of the Amazon and is considered as one of the leading cities in terms of

number of *P. vivax* malaria cases in Latin America [54]. In 2009, a total of 19,698 malaria cases were reported in Manaus with a large dominance of vivax (92.6%) over falciparum malaria [55].

Individuals who sought care at FTM-HVD and whose thick blood smear was positive for *P. vivax* were invited to participate in the study. Exclusion criteria included: (i) refuse or inability to sign the informed consent; (ii) age <18 years; (iii) pregnant women; (iv) mixed infection with *P. falciparum* or *P. malariae*; (v) any other comorbidity that could be traced. Twenty-one patients, aging 21 to 72 years, were enrolled in the study. Selected volunteers were all negative for *P. falciparum* and/or *Plasmodium malariae* infection by both microscopic examination and a nested-PCR, carried out latter in our laboratory. Clinical and demographical data were acquired through a standardized questionnaire, and the hematological profiles were assessed by automated complete blood count carried out at FMTA hematology facility. Table 1 summarizes demographical, epidemiological, parasitological and hematological data of *P. vivax* infected-volunteers.

The study was approved by the Ethical Review Board of the René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Brazilian Ministry of Health (Reporter CEPISH/CPqRR 05/2008). All participants were instructed about the objectives of the study and signed an

Table 1. Characteristics of the *Plasmodium vivax* patients enrolled in the study.

CHARACTERISTICS	
<i>Demographical and epidemiological</i>	
Sex, male/female, proportion	13/8
Age, median, range	49 (21–72)
N° of previous malaria episodes	3 (0–30)
<i>Parasitological and hematological, median (range)</i>	
Parasitemia, parasites/μl of blood	305 (25–2255)
Hematocrit %	42.6 (30.5–48.9)
Hemoglobin levels g/dL	13.2 (9.5–14.9)
WBC counts ×10 ⁶ /mm ³	4.9 (2–8.6)
RBC counts ×10 ⁶ /mm ³	4.8 (3.57–5.42)
Platelet counts ×10 ⁹ /mm ³	125.5 (39–225)
MCV (fL)	89.3 (82.9–96)
MPV (fL)	9.8 (8.1–13.2)
MCH (pg)	27.1 (25–30.1)
MCHC (g/dL)	30.6 (29.8–33.2)
<i>Clinical parameters</i>	
Duration of symptoms in days, median, (range)	3 (>1–20)
Fever at the time of blood sampling, n (%)	7 (33.3%)
<i>Symptoms in the last 3 days, n (%)</i>	
Fever	21 (100%)
Myalgia	21 (100%)
Chills	19 (90.5%)
Headache	18 (85.7%)
Nausea	15 (71.4%)
Anorexia	12 (57.1%)
Vomiting	6 (28.6%)
Dyspnea	6 (28.6%)
Diarrhea	3 (14.3%)

doi:10.1371/journal.pone.0019842.t001

informed consent in accordance with guidelines for human research, as specified by the Brazilian National Council of Health (Resolution 196/96). Patients diagnosed with vivax malaria were treated according to the standard protocols recommended by the National Malaria Control Program (chloroquine plus primaquine).

Peripheral blood samples (10 mL in EDTA) were obtained from patients on admission and, in those who attended follow-up, during convalescence 7 days later. Plasma samples from 14 age-matched malaria-unexposed donors from Belo Horizonte, a malaria free area, were used as baseline control. Aiming to avoid bias of selection, we further include an additional group of *P. vivax* patients (n = 14; age range, 18–41 years) from a second hospital of the Amazon area, Julio Muller Hospital, Cuiaba, MT, which was located about 1500 miles from Manaus city. CNAS levels were also evaluated in plasma samples from a small group of *P. falciparum* patients (n = 9; age range, 18–52 yrs.). Plasma samples were isolated immediately after blood sampling and stored at -80°C until use.

Malaria vivax clinical score

Since at present no clear criteria define vivax malaria severity, the present study used the World Health Organization standard criteria built for *P. falciparum* malaria [50]. One patient (Pv_04, Table 1) presented clinical signs of severe malaria according to the WHO criteria. This patient presented with hyperbilirrubinemia (total bilirubin = 4.3 mg/dL) and acute renal failure (creatinin = 2.3 mg/dL), and other common infectious diseases were ruled out during his hospitalization. To define different degrees of morbidity for the remaining *P. vivax* malaria patients, we adapted the criteria originally described by Karunaweera et al [56], and previously validated in the Amazon area [57]. Briefly, the occurrence of fever at the time of blood collection and other 8 signs and/or symptoms that commonly accompany a malarial infection - headache, chills, myalgia, nausea, vomiting and diarrhea - were addressed into the questionnaire applied to each patient. Additionally, hematological parameters were also included in the score calculation: white blood cells (WBC), red blood cells (RBC) and platelets counts, hemoglobin and hematocrit levels (Table 1). Numerical scores of 0 or 1 were assigned to clinical and hematological parameters reported as absent (or within normal range) or present (or outside normal range), respectively. For those 15 parameters analyzed, the sum of scores provides the patient's final clinical score, as shown in Table S1 (supporting information). This semi quantitative clinical assessment enabled numerical comparisons between the plasma CNAs levels and the clinical spectrum of vivax malaria.

