

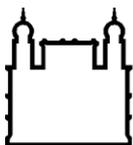
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

POLIMORFISMO GÊNICO DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$  E IL-10 E DA  
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA E SUA  
INFLUÊNCIA NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E SUSCEPTIBILIDADE  
EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A MALÁRIA

VIRGINIA ARAUJO PEREIRA

Rio de Janeiro  
Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

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

*VIRGINIA ARAUJO PEREIRA*

**POLIMORFISMO GÊNICO DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$  E IL-10 E DA  
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA E SUA  
INFLUÊNCIA NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E SUSCEPTIBILIDADE  
EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientador:** Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

**RIO DE JANEIRO**  
Março de 2014

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

P438 Pereira, Virginia Araujo

Polimorfismo gênico das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 e da enzima óxido nítrico sintase induzida e sua influência nos níveis plasmáticos e susceptibilidade em indivíduos expostos a malária / Virginia Araujo Pereira. – Rio de Janeiro, 2014.

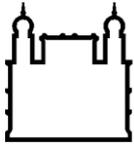
xviii, 93 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 68-75

1. Malária. 2. Polimorfismo genético. 3. Citocinas. 4. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AUTOR: VIRGINIA ARAUJO PEREIRA**

POLIMORFISMO GÊNICO DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$  E IL-10 E DA  
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA E SUA  
INFLUÊNCIA NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E  
SUSCEPTIBILIDADE EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A MALÁRIA

**ORIENTADOR: Dra. Joseli de Oliveira Ferreira**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### EXAMINADORES:

**Prof. Dr. Maria da Glória Bonecini de Almeida - Presidente** (IPEC)

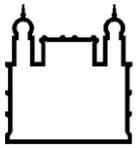
**Prof. Dr. Maria de Fátima Ferreira da Cruz** (IOC)

**Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto** (UERJ)

**Prof. Dr. Lucia Helena Pinto da Silva** (UFRRJ)

**Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino** (IOC)

Rio de Janeiro, 28 de Março de 2014.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

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

Dedico este trabalho a Deus por me dar força e sabedoria em cada  
passo dessa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Dra Joseli de Oliveira Ferreira, primeiramente, porque sem sua dedicação e apoio este trabalho não se realizaria. Muito obrigado pelas críticas, pela paciência e pela oportunidade;

A Dra Maria da Glória Bonecini de Almeida, do Laboratório de Imunogenética do IPEC-FIOCRZ, por ter aberto as portas do seu laboratório com tanto carinho, pelas suas excelentes sugestões, estando sempre apta a me ajudar, e por ter aceitado ser revisora da dissertação e fazer parte da banca examinadora;

Ao Dr Josué da Costa Lima Junior, pelas valiosas contribuições e pelo apoio constante;

Ao Davi Oliveira do Laboratório de Imunogenética do IPEC-FIOCRUZ, que dedicou tanto tempo me ensinando e me ajudando em incontáveis PCRs, sempre acompanhados de um sorriso e intermináveis conversas;

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Imunoparasitologia, Juan Camilo Sánchez, Rafaela Veiga, Amanda Ribeiro, Danielly Sequeira, Luciana Fernandes, Alana Magri, Luise Victorio e Rodrigo Nunes, pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas, e por estarem sempre dispostos a me ajudar;

Aos novos amigos do Laboratório de Imunogenética, Ana, Natália e Andréia, por me receberem tão bem e me ajudarem tanto;

As minhas amigas do Laboratório de Imunoparasitologia, Michelle e Alinne, por fazerem das horas de trabalho e da volta pra casa mais divertidas e proveitosas me ajudando sempre que precisei, sem esquecer a Dra Léa Cysne, sempre tão doce com todas nós;

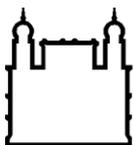
A minha tia Mariza, por sua dedicação materna, amor e confiança;

Ao meu namorado, Geovany Fachim, pelo seu amor, carinho, compreensão e por sempre estar presente, me ouvindo, me aconselhando e me dando força, sem contar os dotes informáticos que me salvaram tantas vezes;

A minha querida família, minha irmã, minha dinda, minhas tias e meus primos, pelo amor incondicional, pelo carinho e apoio e por entenderem minha ausência.

"De tudo, ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que precisamos continuar...  
E a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...  
Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro... "

Fernando Pessoa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Polimorfismo gênico das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 e da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida e sua influência nos níveis plasmáticos e susceptibilidade em indivíduos expostos à malária**

### RESUMO

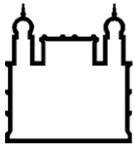
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Virginia Araujo Pereira

A compreensão da variabilidade da resposta do hospedeiro à infecção malárica continua a ser um grande desafio. Fatores genéticos, tanto do hospedeiro como ambientais, contribuem para essa variabilidade, conferindo resistência inata ou influenciando na resposta imune. É possível destacar como fontes de variabilidade na susceptibilidade à malária, fatores inerentes ao hospedeiro, tais como polimorfismos genéticos que ocorrem em eritrócitos e células do sistema imune. Genes como os de citocinas e da enzima óxido nítrico sintase induzida têm um papel importante na regulação da resposta imune e na defesa contra agentes infecciosos. Portanto, nesse estudo avaliamos os polimorfismos nos genes das citocinas interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 10 (IL-10), e da enzima óxido nítrico sintase induzida e sua influência nos níveis plasmáticos e na susceptibilidade à malária em uma população da Amazônia brasileira exposta à infecção. Verificamos a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do *IFNG+874T/A*, *IL10A-1082G/A*, *IL10A-592A/C*, *IL10A-819T/C* e *NOS2A-954G/C* em 267 indivíduos residentes em áreas rurais e periferia do município de Porto Velho, Rondônia. Os fragmentos específicos de DNA foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo a detecção dos polimorfismos e determinação dos genótipos. O plasma dos indivíduos foi usado para mensurar os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, e dos radicais de nitrogênio, através do luminex e reação de Griess, respectivamente. Os polimorfismos *IFNG+874T/A* e *NOS2A-954G/C* não tiveram associação significativa entre ambos os grupos ou com nenhum dos parâmetros de susceptibilidade (doença clínica, níveis de IFN- $\gamma$  ou radicais de nitrogênio e

parasitemia), exceto uma fraca associação do polimorfismo *IFNG+874T/A* com o número de episódios anteriores de malária. A observação de alta frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *IL10A-1082G/A* precisa ser confirmado devido à baixa representatividade deste alelo na população. Na análise dos polimorfismos do gene *IL10A* nas posições -592 e -819 foi encontrada diferença significativa na distribuição do genótipo entre os indivíduos com diagnóstico positivo e negativo ( $P= 0,0002$ ). Carreadores do alelo *IL10A-592A/-819T* (genótipos AA/TT + AC/TC) foram mais frequentes entre os indivíduos com malária do que nos indivíduos negativos, ( $P= 0,0001$ ). Nesses indivíduos verificou-se uma associação com baixos níveis de IL-10 e também com baixa parasitemia. Além disso, os haplótipos ACC e GTA, formados a partir de combinações dos polimorfismos no gene *IL10A*, apresentaram associação significativa, com maior prevalência de ACC no grupo com diagnóstico negativo para malária ( $P= 0,036$ ) e maior prevalência do GAT no grupo com malária ( $P= 0,009$ ). Os resultados do nosso estudo sugerem que os polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* estão associados à malária e influenciam a susceptibilidade à doença.

Palavras chaves: Malária; Polimorfismo Gênico; Citocinas; Óxido Nítrico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### GENE POLYMORPHISM OF IFN- $\gamma$ AND IL-10 CITOKYNES AND NITRIC OXIDE SYNTHASE AND THEIR INFLUENCE IN THE LEVELS AND SUSCEPTIBILITY IN INDIVIDUALS EXPOSED TO MALARIA

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Virginia Araujo Pereira

Understanding the variability of the host response to malaria infection remains a major challenge. Genetic factors from host and environment, contribute to this variability, conferring innate resistance or affecting the immune response. It is possible to highlight as sources of variability in the susceptibility to malaria, factors inherent to the host, such as genetic polymorphisms that occur in erythrocytes and cells of the immune system. Some relevant genes such as cytokines and nitric oxide synthase genes play a key role in the regulation of the immune response and to the defense against infectious agents. Therefore, in this study we evaluated the polymorphisms in the genes of interferon gama (IFN- $\gamma$ ) and interleukin 10 (IL-10), and nitric oxide synthase and their influence in serum levels and susceptibility to malaria in a population from Brazilian Amazon exposed to infection. We verified the allelic and genotypic frequencies of the single nucleotide polymorphism (SNP), namely *IFNG+874T/A*, *IL10A-1082G/A*, *IL10A-592A/C*, *IL10A-819T/C* and *NOS2A-954G/C* in 268 individuals from rural areas of the municipality of Porto Velho, Rondonia State. Specific DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR), allowing the detection and determination of the polymorphism genotypes. Plasma was used to measure the levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 cytokines, and nitrogen radicals by Luminex and Griess reaction, respectively. Evaluation of the *IL10A-1082G/A* polymorphism showed high frequency of heterozygous AG genotype in the population, but it was not possible to infer an association of the polymorphism due to the representativeness of the sample. Investigation of *IFNG+874T/A* and *NOS2A-954G/C* polymorphisms found no association between both groups and with

any parameters of susceptibility (clinical disease, IFN- $\gamma$  or nitrogen radicals levels and parasitemia) except a weak association of the *IFNG*+874T/A genotype with the number of previous episodes of malaria. Significant differences were found in *IL10A*-592A/C and -819T/C genotypes distribution between subjects with or without malaria diagnosis ( $P= 0.0002$ ). Carriers of *IL10A*-592A/-819T alleles (genotypes AA/TT + AC/TC) were more frequent among subjects with malaria than in negative subjects ( $P=0.0001$ ). In malaria positive subjects was also observed an association of these genotypes with low producer of IL-10 and low parasitemia. In addition, the ACC and GTA haplotypes formed from combinations of polymorphisms in the *IL10A* gene were significantly association with higher prevalence of ACC in the group with negative diagnosis ( $P= 0.036$ ) and higher prevalence of GTA in the positive group ( $P= 0.009$ ). The results of our study suggest that *IL10A*-592A/C and *IL10A*-819T/C polymorphisms are associated with malaria and influence disease susceptibility.