Purification and quantification of CNAs from plasma

Cell-free circulating nucleic acids (CNAs) were isolated from plasma from *P. vivax* patients or healthy donors with QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, CA, US) according to the manufacturer's instructions. Two different methodologies were used to quantify CNAs levels in plasma: (i) amplification of the genomic sequence of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT), an ubiquitous single copy gene mapped on 5p 15.33, used here as a marker of the total amount of DNA present in plasma samples. For that, we used the following specific primers Fw: 5'GGC ACA CGT GGC TTT TCG 3'; Rev: 5' GGT GAA CCT GCT AAG TTT ATG CAA 3', previously described [58]. To normalize the amount of DNA in plasma samples, 5 ng of Salmon Sperm DNA solution (Invitrogen, CA, USA) were spiked into plasma samples before purification of CNAs. The genomic sequence of the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) Y-chromosome

specific marker was amplified in parallel with hTERT using the specific primers: Fw: 5' AGG CAA CCC TTG CTC GAA TT 3'; Rev 5' TGG GCA CAT GGC TTA CCG 3'; (ii) total dsDNA levels in plasmas were also quantified fluorometrically using the Quant-iT™ Pico Green Reagent (Molecular Probes, Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

To identify parasite derived sequences in plasma samples from infected patients the following primer pair Fw: 5' CAA CAG GTC CTT CAC GCT TAG TG 3'; Rev: 5' CGA CAG CAC CAT TGG CG 3' was designed based on the *P. vivax* genomic sequence [59] retrieved from PlasmoDB version 6.4 (<http://plasmodb.org/plasmo/>). The Primer Express software (PE Applied Biosystems) was used for primer design. Quantitative PCR reactions were carried out in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System SDS (PE Applied Biosystems, CA, USA). The temperature profile was 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. The cycle threshold for DNA quantification was set to 0.2 for all experiments in this study.

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, CA, US). Differences in the means were analyzed using two-tailed student's t test or Mann-Whitney test when data did not fit a Gaussian distribution. Spearman nonparametric correlation coefficient was used to analyze the association between the variables.

Supporting Information

Figure S1 Absolute quantification of hTERT levels in plasma from *P. vivax* patients. The human genomic sequence of hTERT was amplified by PCR using the primers described in M&M. The concentration of the PCR product was determined spectrophotometrically using Nanodrop. (A) A standard curve was built by re-amplifying known amounts of the hTERT PCR product in 10-fold serial dilutions. (B) Amplification of hTERT in CNAs samples purified from healthy donors or malaria patients. (C) Results of interpolated hTERT concentrations in CNAs samples purified from plasma of healthy donors or malaria patients. Levels are expressed as pg/ml. Differences were calculated by the Mann-Whitney test. A p value < 0.05 was considered significant. (TIFF)

Figure S2 Plasma CNAs levels correlates with vivax thrombocytopenia in a different Brazilian endemic area, Cuiaba, Mato Grosso. Correlation of plasma CNAs levels with platelet counts in 14 symptomatic vivax malaria patients attended at the hospital Julio Muller, Cuiaba, MT. (A) The mean cycle threshold for hTERT amplification was plotted against the platelet counts (Pearson $r = 0.745$, $p = 0.0072$). (B) Assessment of CNAs levels and mean cycle threshold for hTERT amplification in samples from 10 out of 14 patients who returned after 7–10 days post treatment. (TIFF)

Figure S3 Plasma CNAs levels correlates with thrombocytopenia in *P. falciparum* patients. CNAs levels were assessed in plasma from 9 samples from *P. falciparum* patients and correlated with (A) their platelet counts and (B) body temperature measured at the time of blood collection. Fluorometric dsDNA measurement by PicoGreen and qPCR amplification of hTERT genomic sequence were used for comparisons. (TIFF)

Table S1 Patient final clinical score and plasma CNAs levels.
(DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank the Program for Technological Development in Tools for Health - PDTIS - FIOCRUZ for use of its facilities; Belisa Maria Lopes Magalhães and Raimunda Ericilda da Silva for their help with patients in the endemic area. The authors would also like to thank the Helixis Incorporation (currently Illumina) for the PIXO

References

- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, et al. (2010) The international limits and population at risk of Plasmodium vivax transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e774.
- Kochar D, Saxena V, Singh N, Kochar S, Kumar S, et al. (2005) Plasmodium vivax malaria. *Emerg Infect Dis* 11: 132–134.
- Kochar D, Das A, Kochar S, Saxena V, Sirohi P, et al. (2009) Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg* 80: 194–198.
- Poesoprodjo J, Fobia W, Kenangalem E, Lampah D, Hasanuddin A, et al. (2009) Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis* 48: 1704–1712.
- Tjitra E, Anstey N, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, et al. (2008) Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 5: e128.
- Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder J, et al. (2008) Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 5: e127.
- Alexandre M, Ferreira C, Siqueira A, Magalhães B, Mourão M, et al. (2010) Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16: 1611–1614.
- Anstey N, Russell B, Yeo T, Price R. (2009) The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* 25: 220–227.
- Hemmer C, Holst F, Kern P, Chikwaka C, Dietrich M, et al. (2006) Stronger host response per parasitized erythrocyte in Plasmodium vivax or ovale than in Plasmodium falciparum malaria. *Trop Med Int Health* 11: 817–823.
- Campos F, Franklin B, Teixeira-Carvalho A, Filho A, de Paula S, et al. (2010) Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. *Malar J* 9: 327.
- Karunaweera N, Grau G, Gamage P, Carter R, Mendis K (1992) Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in Plasmodium vivax malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3200–3203.
- Andrade B, Reis-Filho A, Souza-Neto S, Clarenço J, Camargo L, et al. (2010) Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9: 13.
- Karunaweera N, Wijesekera S, Wanasekera D, Mendis K, Carter R (2003) The paroxysm of Plasmodium vivax malaria. *Trends Parasitol* 19: 188–193.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LM, et al. (2010) Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e650.
- Mandel P, Metais P (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 142.
- Leon S, Shapiro B, Sklaroff D, Yaros M (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37: 646–650.
- Chen J, Meier S, Urbonaviciute V, Rödel F, Wilhelm S, et al. (2007) Sensitive detection of plasma/serum DNA in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40: 307–310.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel H (1973) The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* 52: 198–204.
- Rani S, Clynes M, O'Driscoll L (2007) Detection of amplifiable mRNA extracellular to insulin-producing cells: potential for predicting beta cell mass and function. *Clin Chem* 53: 1936–1944.
- Lam N, Rainer T, Chan L, Joyn T, Lo Y (2003) Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem* 49: 1286–1291.
- Lam NY, Rainer TH, Wong LK, Lam W, Lo YM (2006) Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation* 68: 71–78.
- Antonatos D, Patsilimakos S, Spanodimos S, Koronikitas P, Tsigas D (2006) Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 278–281.
- Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, et al. (2003) Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 327: 95–101.
- Moreira VG, Prieto B, Rodriguez JS, Alvarez FV (2010) Usefulness of cell-free plasma DNA, procalcitonin and C-reactive protein as markers of infection in febrile patients. *Ann Clin Biochem* 47: 253–258.
- Butt A, Swaminathan R (2008) Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Ann N Y Acad Sci* 1137: 236–242.
- Ombrello C, Block RC, Morrell CN (2010) Our expanding view of platelet functions and its clinical implications. *J Cardiovasc Transl Res* 3: 539–546.
- Cox D, McConkey S (2010) The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 67: 557–568.
- Araujo C, Lacerda M, Abdalla D, Lima E (2008) The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 517–521.
- Ellinger J, Müller S, Stadler T, Jung A, von Ruecker A, et al. (2009) The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urol Oncol*.
- Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, et al. (2001) Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 61: 4675–4678.
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber H, Hines O, et al. (2006) Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 52: 1062–1069.
- Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Treviño-Cuevas H, Taja-Chayeb L, García-López P, et al. (2003) Circulating nucleosomes and response to chemotherapy: an in vitro, in vivo and clinical study on cervical cancer patients. *Int J Cancer* 104: 663–668.
- Chang HW, Lee SM, Goodman SN, Singer G, Cho SK, et al. (2002) Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1697–1703.
- Huang ZH, Li LH, Hua D (2006) Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett* 243: 64–70.
- Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo F, Mueller S, et al. (2009) Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol* 181: 363–371.
- Ellinger J, Bastian P, Ellinger N, Kahl P, Perabo F, et al. (2008) Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: a prognostic entity. *Cancer Lett* 264: 274–280.
- Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzke S, Jung M, et al. (2004) Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer Lett* 205: 173–180.
- Jakobsen P, Morris-Jones S, Ronn A, Hviid L, Theander T, et al. (1994) Increased plasma concentrations of sCAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with Plasmodium falciparum or P. vivax malaria and association with disease severity. *Immunology* 83: 665–669.
- Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M (1989) Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. *Am J Med* 87: 139–143.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, et al. (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 64: 218–224.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmaier FO, et al. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61: 1659–1665.
- Atamaniuk J, Ruzicka K, Stuhlmeier KM, Karimi A, Eigner M, et al. (2006) Cell-free plasma DNA: a marker for apoptosis during hemodialysis. *Clin Chem* 52: 523–526.
- Lovegrove F, Gharib S, Patel S, Hawkes C, Kain K, et al. (2007) Expression microarray analysis implicates apoptosis and interferon-responsive mechanisms in susceptibility to experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 171: 1894–1903.
- Miu J, Hunt N, Ball H (2008) Predominance of interferon-related responses in the brain during murine malaria, as identified by microarray analysis. *Infect Immun* 76: 1812–1824.
- van der Vaart M, Pretorius P (2008) Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci* 1137: 18–26.
- Shaikh Q, Ahmad S, Abbasi A, Malik S, Sahito A, et al. (2009) Thrombocytopenia in malaria. *J Coll Physicians Surg Pak* 19: 708–710.
- Kochar DK, Tanwar GS, Khatri PC, Kochar SK, Sengar GS, et al. (2010) Clinical features of children hospitalized with malaria—a study from Bikaner, northwest India. *Am J Trop Med Hyg* 83: 981–989.