Key words: Malaria; Genetic polymorphisms; Cytokines; Nitric Oxide.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>1</b>
2.1. Cronologia .....	3
2.2. Etiologia e Transmissão .....	4
2.3. Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i> spp. ....	5
2.4. Aspectos Clínicos da Malária .....	7
2.5. Situação mundial da malária .....	9
2.6. Malária no Brasil.....	10
2.7. Malária e o Sistema Imune.....	13
2.8. Fatores genéticos humanos relacionados com a susceptibilidade à malária.....	16
2.9. Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) .....	17
2.9.1. O gene IFNG .....	18
2.9.2. Polimorfismos do gene IFNG.....	19
2.10. Interleucina 10 (IL-10).....	21
2.10.1. O gene IL10A.....	21
2.10.2. Polimorfismos do gene IL10A .....	22
2.11. Óxido Nítrico (NO) .....	23
2.11.1. O gene NOS2A.....	24
2.11.2. Polimorfismos do gene NOS2A .....	25
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
4.1. Objetivo Geral .....	28
4.2. Objetivos Específicos .....	28
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
5.1. Área de Estudo .....	29
5.2. Aspectos Éticos.....	30
5.3. Voluntários.....	30
5.4. Extração de DNA genômico dos pacientes.....	31
5.5. Quantificação do DNA.....	32
5.6. Diagnóstico parasitológico e molecular.....	32

5.7. Dosagem de citocinas.....	33
5.8. Dosagem de radicais de nitrogênio .....	33
5.9. Detecção dos polimorfismos <i>IFNG+874T/A</i> e <i>IL10A (-1082G/A, -819T/C e -592A/C)</i> .....	33
5.10. Detecção do polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> .....	34
5.11. Visualização dos fragmentos amplificados .....	36
5.12. Armazenamento e análise estatística dos dados .....	38
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
6.1. Descrição dos voluntários.....	39
6.2. Níveis séricos das Citocinas <i>IFN-γ</i> e <i>IL-10</i> e dos Radicais de Nitrogênio nos grupos de Estudo.....	41
6.3. Influência da história prévia de malária na concentração sérica das citocinas <i>IFN-γ</i> e <i>IL-10</i> e dos radicais de Nitrogênio .....	42
6.4. Frequências Alélicas e Genóticas do Polimorfismo <i>IFNG +874T/A</i> .....	43
6.5. Frequências Alélicas e Genóticas dos Polimorfismos do gene <i>IL10A</i> .....	44
6.6. Frequências Alélicas e Genóticas do Polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> .....	46
6.7. Análise Haplótípica do Gene <i>IL10A</i> .....	47
6.8. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária. ....	48
6.9. Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos do gene <i>IL10A</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária .....	49
6.10. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária. ....	51
6.11. Frequências dos haplótipos do gene <i>IL10A</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária. ....	52
6.12. Análise Funcional do Polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> .....	53
6.13. Análise Funcional dos Polimorfismos do Gene <i>IL10A</i> .....	54
6.14. Análise Funcional do Polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> .....	56

6.15. Influência do Polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> na Densidade Parasitária .....	57
6.16. Influência dos polimorfismos do gene <i>IL10A</i> na Densidade Parasitária .....	58
6.17. Influência do polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> na Densidade Parasitária .....	60
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>76</b>
11.1. Comitê de Ética.....	76
11.2. Termo de Consentimento .....	77
11.3. Questionário .....	82
11.4. Artigo.....	86

## Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	7
Figura 2. Incidência mundial dos casos de malária, 2000-2011.....	9
Figura 3. Áreas de transmissão de malária no Brasil, 2013. ....	11
Figura 4. Variação do número de casos de malária no Brasil (1959 - 2012) .....	12
Figura 5. Resposta imune inata e adaptativa contra o <i>Plasmodium</i> spp. ....	15
Figura 6. Estrutura de um gene humano: Sítios de polimorfismos e relevância funcional. ....	17
Figura 7. Mapa geográfico de Rondônia .....	29
Figura 8. Índice parasitário anual - IPA. Rondônia 2008 a 2013.....	30
Figura 9. Genotipagem dos polimorfismos investigados.....	37
Figura 10. Níveis plasmáticos dos mediadores IFN- $\gamma$ , IL-10 e NO nos indivíduos com diagnóstico positivo e negativo de malária.....	41
Figura 11. Correlação dos níveis das citocinas e dos radicais de nitrogênio com a densidade parasitária .....	42
Figura 12. Níveis plasmáticos dos mediadores IFN- $\gamma$ (A), IL-10(B) e NO(C) nos grupos de acordo com o número de infecções anteriores de malária.....	43
Figura 13. Concentração de IFN- $\gamma$ de acordo com os genótipos e alelos presentes no polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> .....	54
Figura 14. Concentração de IL-10 de acordo com os genótipos e alelos presentes no polimorfismo <i>IL10A-1082G/A</i> .....	55
Figura 15. Concentração de IL-10 de acordo com os genótipos e alelos presentes nos polimorfismos <i>IL10A-592A/C</i> e <i>IL10A-819T/C</i> .....	56
Figura 16. Concentrações dos radicais de nitrogênio de acordo com os genótipos presentes no polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> .....	57
Figura 17. Comparação da densidade parasitária e as variantes do polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> .....	58
Figura 18. Comparação da densidade parasitária nos genótipos e alelos carregados nos polimorfismo do gene <i>IL10A</i> .....	59
Figura 19. Comparação da densidade parasitária e as variantes do polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> .....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos de malária na Amazônia Legal (2010 - 2012).....	13
Tabela 2. Primers utilizados na detecção dos polimorfismos investigados.....	35
Tabela 3. Dados Epidemiológicos dos Grupos de Estudo .....	40
Tabela 4. Descrição das Espécies Plasmodiais e Sintomatologia.....	41
Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> nos grupos positivo e negativo para malária. ....	44
Tabela 6. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>IL10-1082G/A</i> nos grupos positivo e negativo para malária.....	45
Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>IL10-592A/C</i> e <i>IL10-819T/C</i> nos grupos positivo e negativo para malária.....	46
Tabela 8. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i> nos grupos positivo e negativo.....	47
Tabela 9. Frequências dos haplótipos do gene <i>IL10A</i> nos grupos positivo e negativo.....	48
Tabela 10. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.....	49
Tabela 11. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>IL10-1082G/A</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.....	50
Tabela 12. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>IL10-592A/C</i> e <i>IL10-819T/C</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária. ....	51
Tabela 13. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo <i>iNOS-954G/C</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.....	52
Tabela 14. Frequências dos haplótipos do gene <i>IL10A</i> nos grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AP-1	Proteína Ativadora 1
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
ATF	Fator de Ativação da Transcrição
pb	Pares de Bases
Ca	Cálcio
CD	Células Dendríticas
CD4	Cluster de Diferenciação 4
CD8	Cluster de Diferenciação 8
CI	Intervalo de Confiança
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
CREB	Proteína de Ligação do Elemento de Resposta ao Campo
D'	Teste de Desequilíbrio de Ligação
DDT	Dicloro-Difenil Tricloroetano
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EM	Maximização de Expectativa
g/L	Gramas por Litro
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Hap	Haplótipo
HGF	Fator de Crescimento dos Hepatócitos
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
IFNG	Gene Interferon Gama
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL10A	Gene Interleucina 10

IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL1- $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IPA	Índice Parasitário Anual
Kb	Kilobases
kDa	Kilo Dalton
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo Principal de Hlستocompatibilidade
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida e Adenina de Dinucleotídeo de Fosfato
NEAM	Número de Episódios Anteriores de Malária
NF- $\kappa\beta$	Fator Nuclear Kappa Beta
ng	Nanograma
ng/ $\mu$ L	Nanograma por Microlitro
NK	Natural Killer
nm	Nanometro
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NOS2A	Gene Óxido Nítrico Sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg/mL	Picograma por Mililitro
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PNCM	Plano Nacional de Controle à Malária
PRR	Receptores Reconhecedores de Patógeno
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo

STR	Curtas Repetições em Tandem
TCR	Receptores de Células T
TDUI	Tempo desde a Última Infecção
TFBS	Fator de Transcrição de Ligação Total
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	T Reguladoras
U/mL	Unidade por Mililitro
WHO	World Health Organization
$\chi^2$	Qui Quadrado

# 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa que atinge milhões de pessoas por ano em todo o mundo, levando a muitos óbitos principalmente no continente africano. As duas espécies de *Plasmodium* que mais comumente acometem o homem, *P. vivax* e *P. falciparum*, possuem potenciais patogênicos variados. Além do potencial patogênico do parasito, existem outros fatores, relacionados ao ambiente e ao hospedeiro que são importantes na resistência ou susceptibilidade a uma determinada doença. Assim, a identificação de fatores ligados ao hospedeiro pode aumentar o entendimento das interações entre o parasito e o hospedeiro, assim como de mecanismos envolvidos na patologia e imunidade, e também pode contribuir para a elaboração de novas medidas de controle.

Nos últimos anos estudos têm demonstrado que grande parte da patologia da malária é resultado da ativação de vias inflamatórias, resultando em uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, fazendo-se necessário compreender os mecanismos envolvidos na indução e controle destes mediadores para que haja um equilíbrio na resposta imune [1]. Dentro desse contexto, destacam-se os fatores envolvidos na regulação gênica da resposta imune, o que inclui os polimorfismos nos genes codificadores de moléculas, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e as citocinas mediadoras da resposta imune e da inflamação. Assim, grande atenção tem sido dada aos genes do hospedeiro vertebrado que podem estar envolvidos em uma resposta inflamatória exacerbada ou reduzida.

A presença de polimorfismos em determinados genes têm sido associada à susceptibilidade ou resistência em diversas doenças. O principal polimorfismo no gene que codifica o IFN- $\gamma$  (polimorfismo *IFNG+874T/A*) está localizado no seu primeiro íntron, na posição *+874T/A*, e pode influenciar na produção de IFN- $\gamma$ . Análises sobre a função biológica do polimorfismo *IFNG+874T/A* sugeriram que indivíduos portadores do alelo T, selvagem, produzem quantidades normais de IFN- $\gamma$ , enquanto que os portadores do alelo A, mutante, produzem níveis diminuídos desta citocina, o que pode explicar a frequente associação deste alelo com a suscetibilidade observada em várias doenças [2].

Em relação à malária, há apenas dois estudos que verificam a influência do polimorfismo na posição *IFNG+874T/A* e a resposta imune ou o quadro clínico, entretanto, apenas um encontrou associação da variante com a susceptibilidade à doença [3].