Circulating Nucleic Acids: Malaria Severity Marker

48. Kochar DK, Das A, Kochar A, Middha S, Acharya J, et al. (2010) Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets* 21: 623–627.
49. Anker P, Stroun M (2002) Progress in the knowledge of circulating nucleic acids: plasma RNA is particle-associated. Can it become a general detection marker for a cancer blood test? *Clin Chem* 48: 1210–1211.
50. WHO (2000) Severe falciparum malaria. 90 p.
51. Kono H, Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8: 279–289.
52. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, et al. (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330: 362–366.
53. Hornung V, Latz E (2010) Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 10: 123–130.
54. Saraiva M, Amorim R, Moura M, Martinez-Epinosa F, Barbosa M (2009) [Urban expansion and spatial distribution of malaria in the municipality of Manaus, State of Amazonas]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 515–522.
55. Oliveira-Ferreira J, Lacerda M, Brasil P, Ladislau J, Tauil P, et al. (2010) Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
56. Karunaweera N, Carter R, Grau G, Mendis K (1998) Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 58: 204–210.
57. Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA, Ceravolo IP, Malafrente RS, et al. (2010) Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 82: 185–193.
58. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, et al. (2003) Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 21: 3902–3908.
59. Carlton J, Adams J, Silva J, Bidwell S, Lorenzi H, et al. (2008) Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757–763.

9 Referências Bibliográficas

Aidoo M, McElroy PD, Kolczak MS, Terlouw DJ, ter Kuile, FO, Nahlen B, Lal AA, Udhayakumar V. Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. *Genet Epidemiol* 2001; 21(3):201-11.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, Alecrim MGC. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1611-14.

Andrade B B, T Araújo-Santos NF, Luz R, Khouri MT, Bozza LM, a Camargo A, Barral VM, Barral-Netto M. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. *J Immunol* 2010;185: 1196-204.

Anker P, Stroun M. Progress in the knowledge of circulating nucleic acids: plasma RNA is particle-associated. Can it become a general detection marker for a cancer blood test? *Clin Chem* 2002; 48: 1210-1211.

Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* 2009; 25: 220-7. 1.

Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* 2007 Feb;195(4):589-96.

Araujo CF, Lacerda MVG, Abdalla DSP, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008 Set;103(6):517-21.

Arosio B, Bergamaschini L, Galimberti L, La Porta C, Zanetti M, Calabresi C, Scarpini E, Annoni G, Vergani C. +10 T/C polymorphisms in the gene of transforming growth factor-beta1 are associated with neurodegeneration and its clinical evolution. *Mech Ageing Dev* 2007 Out; 128(10):553-7.

Asghar T, Yoshida S, Kennedy S, Negoro K, Zhuo W, Hamana S, et al. The tumor necrosis factor-alpha promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population. *Hum Reprod (Oxford, England)*. 2004 Nov;19(11):2509-14.

Ashavaid TF, Todur SP, Kondkar AA, Nair KG, Shalia KK, Dalal JJ, Rajani R, Ponde CK. Platelet polymorphisms: Frequency distribution and association with coronary artery disease in an Indian population. *Platelets* 2011 Oct;22(2):85-91.

Awandare GA, Kempaiah P, Ochiel DO, Piazza P, Keller CC, Perkins DJ. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *Am J Hematol* 2011 Feb; 86(2):155-62.

Awandare GA, Martinson JJ, Were TC, Ouma GC, Davenport JM, Ong'echa W, Wang L, Leng RE, Ferrell R, Bucala R, Perkins DJ. MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Severe Malarial Anemia. *J Infect Dis* 2009 Aug;200: 629-37.

Babady NE, Sloan LM, Rosenblatt JE, Pritt BS. Short Report : Detection of Plasmodium knowlesi by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81(3):516-518.

Barton a, Lamb R, Symmons D, Silman a, Thomson W, Worthington J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphism is associated with susceptibility to but not severity of inflammatory polyarthritis. *Genes Immun* 2003 Oct ;4(7):487-91.

Baugh J a, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol* 2003 Oct ;179(1):15-23.

Baugh JAS, Chitnis SC, Donnelly J, Monteiro X, Lin BJ, Plant F, Wolfe PK, Gregersen & R. Bucala. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2002 Mai; 3: 170-6.

Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993 Oct; 365(6448):756-9.

Bode AP & Hickerson DH. Characterization and quantitation by flow cytometry of membranous microparticles formed during activation of platelet suspensions with ionophore or thrombin. *Platelets* 2000 Ago; 11:259-71.

Boutlis CS, Riley EM, Anstey NM, de Souza JB. Glycosylphosphatidylinositols in malaria pathogenesis and immunity: potential for therapeutic inhibition and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005 297:145-85.

Bronner U, Divis PCS, Färnert A, Singh B. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malar J* 2009 Jan ;815.

Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G. Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF) to chromosome 22q11.2. *Genomics* 1997 Jan; 39(2):235-6.

Buruiana FE, Solà I, Alonso-Coello P. Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Nov; 11:CD005109.

Calandra T, Spiegel L a, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Set;95(19):11383-8.

Cambien FS, Ricard A, Troesch C, Mallet L, Generenaz A, Evans D, Arveiler G, Luc JB, Ruidavets & O, Poirier. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996 Nov; 28: 881-7.

- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008 Oct;455(7214):757-63.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors *Immunology : Cell*. 1975 Set;72(9):3666-3670.
- Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira P a, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes. *J Infect Dis* 2010 Jun;202
- Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli a U. Cellular responses to *Plasmodium falciparum* major surface antigens and their relationship to human activities associated with malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1999 Abr ;60(4):674-9.
- Cerávolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJF, Brito CF a, Souza JM, et al. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005 Jun;72(6):675-81.
- Chang KH & Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol* 2004 Dez; 34: 1501-16.
- Chaudhuri A, Zbrzezna V, Johnson C, Nichols M, Rubinstein P, Marsh WL & Pogo AO. Purification and characterization of an erythrocyte membrane protein complex carrying Duffy blood group antigenicity. Possible receptor for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* malaria parasite. *J Biol Chem* 1989 Ago 264: 13770-4.
- Clark I a, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J* 2006 Jan ;585.
- Clark IA. Along a TNF-paved road from dead parasites in red cells to cerebral malaria, and beyond. *Parasitology*. 2009 Oct;136(12):1457-68.