Na citocina IL-10, o gene codificante (*IL10A*) contém uma região promotora com pelo menos 5kb, na qual foram descritos mais de 27 polimorfismos. Polimorfismos na

região promotora de *IL10A* formam genótipos e/ou haplótipos que estão relacionados com a produção de níveis aumentados ou diminuídos desta citocina [4]. Polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 são estudados com frequência, principalmente os localizados nas posições -1082A/G, -819T/C e -592A/C. Vários estudos envolvendo a associação nos polimorfismos de *IL10A* e a patogênese aumentada em algumas doenças infecciosas foram realizados. Na malária o conhecimento ainda é escasso, todavia polimorfismos nas posições -1082 (*IL10A-1082A/G*) e -592 (*IL10A-592A/C*) da região promotora do gene de IL-10 não apresentaram associação com a suscetibilidade à infecção por *P. falciparum* em uma população da Tanzânia [5]. Algumas variantes na região promotora *IL-10A* (-1082A/G, -819T/C e -592A/C) foram relacionadas com os níveis séricos de algumas citocinas (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12) e com o desenvolvimento da anemia aguda em crianças quenianas que residem em área de transmissão holoendêmica de *P. falciparum*. Esses dados mostram que os diferentes haplótipos da região promotora do gene de IL-10 são condicionantes para o desenvolvimento da anemia grave e alteram os níveis séricos das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  [6].

Em relação ao óxido nítrico (NO), ainda existem poucos estudos relacionando o polimorfismo gênico da enzima iNOS e a malária, entretanto em um trabalho recente foi encontrada associação entre um maior risco de contrair malária cerebral e a mutação de um nucleotídeo na posição -84C/G no gene da enzima, *NOS2A* [7]. Além disso, também foram descritas associações entre a proteção contra a malária grave e formas polimórficas da região promotora em crianças africanas [8]. Entretanto, existem poucas informações sobre a frequência de polimorfismos do *NOS2A* em populações brasileiras e nenhum sobre o seu papel na resposta imune na infecção de malária.

Portanto, a identificação de polimorfismos em genes que codificam citocinas e espécies reativas de oxigênio que participam da resposta imune contra o *P. vivax* e *P. falciparum* propostas no presente trabalho, é essencial para determinar se os genótipos identificados podem influenciar nas concentrações das citocinas, componentes hematológicos e também no agravamento de sintomas de indivíduos infectados. Tendo em vista que a influência desses polimorfismos ainda é pouco estudada no Brasil, o presente trabalho pode gerar informações de grande relevância para a compreensão dos mecanismos genéticos associados à imunidade e fisiopatologia na malária.

A nossa hipótese é que esses polimorfismos podem resultar em alterações nos sítios de reconhecimento de alguns fatores de transcrição e exercer influência positiva ou negativa sobre os níveis de produção de citocinas importantes na resposta imune à malária.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Cronologia

A malária afeta a humanidade ao longo de milênios, já tendo recebido os nomes de maleita, impaludismo, paludismo e febre terçã ou quartã. A característica intermitente da febre com episódios que duram de três a quatro horas, além de aumento perceptível de baço permitiu identificar sua presença ao longo da nossa história. Assim, foi visto que a malária está descrita em textos religiosos e médicos da antiguidade, como nos escritos chineses (3000 a.C.), nas tábuas mesopotâmicas (2000 a.C.) e nas escrituras na Índia (1800 a.C.). Na Grécia do século V a.C., Hipócrates descreveu o quadro clínico e as complicações da malária, descartando as supertições que atribuíam a doença aos castigos dos deuses e a presença dos maus espíritos. Depois dele, a malária atingiu gravemente o Império Romano e foi tema de narrativas por toda a Idade Média.

No século XVI, a malária chega ao Novo Mundo pelos colonizadores e no século seguinte, os jesuítas descobriram que os indígenas utilizavam a casca de árvores nativas *Cinchona spp* para curar doenças febris, e a levavam em forma de pó (“pó dos jesuítas”) o tratamento que recebeu o nome de Cinchona. O princípio ativo desta árvore, a quinina, foi isolado em 1820 por Petellentier e Caventour e foi a droga eleita para o tratamento e prevenção da malária durante muitos anos.

Ainda nesse período a malária foi associada às regiões pantanosas e alagadiças, recebendo o nome italiano “mal aire” (mau ar), com a teoria de que a doença febril era causada pelo ar insalubre dos miasmas (emanação proveniente de substâncias animais ou vegetais em decomposição).

Apesar de a malária ser conhecida desde a Antiguidade, foi só em 1880 que o médico francês Charles Alphonse Laveran, conseguiu ver o parasita microscópico dentro das células do sangue de um paciente com malária. Entretanto, não se sabia como o plasmódio passava de uma pessoa para outra. Em 1897, o inglês Ronald Ross descobriu que o mosquito do gênero *Anopheles* era o agente transmissor: picava uma pessoa com malária, sugava o sangue com o plasmódio e depois, quando picava outra pessoa, passava o plasmódio para ela. Isso explicava porque a doença era tão comum perto dos pântanos, locais onde existem muitos mosquitos.

Nos escritos médicos do Brasil é possível identificar a malária já no século XVI e, daí por diante, em toda a história médica brasileira, embora não existam, até o século XIX,

registros quantitativos sobre sua prevalência. Conhecendo o modo de transmissão, no século XX, vários estudos foram dedicados a combater o mosquito vetor da doença. Durante a I Guerra Mundial pesquisadores alemães desenvolveram os antimaláricos sintéticos pamaquina, mepacrina e cloroquina. Em 1942, Paul Muller desenvolveu um inseticida poderoso, o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), de grande potência e grande atividade residual e baixo custo, um trunfo para o sonho de erradicar a malária.

A partir de 1955 a Assembléia Mundial da Saúde e a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou a Campanha Mundial de Erradicação da Malária com o intuito de extinguir a doença. Até o final dos anos 70, a campanha conseguiu reduzir em 53% o risco da doença nas populações de áreas endêmicas. Contudo, nos anos 80, devido às crises econômicas, à redução da vigilância no programa de controle, ao aumento do custo do inseticida, à resistência do mosquito ao inseticida e do parasita aos antimaláricos, a doença ressurgiu e hoje atinge cerca de cem países, de modo que a erradicação não era mais uma meta, e os programas de saúde adotaram como principal estratégia o controle da mortalidade e da morbidade, investindo em pesquisa de fármacos e inseticidas mais eficientes, além da busca por uma vacina eficaz.

## 2.2. Etiologia e Transmissão

O agente causador da malária é um protozoário hemoparasita pertencente ao filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Haemosporida e gênero *Plasmodium*. Apenas cinco de 172 espécies do gênero infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e o recentemente inquirido como agente etiológico, *P. knowlesi* [9]. O parasita é transmitido entre humanos pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, pertencentes à família Culicidae. Os anofelinos, comumente conhecidos como mosquito prego, estão distribuídos principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde encontram temperatura e umidade ideais no ambiente, fatores necessários para o sucesso da transmissão do parasita durante o repasto sanguíneo. Existem aproximadamente 430 espécies do gênero *Anopheles*, e somente 30 a 40 espécies são vetores naturais da malária. Os anofelinos capazes de transmitir a malária são encontrados tanto em áreas endêmicas de malária, quanto em áreas em que a doença já foi eliminada. Assim, mesmo essas áreas livres da doença, estão em constante risco de reintrodução do parasita no ambiente.

Os fatores que afetam a capacidade do mosquito ser um transmissor da malária são a susceptibilidade inata ao *Plasmodium* spp, a escolha do hospedeiro (não são

exclusivamente antropofílicos ou zoofílicos) e a sua longevidade. Na África, a principal espécie vetora é o *An. (Kertessia) gambiae*, fortemente antropofílico, e conseqüentemente o mais eficiente vetor de malária do mundo. No Brasil, o principal vetor é o *An. (Nyssorhynchus) darlingi*, susceptível ao *Plasmodium* e antropofílico, e presente em todo o território nacional, sendo responsável pela maioria dos casos no país.

Pelo fato do plasmódio, causador da malária, ser um hemoparasita, a transmissão da doença também pode ocorrer por meio de transfusão de sangue, uso compartilhado de agulhas e/ou seringas contaminadas, acidentes em laboratórios e hospitais com material cortante contaminados, além da transmissão congênita.

### **2.3. Ciclo Biológico do *Plasmodium* spp.**

O ciclo do plasmódio é complexo, apresentando duas fases assexuadas no hospedeiro vertebrado e uma fase sexuada no hospedeiro invertebrado. Todos os plasmódios que infectam o homem tem um ciclo de vida semelhante.