- Clark I a, Alleva LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther* 2010 Aug ;128(3):519-548.
- Coltel N, Combes V, Wassmer SC, Chimini G, Grau GE. Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. *Microbes Infect* 2006 Jul; 8(8):2305-16.
- Combes V, Coltel N, Alibert M, van Eck M, Raymond C, Juhan-Vague I, Grau GE, Chimini G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol* 2005 Jan; 166(1):295-302.
- Coppinger J a, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004 Mar;103(6):2096-104.
- Cordeiro C a, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Oréfica F, et al. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 Mai;49(5):1979-82.
- Costa GC, Costa Rocha MO da, Moreira PR, Menezes CAS, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2009 Fev;199(3):451-4.
- Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS pathogens*. 2010 Jan ;6(1):e1000744.
- Cox D, McConkey S. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 2010 Fev;67(4):557-68.
- Cserti-Gazdewich CM, Mayr WR, Dzik WH. Plasmodium falciparum malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV). *Vox sanguinis* 2011 Jan;100(1):99-111.

David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966 Jul;56: 72-7.

Jong YP de, Abadia-Molina a C, Satoskar a R, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion W a, et al. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2001 Nov ;2(11):1061-6.

De Lacerda MV, Zackiewicz C, Alecrim WD & Alecrim MG. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options? *Rev Soc Bras Med Trop* 2007 Ago; 40:489-90.

Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 Aug ;44(8):1782-5.

Donn RP, Plant D, Jury F, Richards HL, Worthington J, Ray DW, et al. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 2004 Set;123(3):484-7.

Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, Meazza C, Zeggini E, Lunt M, et al. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002 Set;46(9):2402-9.

Donnelly SC, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1997 Nov; 3(11):502-7.

Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, et al. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: a prognostic entity. *Cancer lett* 2008 Jun;264(2):274-80.

Faille D, Combes V, Mitchell AJ, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi M-C, et al. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J* 2009 Oct;23(10):3449-58.

Falvo JV, Ugliarolo a M, Brinkman BM, Merika M, Parekh BS, Tsai EY, et al. Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. *Mol Cell Biol* 2000 Mar;20(6):2239-47.

Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007 Jan ;1775(1):181-232.

Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, Lauw F, Ropert C, Oliveira RB de, et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Apr;106(14):5789-94.

Gahan PB. Circulating nucleic acids in plasma and serum: roles in diagnosis and prognosis in diabetes and cancer. *Infect Disord Drug Targets* 2008;8(2):100-8.

García-González MA, Lanas A, Quintero E, Nicolás D, Parra-Blanco A, Strunk M, Benito R, Angel Simón M, Santolaria S, Sopeña F, Piazuolo E, Jiménez P, Pascual C, Mas E, Irún P, Espinel J, Campo R, Manzano M, Geijo F, Pellisé M, González-Huix F, Nieto M, Espinós J, Titó L, Bujanda L, Zaballa M. Gastric cancer susceptibility is not linked to pro-and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: a Nationwide Multicenter Study in Spain. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1878-92.

Genton B, D'Acromont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS medicine* 2008 Jun ;5(6):e127.

George N, Mcmanus M, Thoi LL, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 2011;834-840.

Gibson a W, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance

the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* (Baltimore, Md. : 1950). 2001 Mar ;166(6):3915-22.

Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Eduardo P, Ribolla M, et al. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II . Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *J Immunol* 2007 Jun;102:271-276.

Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Della Ragione F, et al. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem* 2003 Out;49(10):1664-7.

Grau GE, Lambert PH, Vassalli P, Piguet PF. Tumor necrosis factor (TNF) and pathology; its relationships with other cytokines. *Schweiz Med Wochenschr* 1989;119(49):1756-61.

Gregersen PK, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor, MIF alleles, and the genetics of inflammatory disorders: incorporating disease outcome into the definition of phenotype. *Arthritis Rheum* 2003 May ;48(5):1171-6.

Guerra C a, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 2010 Jan; 4(8):e774.

Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. *Hum Immunol* 2001 Nov; 62(11):1191-9.

Haldar K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009 Jan;87-93.

Han C, Lin Y, Shan G, Zhang Z, Sun X, Wang Z, Wei C, Deng Y, Zhang L, Bu L, Shao D, Wang H. Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 17(10):1524-32. Epub 2010 Aug 11.