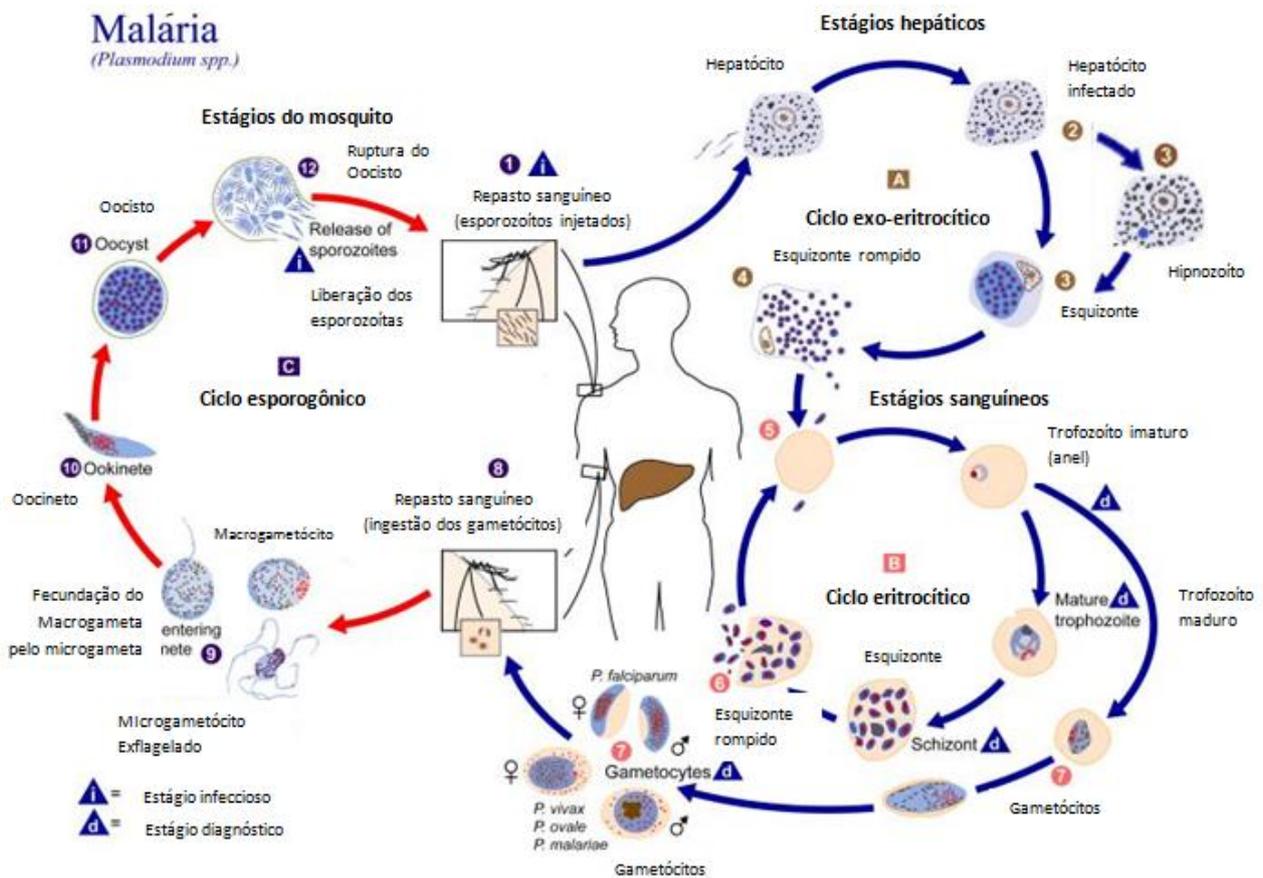
O hospedeiro vertebrado é infectado quando a fêmea do anofelino infectada, durante o repasto sanguíneo, inocula esporozoítas presentes em sua saliva na pele do hospedeiro. A maioria dos esporozoítas permanece na derme, provavelmente sendo eliminados por fagócitos, e alguns migram até os capilares sanguíneos onde atingem a circulação para chegarem ao fígado [10] e outros podem migrar para vasos linfáticos, chegando aos linfonodos drenantes [11].

Os esporozoítas que chegam ao fígado se aderem ao endotélio dos sinusóides hepáticos e iniciam o *gliding*, processo de movimentação no qual o parasita desliza até atravessar a barreira sinusal, provavelmente via células de Kupffer. Os parasitas passam a migrar através de vários hepatócitos e esse processo parece ser essencial, pois induz a secreção de fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) tornando os hepatócitos mais susceptíveis à infecção [12]. Após atingir o parênquima hepático, o esporozoíta se adere mais firmemente ao hepatócito, e inicia a formação de um vacúolo parasitóforo [13]. Protegidos no vacúolo parasitóforo, os esporozoítas iniciam um processo de maturação e de divisão celular denominado esquizogonia extraeritrocítica, uma reprodução assexuada, na qual esquizontes hepáticos repletos de merozoítas são formados. Durante esta etapa do ciclo a infecção é assintomática. Quando a infecção se dá por *P. vivax* ou *P. ovale* há a formação de formas latentes denominadas hipnozoítas, que vão permanecer nos hepatócitos. O hipnozoíta pode permanecer dormente por várias semanas a anos, até reativar, por processos ainda desconhecidos, e causar a “recaída clínica” da doença [14].

A fase pré-eritrocítica termina com a liberação dos merozoítas, contidos nos esquizontes hepáticos, pelos hepatócitos. Esta fase dura seis dias para *P. falciparum*, oito para *P. vivax* e doze a quinze para *P. malariae*. Os merozoítas são liberados do fígado para a corrente sanguínea por meio de estruturas vesiculares denominadas de merossomos que se deslocam pelos sinusóides hepáticos garantindo a liberação de merozoítas diretamente na circulação [15]. Na circulação sanguínea os merozoítas encontram os eritrócitos, e o processo de invasão se dá por meio de interações que envolvem o reconhecimento de receptores específicos. Várias proteínas na superfície do merozoíta e no complexo apical reconhecem receptores localizados na membrana dos eritrócitos. O *P. vivax* invade reticulócitos e depende da interação com o receptor Duffy para quimiocinas, ao passo que, *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades e essa interação envolve proteínas da superfície de merozoíta que se ligam às sialoglicoproteínas da membrana do eritrócito, bem como às glicoforinas A e C [16-17].

Dentro dos eritrócitos o parasita forma um novo vacúolo parasitóforo e se diferencia em anel (trofozoíta jovem) que, posteriormente, se diferencia em trofozoíta maduro. Os trofozoítas maduros iniciam um processo de reprodução assexuada formando esquizontes, que rompem o eritrócito infectado e liberam merozoítas que atingem novamente a circulação sanguínea. Na circulação os merozoítas recém-formados invadem novos eritrócitos e repetem o ciclo eritrocítico. O rompimento das hemácias e a liberação dos merozoítas acontecem em intervalos regulares de 48 a 72 horas, de acordo com a espécie plasmodial, coincidindo com o aumento da temperatura corporal e o aparecimento de outras manifestações clínicas características da malária, ao fim de cada ciclo eritrocítico [18]. Alguns merozoítas se diferenciam em gametócitos masculinos (microgametócito) e femininos (macrogametócito), formas sexuadas do parasita, que presentes na circulação podem ser ingeridos pela fêmea do anofelino durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo no hospedeiro invertebrado.

No interior do mosquito os gametócitos se diferenciam em gametas por meio da exflagelação e realizam o processo de fecundação, formando o zigoto, fase sexuada do ciclo do parasita. O zigoto se transforma em oocineto, uma forma móvel que penetra a membrana peritrófica do intestino médio do anofelino e se desenvolve até oocisto. A partir do oocisto ocorre a esporogônia (multiplicação celular) com formação de esporozoítas, formas infectantes do parasita. Ao romperem os oocistos os esporozoítas são liberados na hemocele e vão para a glândula salivar do mosquito, podendo ser inoculados no hospedeiro vertebrado e dando prosseguimento ao ciclo biológico do plasmódio, como mostrado na figura 1.



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

**Figura 1.** Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

## 2.4. Aspectos Clínicos da Malária

A princípio, todo ser humano é susceptível a malária, mesmo aqueles indivíduos que já contraíram a doença por diversas vezes. Entretanto, as manifestações clínicas da doença geralmente diferem de pessoa para pessoa variando desde infecção assintomática, febre e calafrios, a complicações graves decorrentes do acometimento cerebral, pulmonar e/ou renal, além de anemia intensa levando a morte, no caso de infecção por *P. falciparum*.

O quadro clínico da malária é variável e dependente de uma série de fatores como: espécie plasmodial infectante, idade, nível de endemicidade da área, grau de imunidade do hospedeiro além de fatores genéticos [19].

Os primeiros sintomas da malária estão associados com a ruptura dos eritrócitos no ciclo eritrocítico, desencadeando a resposta imune do hospedeiro e causando a patologia.

A primoinfecção é caracterizada pela ocorrência de paroxismos febris. Os paroxismos iniciam-se com calafrios, acompanhados de mal-estar, cefaléia e dores musculares e articulares. Náuseas e vômitos são sintomas frequentes, podendo também ocorrer dor

abdominal intensa. Em geral, pacientes com infecção por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* têm paroxismos febris a cada 48 horas (febre terçã), enquanto aqueles infectados por *P. malariae* têm paroxismos a cada 72 horas (febre quartã). Nos indivíduos que habitam regiões endêmicas de malária, este quadro de paroxismo de febres (paludismo) não ocorre, sendo mais comum a ocorrência de um ou poucos dos sintomas acima descritos. Sinais clínicos de anemia, esplenomegalia e hepatomegalia geralmente estão presentes.

A maioria dos casos de malária grave e de óbitos é causada pelo *P. falciparum*, apesar de existirem relatos cada vez mais frequentes de infecções graves pelo *P. vivax* [20]. A malária grave é definida pela OMS quando o paciente com parasitemia tem uma ou mais das seguintes alterações clínico-patológicas: prostração, rebaixamento do nível de consciência, edema pulmonar ou síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), convulsões, choque cardiovascular, sangramento anormal, icterícia, hemoglobinúria, ou anemia grave (hemoglobina < 50g/L). Crianças, gestantes de áreas endêmicas e pessoas de áreas não endêmicas compõem o grupo com maior risco de desenvolver a forma grave da doença.

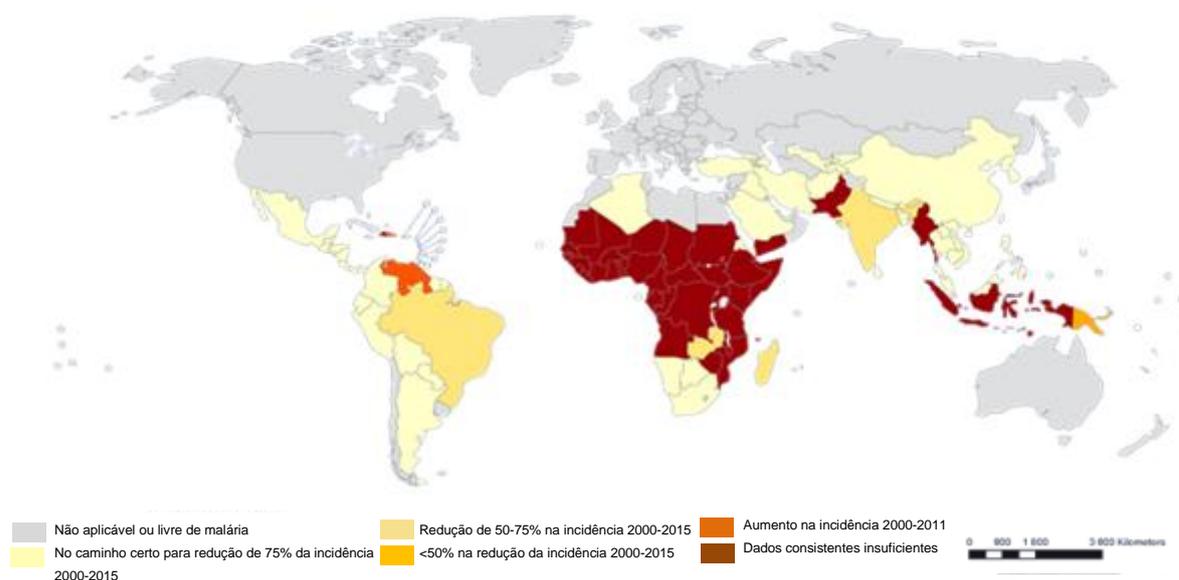
Na malária cerebral, a evidência patológica de citoaderência de hemácias parasitadas em cérebros de doentes falecidos e os mecanismos responsáveis pela patogenia da doença ainda não são conhecidos. Evidências sugerem que diferentes fatores genéticos podem determinar o risco de indivíduos expostos à malária se infectarem e o risco dos infectados ficarem doentes ou evoluírem para malária grave. Em áreas consideradas hiper e holoendêmicas, onde as pessoas estão constantemente expostas às infecções, observa-se uma imunidade naturalmente adquirida, mas não totalmente protetora, uma vez que o plasmódio possui mecanismos de evasão que permitem que ele consiga infectar o hospedeiro. Porém, esses indivíduos conseguem desenvolver uma imunidade clínica, o que leva ao cenário observado em áreas endêmicas, com maioria dos casos assintomáticos. Mesmo com a menor probabilidade de desenvolverem malária grave, os residentes de área endêmica (principalmente crianças) podem ter complicações decorrentes de anemia crônica, esplenomegalia que causa disfunção da medula óssea e do sistema imune, e síndrome nefrótica por deposição glomerular de imunocomplexos [21].

Além da imunidade naturalmente adquirida, existem também outros fatores já descritos por atuarem na proteção do indivíduo contra o quadro de malária grave. Uma das ilustrações clássicas de que fatores genéticos influenciam na evolução e na gravidade da doença é o efeito protetor de certas hemoglobinopatias.

## 2.5. Situação mundial da malária

A cada ano temos uma maior compreensão da situação e das tendências da malária no cenário global. Mensurando o número de casos e de mortes causadas pela doença, foi possível observar uma redução de 45% nos casos de óbito, e 29% na incidência entre os anos 2000 e 2012 (WHO, 2013). Apesar disso, a malária ainda atinge 104 países, 97 com transmissão e 7 em fase de prevenção da reintrodução da doença, acarretando 207 milhões de casos e 627.000 mortes no ano de 2012.

A maioria dos acometidos reside nas regiões tropicais e subtropicais, como África, Ásia e América Latina (figura 2). Na África o número de casos totaliza mais de 80% dos casos mundiais e é onde ocorrem 77% dos óbitos infantis, geralmente em crianças menores de cinco anos. Calcula-se que um indivíduo africano tem em média 1 a 5 episódios de febre malárica por ano, e que a cada 30 segundos morre uma criança de malária no país. Os casos são prevalentemente infecções por *P. falciparum*, e as infecções por *P. vivax* são consideradas reduzidas devido à alta frequência de indivíduos Duffy negativos. A ausência da proteína Duffy nos eritrócitos os torna resistentes à infecção por *P. vivax*.



Adaptado de World Health Organization (WHO), 2013.

**Figura 2.** Incidência mundial dos casos de malária, 2000-2011.

Fora da África, a malária acomete a população de mais 51 países com cerca de 40 milhões de casos e 62 mil mortes por ano (Rollback Malaria, 2012). Dentre esses 51

países, 21 pertencem às Américas e 30 pertencem à Europa, Ásia e ao Pacífico. O risco de contrair malária pode variar significativamente nessas áreas. As principais vítimas de malária tendem a ser de populações mais pobres que vivem em áreas rurais, com acesso limitado a diagnóstico, tratamento e formas de prevenção. Porém, a endemia não está concentrada apenas em áreas pobres e comunidades isoladas, na verdade a malária passa a ser uma barreira para o desenvolvimento econômico, turismo e investimentos estrangeiros nessas áreas [22].

Ambas as espécies plasmodiais, *P. vivax* e *P. falciparum* ocorrem em alta frequência nas regiões fora da África. Porém, nas Américas *P. vivax* é responsável por quase 80% dos casos (exceto no Haiti e na República Dominicana), Esta espécie é mais difícil de ser controlada devido à formação de uma fase hepática dormente (hipnozoítas) que não pode ser detectada no diagnóstico e só pode ser eliminada com a administração de um combinado de primaquina durante 14 dias, o qual pode causar anemia em pacientes com deficiência de G6PD. Tratamentos longos também são um obstáculo para o combate à malária, pela difícil adesão e continuidade do tratamento pelos pacientes.

Os programas de controle de malária tem se intensificado e conseguiram reduzir mais de 50% dos casos de malária em 34 países não africanas, desde o ano 2000 até os dias atuais. Desde 2007, 4 países já estão livres da ocorrência da malária e outros 17 estão em fase de pré-eliminação, livrando 74 milhões de pessoas do risco de contrair a doença (Rollback Malaria, 2012).

## **2.6. Malária no Brasil**

O número de casos de malária relatados no continente americano caiu de 1,1 milhões no ano 2000 para 469.000 em 2012, onde três países foram responsáveis por 76% dos casos em 2012: Brasil, Colômbia e Venezuela. O Brasil representa atualmente 52% dessas ocorrências (WHO, 2013) (figura 3).



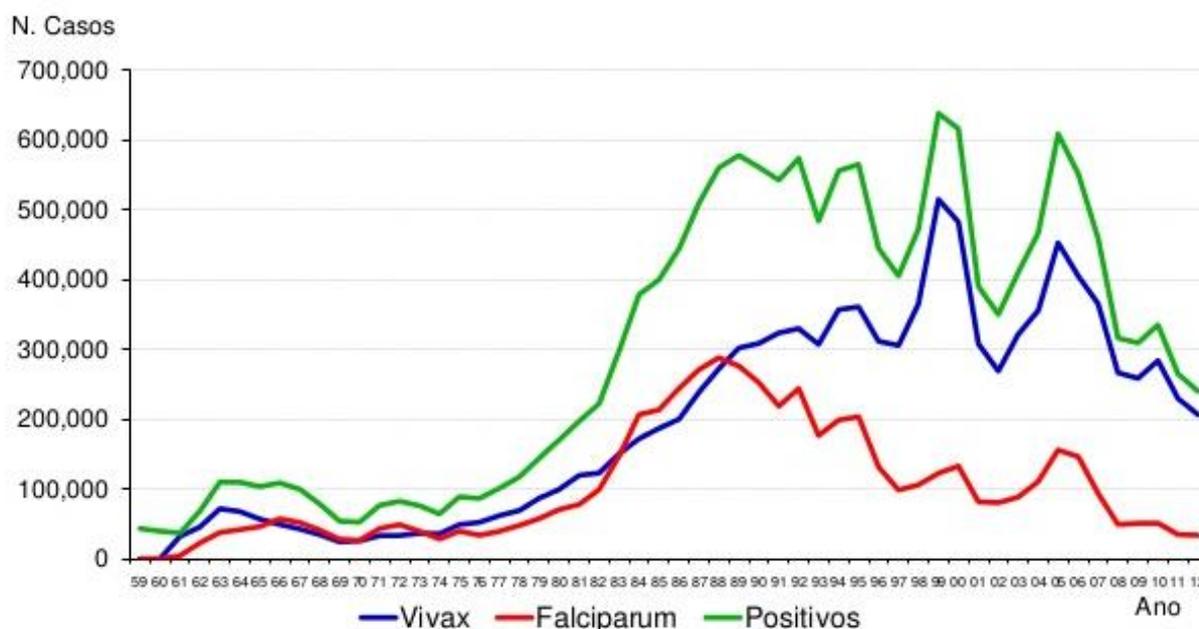
Adaptado de World Health Organization (WHO), 2013

**Figura 3.** Áreas de transmissão de malária no Brasil, 2013.

O primeiro relato de malária no Brasil foi identificado no século XVI em escritos médicos. Por volta de 1870 ocorreu a primeira grande epidemia na Amazônia, conseqüente da migração de indivíduos não imunes para áreas endêmicas em busca da extração da borracha [23]. No início do século XX, a malária se encontrava disseminada por todo o território nacional, com grande variação no número de casos de malária por ano. As alterações nos programas de controle e erradicação da malária, o aumento de movimentos migratórios, a ocupação desordenada por incentivo de diversos órgãos governamentais, a construção de estradas e usinas hidroelétricas, a criação de projetos agropecuários e o surgimento de inúmeros garimpos foram fatores determinantes para a disseminação da doença [24]. As áreas extras Amazônicas apresentaram casos exportados pela região norte do país, com risco contínuo de reintrodução da transmissão natural. A malária de Mata Atlântica nos estados do sudeste se caracteriza por casos isolados com presença preponderante de *Anopheles cruzii* e diagnósticos de malária por *P. vivax*.

Durante este período teve início o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia legal (PIACM), criado pelo Ministério da Saúde do Brasil para conter o aumento da incidência da doença registrado nos anos de 1998 e 1999. Este plano contribuiu para alterar a dinâmica da transmissão da malária na região amazônica, promovendo diminuição da dispersão da doença na região e favorecendo a aplicação das ações de controle. Em seqüência ao PIACM, o governo brasileiro criou Plano Nacional de Controle à Malária (PNCM) com o objetivo de fornecer diretrizes aos governos federal, estadual e municipal, em parceria com a sociedade organizada, para desenvolver

atividades de controle da doença. Essa iniciativa melhorou tanto a estrutura das unidades de saúde quanto o controle dos riscos de transmissão da doença na Região. Essas ações também afetaram as frequências das duas principais espécies plasmodiais presentes no país. Até o final da década de 1980 as prevalências de *P. vivax* e *P. falciparum* eram semelhantes, em torno de 50% dos casos para cada um dos plasmódios e a partir da década de 1990 *P. vivax* passou a ser a espécie mais prevalente, mantendo-se nesta



[http://pt.slideshare.net/Academia-Nacional-de-Medicina/malaria-no-brasil-perspectivas-para-seu-controle?from\\_search=5](http://pt.slideshare.net/Academia-Nacional-de-Medicina/malaria-no-brasil-perspectivas-para-seu-controle?from_search=5). (2013)

**Figura 4.** Variação do número de casos de malária no Brasil (1959 - 2012)

posição até os dias atuais, sendo responsável por cerca de 80% dos casos registrados em todo o país (figura 4).