- Hemmer CJ, Holst FGE, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 2006 Jun;11(6):817-23.
- Heyde HC van der, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* 2006 Nov ;22(11):503-8.
- Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M. Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 Mai;169(9):1014-8.
- Hoi AY, Morand EF, Leech M. Is macrophage migration inhibitory factor a therapeutic target in systemic lupus erythematosus? *Immunol Cell Biol* 2003 Out ;81(5):367-73.
- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki a, Hadley TJ, et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science (New York, N.Y.)*. 1993 Ago;261(5125):1182-4.
- Huebinger RM, Rivera-Chavez F, Chang L-Y, Liu M-M, Minei JP, Purdue GF, et al. IL-10 polymorphism associated with decreased risk for mortality after burn injury. *J Surg Res* 2010 Nov;164(1):e141-5.
- Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 2003 Set;24(9):491-499.
- Jain V, McClintock S, Nagpal AC, Dash AP, Stiles JK, Udhayakumar V, et al. Macrophage migration inhibitory factor is associated with mortality in cerebral malaria patients in India. *BMC Res Notes* 2009 Jan ;236.

Jain V, Singh PP, Silawat N, Patel R, Saxena A, Bharti PK, et al. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in Plasmodium vivax malaria patients from central zone of India. *Acta Trop* 2010 Mar;113(3):263-268.

Jiménez S, Tàssies D, Espinosa G, García-Criado a, Plaza J, Monteagudo J, et al. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008 Jun ;67(6):835-40.

Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M, Kristiansen G, et al. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer Lett* 2004 Mar ;205(2):173-80.

Jy W, Horstman LL, Arce M & Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med.* 1992 Abr;119: 334-45.

Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Mendis KN. Demonstration of anti-disease immunity to Plasmodium vivax malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998 Fev;58(2):204-10.

Karunaweera N, Wanasekara D, Chandrasekharan V, Mendis K, Carter R. Plasmodium vivax: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation. *Malar J* 2007 Jan ;662.

Katsuragawa TH, Gil LHS, Tada MS, Almeida e Silva A de, Costa JDN, Araújo MDS, et al. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. *PloS one.* 2010 Jan;5(2):e9245.

Kim J-R, Imwong M, Nandy A, Chotivanich K, Nontprasert A, Tonomsing N, et al. Genetic diversity of Plasmodium vivax in Kolkata, India. *Malar J* 2006 Jan ;571.

Koch W, Kastrati A, Bo C, Mehilli J, Beckerath NV, Scho A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001 ;159137- 144.

- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. Plasmodium vivax malaria. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jan;11(1):132-4.
- Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, et al. Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Feb ;80(2):194-8.
- Kuesap J, Hirayama K, Kikuchi M, Ruangweerayut R, Na-Bangchang K. Study on association between genetic polymorphisms of haem oxygenase-1, tumour necrosis factor, cadmium exposure and malaria pathogenicity and severity. *Malar J* 2010 Jan ;9260.
- Lam KD, Garcia RT, Nguyen LH, Trinh H, Triadafilopoulos G, Phan JT, et al. Prevalence of colorectal neoplasms in Asian Americans. *Dig Dis Sci* 2009 Jan;54(1):160-7.
- Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-pascual C, Langhorne J, Roberts DJ, et al. Malarial anemia : of mice and men Review in translational hematology Malarial anemia : of mice and men. *Blood.* 2011 Jul;18-28.
- Lan HY, Yang N, Nikolic-Paterson DJ, Yu XQ, Mu W, Isbel NM, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000 Feb ;57(2):499-509.
- Lee GH, Choi YM, Kim SH, Hong M a, Oh ST, Lim YT, et al. Association of tumor necrosis factor- α gene polymorphisms with advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2008 Abr ;23(4):977-81.
- Lehmann LE, Book M, Hartmann W, Weber SU, Schewe J-C, Klaschik S, et al. A MIF haplotype is associated with the outcome of patients with severe sepsis: a case control study. *J Transl Med* 2009 Jan;7100.

Leichtle A, Hernandez M, Lee J, Pak K, Webster NJ, Wollenberg B, Wasserman SI, Ryan AF. The role of DNA sensing and innate immune receptor TLR9 in otitis media. *Innate Immun* 2012 Jan; 18(1):3-13.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer* 1977 Mar;646-650.

López C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo M a. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene*. 2010 Nov ;467(1-2):1-12.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Roland S. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-a production in lipopolysaccharide (LPS) -stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998 ;401-406.

Lovegrove FE, Gharib S a, Patel SN, Hawkes C a, Kain KC, Liles WC. Expression microarray analysis implicates apoptosis and interferon-responsive mechanisms in susceptibility to experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 2007 Dez;171(6):1894-903.

Martiney J a, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer a S, Calandra T, et al. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun* 2000 Abr;68(4):2259-67.

Mast Q de, Groot PG de, Heerde WL van, Roestenberg M, Velzen JF van, Verbruggen B, et al. Thrombocytopenia in early malaria is associated with GP1b shedding in absence of systemic platelet activation and consumptive coagulopathy. *Br J Haematol* 2010 Dez ;151(5):495-503.

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010 Out ;107(9):1047-57.

- McDevitt M a, Xie J, Shanmugasundaram G, Griffith J, Liu A, McDonald C, et al. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med* 2006 Mai ;203(5):1185-96.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994 Out; 371(6497):508-10.
- Mfonkeu JBP, Gouado I, Kuaté HF, Zambou O, Combes V, Grau GER, et al. Biochemical markers of nutritional status and childhood malaria severity in Cameroon. *Br J Nutr* 2010 Set;104(6):886-92.
- Miller LH, Greenwood B. Malaria--a shadow over Africa. *Science* 2002 Out; 298(5591):121-2.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF & McGinniss MH. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976 Aug;295: 302-4.
- Mirghani HA, Eltahir HG, A-Elgadir TM, Mirghani YA, Elbashir MI, Adam I. Cytokine Profiles in Children with Severe Plasmodium falciparum Malaria in an Area of Unstable Malaria Transmission in Central Sudan. *J Trop Pediatr* 2010 Out;57: 392-5.
- Miu J, Hunt NH, Ball HJ. Predominance of interferon-related responses in the brain during murine malaria, as identified by microarray analysis. *Infect Immun* 2008 Mai;76(5):1812-24.
- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan T a, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science (New York, N.Y.)*. 1990 Jun ;248(4960):1230-4.
- Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe a C, Szymanska B, Tronczynska E, et al. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998 Abr ;84(2):198-206.