Em 2012 foram registrados 227.688 casos de malária no Brasil, sendo 28.795 por *P. falciparum*, 191.961 por *P. vivax*, 85 por *P. malariae* e 3.385 infecções mistas. Na Amazônia Legal, uma divisão política do território nacional que engloba nove estados: Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, ocorre mais de 99% dos casos de malária do país, sendo a distribuição do número de casos heterogênea, com variação do número e do índice parasitário anual (IPA) entre os estados (tabela 1).

**Tabela 1.** Casos de malária na Amazônia Legal (2010 - 2012).

UF	Casos <i>P. falciparum</i>			Casos <i>P. vivax</i>			Total de casos			% por UF 2012
	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	
AM	8693	4267	6564	61394	50910	72017	70526	55280	80260	35,25
PA	20267	13771	11907	104368	92434	60555	126524	108240	76249	33,49
RO	4188	1885	864	35851	26410	21326	40279	28467	22300	9,79
AC	4544	2759	4805	28013	17178	18773	32685	20009	23931	10,52
AP	2664	3858	3059	10933	12976	10071	13948	17185	13872	6,09
RR	2425	1794	1206	17624	11198	6422	20284	13156	7751	3,41
MT	436	286	96	1689	1161	1056	2185	1529	1189	0,52
MA	772	305	289	2844	2883	1699	3712	3307	2084	0,91
TO	12	10	5	84	58	42	99	71	52	0,02
<b>Amazônia</b>	<b>44001</b>	<b>28935</b>	<b>28795</b>	<b>262800</b>	<b>215208</b>	<b>191961</b>	<b>310242</b>	<b>247244</b>	<b>227688</b>	<b>100</b>

Dados obtidos do Sivep, Malaria 2014.

## 2.7. Malária e o Sistema Imune

Diversos estudos que avaliam os mecanismos imunológicos na malária mostram que o sistema imune do hospedeiro desenvolve uma potente resposta contra o parasita causando alterações em quase todos os componentes do sistema. Estudos no modelo murino e em humanos indicam que as citocinas junto com as células T, células NK e macrófagos podem concorrer tanto para o controle da infecção malárica quanto para a persistência e aumento da parasitemia [25]. O equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 parece ser crucial no controle dos sintomas clínicos da doença livrando o hospedeiro do desenvolvimento dos quadros graves ou moderados da infecção [26].

As interações iniciais entre o parasita e as células do sistema imune inato são importantes no controle da multiplicação do parasita e, posteriormente, na eliminação e resolução da infecção [27]. Um dos principais papéis da imunidade inata é a produção de citocinas imuno-reguladoras, como IFN- $\gamma$  e IL-10, que são críticas para desenvolvimento da resposta imune Th1 e Th2 e para o envolvimento de células T CD4<sup>+</sup> e células efetoras que vão mediar a resposta imune celular e humoral [28]. Num quadro sinóptico da resposta imunológica na infecção, as células apresentadoras de antígeno (APC) processam e apresentam antígenos do parasita. A produção de interleucina 12 (IL-12) induz a produção de IFN- $\gamma$  e causa a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a expansão

clonal dos linfócitos T específicos, ativando células NK, células dendríticas (CD) e macrófagos, amplificando a resposta imune adaptativa. Os macrófagos secretam óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF) [29].

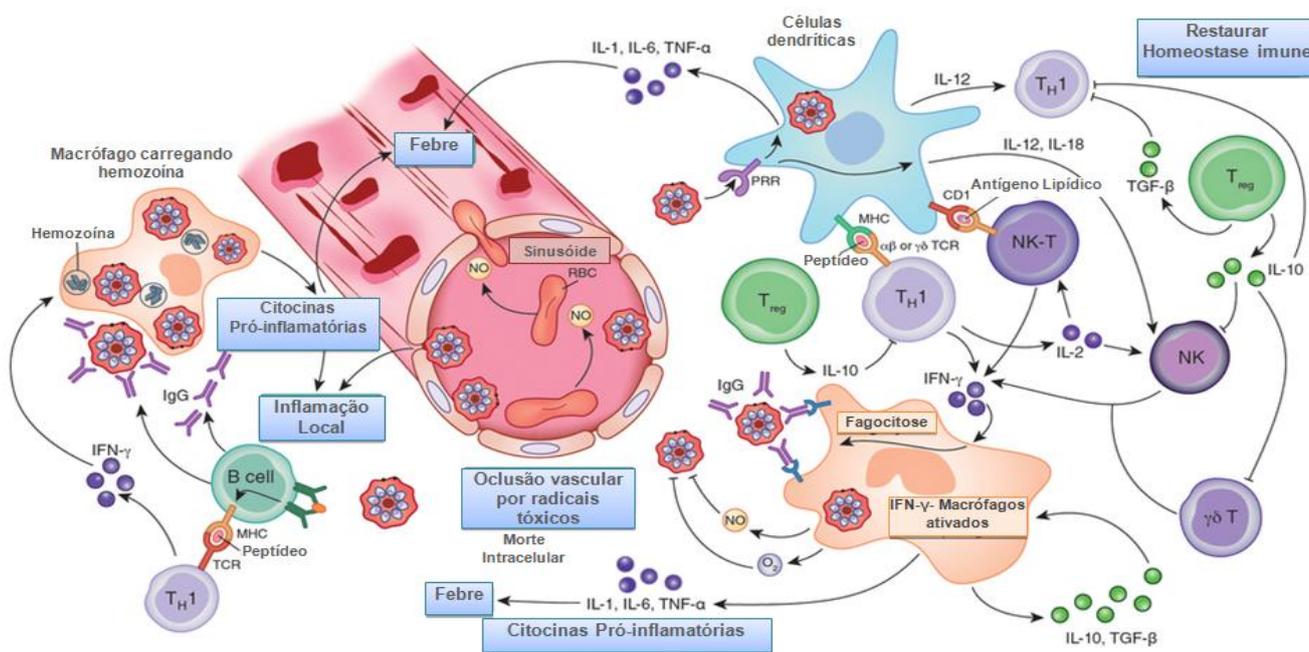
Estudos *in vitro* têm demonstrado que componentes do estágio eritrocítico do parasita, incluindo GPI derivadas do parasita, induzem os macrófagos a secretarem IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  [30]. IFN- $\gamma$  é o indutor chave dos mecanismos imunes efetores essenciais para o controle inicial da infecção tanto das formas pré-eritrocíticas quanto eritrocíticas [31] [32], mas há evidências de que níveis altos de IFN- $\gamma$  devem estar cuidadosamente balanceados para evitar patologia [33] [34]. *In vivo*, a produção de TNF- $\alpha$  está associada com a resolução da parasitemia e da febre [35], mas níveis altos de TNF- $\alpha$  [36] e IL-6 [37-38] tem sido associado à malária cerebral. A priori, seria esperado que a IL-12 e possivelmente IL-18 tenham papel importante na iniciação da cascata de citocinas. Em pacientes com malária não complicada observou-se um aumento significativo de IL-18 seguido de uma diminuição na concentração dessa citocina durante a fase de convalescença [39].

Outros estudos evidenciaram o papel das citocinas tipo Th1, incluindo IFN- $\gamma$  e IL12, e citocinas do tipo Th2 como IL-10 e IL-4 em pacientes que apresentam quadros moderados da doença por *P. falciparum* [40], sugerindo que o aumento na concentração de IFN- $\gamma$  e IL-12 durante a fase aguda da infecção indique o início de uma resposta imune eficiente regulada por citocinas do tipo Th1 e o IFN- $\gamma$  deve auxiliar a limitar a progressão da infecção para malária severa.

Na malária severa incluindo malária cerebral há um aumento e persistência na produção de TNF- $\alpha$  em paralelo com a diminuição na produção de IL-10 e TGF- $\beta$  [41] [42]. Em contraste, a ativação de IL-18 e IL-12 no início da infecção deve estar enfraquecida, visto que o TGF- $\beta$  suprime os efeitos protetores dessas citocinas [43]. TGF- $\beta$  parece ser uma citocina importante para manter o balanço entre proteção e progressão e da infecção por *P. falciparum*. Dodo et al., mostrou que a produção de TGF- $\beta$  está associada com a redução significativa do risco de febre e conclui que a regulação da cascata das citocinas pró-inflamatórias é feita por citocinas como TGF- $\beta$  nas associações entre níveis circulantes de IL-12 e IL-18 e o risco de malária severa por *P. falciparum* [40, 44]. Em estudos epidemiológicos prospectivos, IL-12 está associada positivamente com a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e negativamente associada com a parasitemia [44]. Entretanto, embora tenha se demonstrado um papel importante para IL-12 na indução da IFN- $\gamma$  em PBMC humanos e células NK, tem sido difícil detectar IL-12 *in vitro* e pouco se sabe da sua origem celular na malária por *P. falciparum* [45] [34]. Alguns trabalhos sugerem que TGF- $\beta$  e IL-10

podem ser produzidos rapidamente durante a infecção murina e tem um papel importante na down-regulação da resposta inflamatória patogênica uma vez que a parasitemia esteja sobre controle. Entretanto tanto em camundongos como em humanos a concentração excessiva de TGF- $\beta$  e IL-10 na infecção inibe a resposta imune do tipo Th1 e facilita o crescimento do parasita [46-47]. Em contraste, na infecção humana a incapacidade de produzir TGF- e IL-10 está associada à infecção aguda e malária e anemia graves [48-49]. Finalmente a razão entre os níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 e os níveis de TGF- $\beta$  ou IL-10 está associada com uma diminuição no risco de infecção, embora aumente o risco de doença clínica naqueles que se infectam [44].

Parasitas e hemácias parasitadas podem ativar as células dendríticas através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e serem fagocitados e seus antígenos apresentados às células T. Sinalização PRR leva à secreção de citocinas que iniciam a inflamação subjacente à patogênese da malária e diferenciação celular. Células Th1 vão fornecer ajuda para a diferenciação das células B e secreção de anticorpos, e também secretam IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos. Macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  fagocitam parasitas opsonizados e glóbulos vermelhos infectados e, posteriormente, induzem a morte intracelular mediada por radicais de nitrogênio e oxigênio (NO e O<sub>2</sub>). A inflamação é reduzida pela secreção de citocinas anti-inflamatórias produzidas por macrófagos e populações de células T reguladoras. Como mostrado na Fig 5 a resposta imune inata e adaptativa na malária é muito complexa.