- Negrier C, Grenier C, Attali O, Dechavanne M & Vinciguerra C. Identification of new and known polymorphisms in glycoprotein IIb and IIIa genes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Platelets* 1998 9: 374-80.
- Newman PJ, Derbes RS & Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989 Feb;83: 1778-81.
- Newton CRJC, Valim C, Krishna S, Wypij D, Olola C, Agbenyega T, et al. The prognostic value of measures of acid/base balance in pediatric falciparum malaria, compared with other clinical and laboratory parameters. *Clin Infect Dis* 2005 Oct ;41(7):948-57.
- Nyangoto EO. Cell-mediated effector molecules and complicated malaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 Ago; 137(4):326-42.
- Oliveira-ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-ribeiro CT. Malaria in Brazil : an overview Review. *Malar J* 2010;1-15.
- Ouma C, Davenport GC, Were T, Otieno MF, Hittner JB, Vulule JM, Martinson J, Ong'echa JM, Ferrell RE, Perkins DJ. 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(5):515-24.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of IL-10 Family Cytokines in Inflammation and Diseases. *Annu Rev Immunol* 2010. [Epub ahead of print].
- Paralkar, V, Wistow, G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics* 2010; 19(1):48-51.
- Parameswaran, N, Patial, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; 20(2):87-103.

- Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Fev;104(6):1919-24.
- Pasvol G, Weatherall DJ & Wilson RJ. The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol* 1980 Jun;45:285-95.
- Pattanapanyasat K, Noulsri E, Fucharoen S, Lerdwana S, Lamchiagdhase P, Siritanaratkul N, et al. Flow cytometric quantitation of red blood cell vesicles in thalassemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2004 Jan;57(1):23-31.
- Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompoo P, Noulsri E, Lerdwana S, Sukapirom K, Siritanaratkul N & Fucharoen S. Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia. *Br J Haematol* 2007 Fev;136: 462-71.
- Periard D, Boulanger CM, Eyer S, Amabile N, Pugin P, Gerschheimer C, et al. Are circulating endothelial-derived and platelet-derived microparticles a pathogenic factor in the cisplatin-induced stroke? *Stroke* 2007 Mai;38(5):1636-8.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews* 2007 Mai;21(3):157-71.
- Picot S. [Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria?]. *Med Mal Infect* 2006 Ago;36(8):406-13.
- Piguet PF, Kan CD, Vesin C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 2002 Abr; 7(2):91-8.
- Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW. No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*. 1993 Nov;23(11):3050-3.

- Rainer TH, Wong LKS, Lam W, Yuen E, Lam NYL, Metreweli C, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003 Abr ;49(4):562-9.
- Randall LM, Kenangalem E, Lampah D a, Tjitra E, Mwaikambo ED, Handojo T, et al. A study of the TNF/LTA/LTB locus and susceptibility to severe malaria in highland papuan children and adults. *Malar J* 2010 Jan;9(1):302..
- Rao A, Kumar MK, Joseph T, Bulusu G. Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. *Malar J* 2010 Jan; 9155.
- Renner P, Roger T, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. *Clin Infect Dis* 2005 Nov;41 Suppl 7(Suppl 7):S513-9.
- Rezende AM, Tarazona-Santos E, Couto ADA, Fontes CJF, De Souza JM, Carvalho LH, et al. Analysis of genetic variability of *Plasmodium vivax* isolates from different Brazilian Amazon areas using tandem repeats. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Mai;80(5):729-33.
- Ríos-Orrego A, Alvarez-Castillo T, Carmona-Fonseca J, Blair-Trujillo S. Temporal evolution of platelets and anti-platelet antibodies in patients of endemic area with non complicated malaria. *An Med Interna* 2005 Dez; 22(12):561-8.
- Roodman GD, Bird A, Hutzler D, Montgomery W. Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells. *Exp Hematol*. 1987 Out;15(9):928-35.
- Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN, Ratajczak MZ. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS* 2003;17(1):33-42.

Saleri N, Gulletta M, Matteelli A, Caligaris S, Tomasoni LR, Antonini B, et al. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria in traveler returning from Venezuela. *J Travel Med* 2006 ;13(2):112-3.

Sambo MR, Trovoada MJ, Benchimol C, Quinhentos V, Gonçalves L, Velosa R, et al. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PloS one* 2010 Jan ;5(6):e11141.

Sanchez R. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 2009 ;15(30):3776.

Santana S, Lavezzo LC, Mondini A, Carolina A, Terzian B, Vieira R, et al. Concurrent dengue and malaria in the Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010 Set;43(5):508-511.

Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-prigent J, Eschw V, et al. Monocyte Vesiculation Is a Possible Mechanism for Dissemination of Membrane-Associated Procoagulant Activities and Adhesion Molecules After Stimulation. *J Immunol* 1994 153: 3245-55.

Scott S, Pendlebury SA & Green C. Lipid organization in erythrocyte membrane microvesicles. *Biochem J* 1984 Nov;224: 285-90.

Shah MD, Bergeron AL, Dong JF & Lopez JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets* 2008 Ago;19: 365-72.

Shrikant P, Lee SJ, Kalvakolanu I, Ransohoff RM & Benveniste EN. Stimulus-specific inhibition of intracellular adhesion molecule-1 gene expression by TGF-beta. *J Immunol* 1996 Jul;157: 892-900.

Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J* 2008 Jan ;7:13.

- Smyth SS, McEver RP, Weyrich a S, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009 Nov ;7(11):1759-66.
- Snounou G. Genotyping of Plasmodium spp. Nested PCR. 1. *Methods Mol Med* 2002;72:103-16.
- Sohail M, Kaul A, Bali P, Raziuddin M, Singh MP, Singh OP, et al. Alleles -308A and -1031C in the TNF-alpha gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF-alpha and clinical features of vivax malaria in Indian patients. *Mol Immunol* 2008 Mar ;45(6):1682-92.
- Souza PEA, Rocha MOC, Rocha-vieira E, Menezes CAS, Chaves CL, Gollob KJ, et al. Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas ' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. *Infect Immun* 2004;72(9):5283-5291.
- Souza-Silva F a, Silva-Nunes M da, Sanchez B a M, Ceravolo IP, Malafrente RS, Brito CF a, et al. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2010 Fev;82(2):185-93.
- Sozzi G, Conte D, Mariani L, Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA in Plasma at Diagnosis and during Follow-Up of Lung Cancer Patients Advances in Brief of Lung Cancer Patients. *Cancer Res* 2001 ;4675-4678.
- Sozzi G, Andriani F, Gramegna M, Roz L. Involvement of FHIT in lung carcinogenesis prospects for future clinical gene therapy applications. *Suppl Tumori* 2002 Jul;1(4):S62.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003 Nov ;21(21):3902-8.

Stephens JC, Schneider J a, Tanguay D a, Choi J, Acharya T, Stanley SE, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science (New York, N.Y.)*. 2001 Jul;293(5529):489-93.

Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 2005 Mar ;76(3):449-62.

Sun FB, Zhang DL, Zheng HM, Song B. Association of interleukin-10 gene polymorphism with cachexia in patients with gastric cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2010;32(11):845-849.

Suzumura, A., M. Sawada, H. Yamamoto & T. Marunouchi. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol*. 1993.151: 2150-8.

Taylor, I. Juhan-Vague, J. L. Mege, J. Mwenechanya, M. Tembo, G. E. Grau & M. E. Molyneux. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *JAMA*. 2004 Nov;291: 2542-4.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS medicine*. 2008 Jun ;5(6):e128.

Tsai EY, Falvo JV, Tsytsykova a V, Barczak a K, Reimold a M, Glimcher LH, et al. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol* 2000 Ago;20(16):6084-94.

Ubalee R, Suzuki F, Kikuchi M, Tasanor O, Wattanagoon Y, Ruangweerayut R, Na-Bangchang K, Karbwang J, Kimura A, Itoh K, Kanda T, Hirayama K. Strong association of a tumor necrosis factor-alpha promoter allele with cerebral malaria in Myanmar. *Tissue Antigens* 2001 Dez;58(6):407-10.

Valladares-Salgado A, Angeles-Martínez J, Rosas M, García-Mena J, Utrera-Barillas D, Gómez-Díaz R, et al. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 2010 Set ;15(6):644-8.

Van der Vaart M, Pretorius P. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Ago;1137: 18-26.

Van der Heyde HC, Gramaglia I, Combes V, George TC, Grau GE. Flow cytometric analysis of microparticles. *Methods Mol Biol* 2011;699:337-54.

Vasina E, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Platelets and platelet-derived microparticles in vascular inflammatory disease. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010 Dez; 9(5):346-54.

Wassmer SC, Souza JBD, Frère C, Candal FJ, Juhan-vague I, Grau GE, et al. TGF- β 1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol* 2006 Jan; 176(2):1180-4.

World Health Organization. World Malaria Report 2009. Geneva: WHO, 2009. 78 p. ISBN 978 92 4 156390 1. Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2011.

Wijesekera, S. K., R. Carter, L. Rathnayaka, and K. N. Mendis. A malaria parasite toxin associated with Plasmodium vivax paroxysms. *Clin Exp Immunol* 1996 Mai; 104: 221-7.

Wilson CS, Seatter SC, Rodriguez JL, Bellingham J, Clair L, West MA. In vivo endotoxin tolerance: impaired LPS-stimulated TNF release of monocytes from patients with sepsis, but not SIRS. *J Surg Res* 1997 Abr; 69(1):101-6.

Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol* 2010 Abr ;184(8):4338-48.

Yang H, Liang ZH, Liu XL, Wang F. Association between polymorphisms of interleukin-10, interferon- γ gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2010 Fev;31(2):155-158.

Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Wu CC, Liu HW. Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol*. 2001 Ago;28(8):1788-92.

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

Zhang D. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute severe pancreatitis. *J Surg Res* 2003 Jun;112(2):138-143.