Nature Reviews Immunology, 2013. (Mary M, 2004)

**Figura 5.** Resposta imune inata e adaptativa contra o Plasmodium sp.

## 2.8. Fatores genéticos humanos relacionados com a susceptibilidade à malária

A habilidade de o hospedeiro resistir à infecção malárica é atribuída à imunidade inata. Vários mecanismos de resistência têm sido descritos tanto na fase de entrada do esporozoíta no hepatócito quanto na fase invasão dos eritrócitos pelos merozoítas [50]. A resistência inata ao *P. falciparum* é dada por características genéticas que afetam vários estágios do ciclo intraeritrocitário do plasmódio. As mutações eritrocitárias são as principais e conferem proteção contra a malária e caracterizam-se pelo aumento de radicais livres de Oxigênio (como nas anemias falciformes, causada pelo alelo HbS em homozigose) [51].

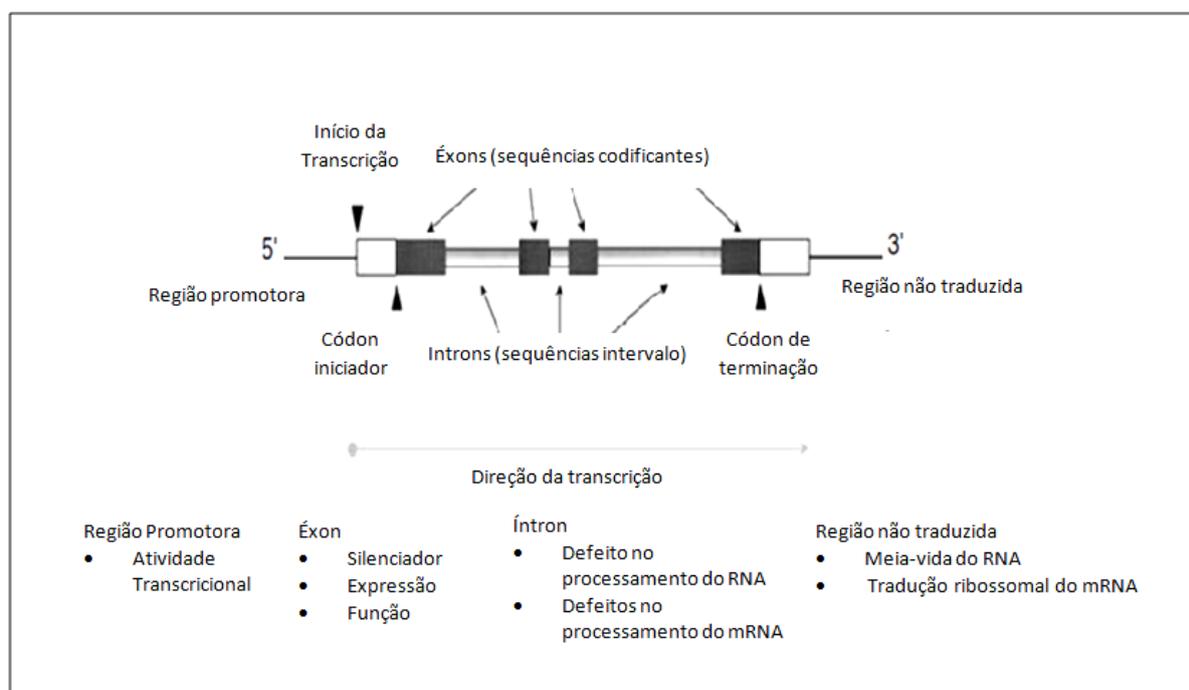
A hipótese de Haldane sugerindo vantagem do heterozigoto de talassemias em determinados grupos populacionais, abriu um campo de investigação de susceptibilidade genética à infecção. O polimorfismo do gene da cadeia b da hemoglobina foi correlacionado com resistência as formas graves da doença por *P. falciparum*, o que evidenciou que a presença de polimorfismos no eritrócito humano tem um papel importante na resistência à malária. Alguns estudos demonstraram que a resistência genética na fase eritrocítica conduziu à seleção de defeitos genéticos nos glóbulos vermelhos, implicando uma pressão seletiva positiva, com aumento da frequência de genes superior a um por cento (1%). Estes defeitos incluem as hemoglobinopatias (Ex: hemoglobinas S, C, E e talassemias), defeitos da membrana dos eritrócitos (Ex: ovalocitoses do Sudoeste Asiático, algumas formas de eliptocitoses) e anormalidades metabólicas [Ex: deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e em piruvato cinase (PK)] [52-57].

A distribuição geográfica de populações deficientes na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), sobretudo nas regiões do globo em que a malária é endêmica sugeriu que, tal como as hemoglobinopatias, essa deficiência tem vantagens seletivas. Outro exemplo clássico da diferença de susceptibilidade à malária em populações humanas é a associação entre o grupo sanguíneo Duffy e a susceptibilidade na infecção pelo *P. vivax*. A observação de que o *P. vivax* era raro no oeste da África e que a maioria dos Africanos subsaarianos era negativa para o grupo sanguíneo Duffy levou a descoberta de que o *P. vivax* utiliza o antígeno do grupo sanguíneo Duffy como receptor para invadir os eritrócitos.

Desde que Kwiatkowski e colaboradores mostraram que o polimorfismo do gene do fator de necrose tumoral (TNF) estava associado com susceptibilidade à malária cerebral, surgiram vários estudos sobre o polimorfismo das citocinas em várias doenças infecciosas

e foram detectadas várias mutações no promotor deste gene que podem influenciar na taxa de produção de TNF- $\alpha$ . Apesar das citocinas apresentarem um baixo grau de variação genética, um número cada vez maior de estudos vem incriminando os polimorfismos localizados em regiões reguladoras de genes de citocinas como fator que pode influenciar na susceptibilidade ou na evolução de uma doença infecciosa [58].

Polimorfismos na região reguladora de citocinas vêm sendo descritos e genótipos específicos de algumas importantes citocinas envolvidas na resposta imune estão sendo associados com o risco para rejeição de órgãos após transplantes, e também com a susceptibilidade ou gravidade em certas doenças infecciosas e autoimunes [59]. Esses polimorfismos podem resultar em alterações nos sítios de reconhecimento de alguns fatores de transcrição e exercer influência positiva ou negativa sobre os níveis de produção de citocinas envolvidas na resposta imune (figura 6) [58].



Adaptado Jaber, 2004.

**Figura 6.** Estrutura de um gene humano: Sítios de polimorfismos e relevância funcional.

## 2.9. Interferon Gama (IFN- $\gamma$ )

O IFN- $\gamma$  é uma proteína glicosilada de 14-18 kDa e 146 aminoácidos com amplo espectro de ação nas doenças infecciosas e inflamatórias. É classificado como uma citocina pró-inflamatória, capaz de intensificar a resposta inflamatória. Ele é produzido

pelas células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, células NK e linfócitos T $\gamma$  $\delta$  e é um elemento chave da imunidade inata e adaptativa. A sua expressão ocorre em resposta a uma variedade de estímulos, tais como a estimulação dos receptores de células T (TCR) em meio à citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-2, IL-12 e IL-18) [60]. Na malária, o IFN- $\gamma$  tem ação antiparasitária direta. A ação do IFN- $\gamma$ , assim como das demais citocinas pró-inflamatórias, deve ser controlada para que ocorra produção em nível adequado e, conseqüentemente, a eliminação da infecção com poucos danos para o hospedeiro [45]. Camundongos tratados in vivo com anticorpos anti- IFN- $\gamma$  e desafiados com *P. yoelli* apresentaram alta morbidade, demonstrando que a produção de IFN- $\gamma$  no início da infecção está diretamente relacionada com a resistência ao parasito [61]. Além disso, o IFN- $\gamma$  também atua na imunidade protetora contra os estágios sanguíneos da malária além de eliminar diretamente o parasito no interior do hepatócito [62]. Tanto o IFN- $\gamma$  quanto a IL-10 são componentes importantes na regulação das respostas imunes do tipo Th1, porém a IL-10 é responsável pela diminuição da síntese de IFN- $\gamma$ . Existem evidências de que a ausência de IFN- $\gamma$  e a presença de IL-10 medeiam a inibição da resposta Th1 em neonatos cujas mães tiveram malária [63].

### **2.9.1. O gene *IFNG***

O IFN- $\gamma$  é codificado pelo gene *IFNG*. O gene é de cópia única e está localizado no cromossomo 12 na região 12q24.1 [64]. A estrutura do gene é altamente conservada, mede 5.4kb e é constituído por quatro éxons e três íntrons [65]. Esta estrutura tem sido mantida entre as espécies, e a análise da sequência de DNA demonstrou que há maior identidade na região promotora do que na região codificante. Além disso, repetições CACA são encontradas na estrutura do genoma localizadas no íntron 1 do genoma humano e no íntron 3 em genoma murino.

A regulação da expressão do gene *IFNG* parece ser complexa e a análise da estrutura genômica revela elementos participantes no promotor do gene e nos íntrons [66] [67]. A região regulatória principal dentro do promotor do gene apresenta uma região altamente conservada e duas sub-regiões que podem formar complexos com proteínas. Entre os nucleotídeos -108 e -40 existem dois elementos regulatórios essenciais e conservados, que promovem a expressão desta molécula em células T. Em 1993, Penix et al [68] reportou que o elemento proximal a 108 bp da sequência flanqueadora 5' do gene seria um importante determinante da sua expressão. Esse sítio utiliza fatores de transcrição que incluem membros do CREB/ATF (*camp response element binding protein/activating transcription factor*) e AP-1 (*activator protein*). Além desses fatores

limitantes para a expressão, demonstrou-se também que a metilação é um fenômeno importante na inibição da expressão gênica. Com relação ao *IFNG*, em células nas quais o promotor está metilado, a produção de IFN- $\gamma$  não é observada, enquanto que em células nas quais o promotor está hipometilado ou não metilado, o IFN- $\gamma$  é produzido [69]. Foi visto que em células T humanas, a metilação completa do promotor e do primeiro íntron do gene ocorreu em timócitos, em células T neonatais, e em linfócitos T não estimulados, além de substancial hipometilação ter sido também observada em linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> efetores [70]. Embora o controle da expressão do gene *IFNG* ocorra em vários níveis, cada um deles depende da localização de interação das células produtoras com células efectoras e/ou seus produtos [71].

### **2.9.2. Polimorfismos do gene *IFNG***

O IFN- $\gamma$  é uma citocina essencial na geração de uma resposta celular efetiva contra patógenos intracelulares [72] e a variabilidade genética no gene do IFN- $\gamma$  não tem sido previamente associada com susceptibilidade a doenças infecciosas e parasitárias na população em geral [73]. Vários polimorfismos de *IFNG* nas regiões não codificantes são descritos.

O gene humano que codifica o IFN- $\gamma$  tem no primeiro íntron um STR (*Short Tandem Repeat* = Curtas repetições em tandem) de dois nucleotídeos C e A, caracterizando diferentes alelos. Estudos já demonstraram que a região de repetição CA, seqüência microsatélite no primeiro íntron do gene *IFNG* humano é polimórfica e estaria ligada com alterações na expressão do gene [72-73]. Cinco alelos desse microsatélite foram descritos, diferindo no número de repetições da região CA, variando de 11 a 15 repetições, que correspondem aos alelos designados de um a cinco. Indivíduos portadores do alelo dois (2), de doze repetições CA, apresentariam uma maior produção de IFN- $\gamma$  do que indivíduos com outra combinação de alelos [74]. O polimorfismo desses microsatélites está associado à variação individual na produção e níveis de IFN- $\gamma$  [75]. A repetição do microsatélite CA na posição -179T/G tem sido associada a numerosas doenças auto-imunes e a condições inflamatórias crônicas [76-78]. Junto à região de repetição CA localizada no primeiro íntron foi descrito o principal polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), localizado no seu primeiro íntron na posição +874 (+874T/A polimorfismo rs2430561). Estudos sobre a função biológica do polimorfismo +874T/A sugeriram que indivíduos portadores do alelo T, selvagem, produzem quantidades fisiológicas de IFN- $\gamma$ , enquanto que os portadores do alelo A, mutante, produzem níveis

diminuídos desta citocina, o que pode explicar a frequente associação deste alelo com a susceptibilidade observada em várias doenças [2, 74, 78-80].

O polimorfismo +874T/A coincide com o susposto sítio de ligação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, e poderia ser, em parte, responsável pela associação prévia encontrada entre o polimorfismo de microssatélite CA e a produção de IFN- $\gamma$ .

Em humanos, várias infecções virais, bacterianas e parasitárias estão associadas a variações no SNP +874T/A. A susceptibilidade à doenças infecciosas como a síndrome respiratória aguda severa (SARA) [77], hepatite B [81], câncer cervical (HPV) [82], tuberculose [83] e toxoplasmose [84] estão associadas a este polimorfismo. Entretanto, não foi observado associações do SNP na posição +874T/A com outras doenças e infecções como pancreatite crônica [85], leishmaniose [2], tuberculose [86] e hepatite C [87].

Nas doenças auto imune como Lupus Eritematoso Sistêmico um estudo feito na população Tailandesa demonstrou que a frequência alélica do polimorfismo no gene de *IFNG* (+874T/A) entre pacientes portadores de Lupus e pacientes controles (sem Lupus) não foram significativamente diferentes. Entretanto, uma associação significativa ocorreu entre o alelo A no grupo dos pacientes portadores de Lupus e artrite, sugerindo que este polimorfismo possa ser usado como marcador para pacientes com Lupus e susceptibilidade a artrite na população Tailandesa [88].

Recentemente, Medina et al., (2011) [89] analisaram a distribuição de alelos e genótipos no polimorfismo de *IFNG*+874T/A em pacientes diagnosticados com *P. vivax* e indivíduos sadios na população do Pará, e não observaram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos indicando que este polimorfismo não possui influência na susceptibilidade e progressão da doença para casos graves. Contudo, ao analisar a produção das citocinas, os mesmos autores evidenciaram forte associação do genótipo AA e menor produção da citocina, indicando ser este SNP associado aos níveis séricos de IFN- $\gamma$ . Em outro estudo Cabantous e colaboradores encontraram resultados significativos, demonstrando associação entre um polimorfismo do gene *IFNG* na posição -183G/T, cujo alelo T mutante estaria associado com o aumento da transcrição do gene e, conseqüentemente, com a proteção à malária em um população de Mali [90].

O papel do polimorfismo no *IFNG* na susceptibilidade para a malária e na progressão da doença ainda merece investigações, já que poucos estudos relacionaram polimorfismos do gene *IFNG* com a susceptibilidade ou resistência à malária.

## **2.10. Interleucina 10 (IL-10)**

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida tardiamente por células Th2, células T CD8+, monócitos, células B ativadas e timócitos, apresentando efeito inibidor em células T e NKs. Ela também regula a diferenciação e/ou crescimento de células B, granulócitos, neutrófilos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. Dentre as suas principais funções, destaca-se o seu papel na regulação da produção de citocinas importantes como IFN- $\gamma$  e IL-12 [91]. Atuando como um modulador da resposta imune, a IL-10 pode estimular e suprimir a resposta imunológica [92], incluindo a inibição da produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 por macrófagos ativados e a inibição de coestimuladores e das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, sendo importante na mudança de resposta Th1 para Th2.

Na infecção malárica, ocorre um aumento na produção de IL-10 quando a parasitemia está elevada [93]. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e antipirética provavelmente envolvida no timing das respostas antiparasitárias. O efeito inibidor da IL-10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias [94].

Estudos em camundongos mostraram que a deficiência de IL-10 em animais infectados por *P. chabaudi* aumentou a mortalidade nestes animais. Também foi observado que esses animais desenvolveram hipoglicemia, anemia grave e houve aumento na concentração de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , quando comparados com os não deficientes de IL-10 [95]. Estudo realizado com crianças africanas anêmicas e com alta parasitemia por *P. falciparum* demonstrou que os níveis de IL-12 diminuíram e que os níveis de IL-10 e TNF- $\alpha$  estavam aumentados [96]. Por fim, a presença de IL-10 também atua prevenindo os danos teciduais desencadeados pela inflamação, devido à participação dos macrófagos na malária cerebral.

### **2.10.1. O gene *IL10A***

O gene humano *IL10A* está localizado no cromossomo 1 na região 1q31-32 com uma região promotora medindo aproximadamente 5kb e constituído por cinco éxons e quatro íntrons. Este gene apresenta mais 27 sítios polimórficos. Polimorfismos na região promotora de *IL10* formam genótipos e/ou haplótipos que estão relacionados com a produção de níveis aumentados ou diminuídos desta citocina [4]. Apesar do seu papel crucial na imunorregulação, os fatores que regulam a expressão do gene *IL10A* são mal compreendidos, tanto no nível da transcrição quanto na pós-transcrição. A expressão do

gene *IL10A* é regulada por fatores de transcrição constitutivos e ubíquos. Isto pode explicar como o gene *IL10A* consegue continuar a ser transcrito quando outros genes de citocinas estão inativos. Esta combinação da expressão constitutiva e o fino controle no nível pós-transcricional pode permitir uma rápida resposta homeostática à inflamação [97].

### **2.10.2. Polimorfismos do gene *IL10A***

Foram relatados vários locais polimórficos importantes no gene *IL10A*, incluindo três na região promotora nas posições -1082, -819 e -592 (-1082A/G; -819T/C; -592A/C) que podem influenciar a transcrição do RNA mensageiro (mRNA) e da expressão de IL-10 in vitro [98-99]. Koss et al. (2000), demonstraram que esses polimorfismos na região promotora estão envolvidos com a baixa produção de IL-10 na doença inflamatória do intestino [100].

Na malária, foi encontrada uma associação entre um bloco haplotípico definido por -1082G/-819C/-592C (GCC) com a proteção à anemia grave e o aumento da produção de IL-10 em uma população do Quênia [6]. A variabilidade genética nas regiões promotoras e/ou codificantes de genes que originam citocinas pró e anti-inflamatórias mostra a necessidade de um melhor entendimento da malária por meio da identificação de polimorfismos nesses genes críticos que são capazes de mediar o desenvolvimento e o curso clínico da doença.

Outras doenças vêm sendo associadas com esses polimorfismos deveras investigados na região promotora. O alelo *IL10A-1082A* foi associado com a ocorrência de retinocoroidite toxoplasmática em indivíduos que residem em Minas Gerais [101]. Na Bahia, o polimorfismo na posição -819 parece alterar a produção de IL-10 em indivíduos infectados por *Leishmania braziliensis* quando apresentavam o genótipo homocigoto *IL10A-819C/C* [102].

Alguns estudos não encontraram associação do polimorfismo de *IL10A*, como o estudo de Carpenter et al. (2009) na Tanzânia em indivíduos infectados por *P. falciparum* no qual foi encontrado associação negativa com os polimorfismos nas posições -1082G/A e -592A/C [5].

Contudo, os genótipos podem influenciar nas concentrações das citocinas, as quais podem atuar na ativação e regulação da resposta imune. Assim, o entendimento dos mecanismos genéticos da imunidade e da fisiopatologia da doença poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos reguladores e efetores na malária e no desenvolvimento de intervenções estratégicas, como as vacinas [103-104].

## 2.11. Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, podendo ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. Atua na imunorregulação e está presente na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade. Uma característica importante da molécula de NO é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica de acordo com a concentração e/ou depuração tecidual [105].

A molécula de óxido nítrico (NO) é altamente reativa devido à presença de radical livre (elétron extra). A formação do NO ocorre pela transformação da L-arginina em um intermediário, a N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina, na presença da nicotinamida e adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH) e Ca<sup>2+</sup>, sendo necessário mais NADPH e O<sub>2</sub> para a formação de L-citrulina e NO. O NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido a sua rápida oxidação a nitrato e nitrito. Por causa disso, a maioria das pesquisas não demonstra o NO propriamente dito, considerando-se como prova de sua produção a concentração de nitrato e nitrito, ou por uso de análogos e ausência de efeito [106-107].

O NO está envolvido numa gama de processos fisiológicos como a neurotransmissão, o controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares. Assim, uma grande variedade de estados patológicos pode estar relacionada aos níveis de NO produzido no organismo. O NO como agente citotóxico é capaz de se ligar à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica [108]. Ele atua na resposta imune inata com ação antibactericida, antiparasítica e antiviral. As citocinas, tal como o IFN- $\gamma$ , estimulam a síntese de NO pelos macrófagos que contêm a enzima iNOS. A produção de NO é prolongada por horas em concentrações altas o suficiente para exercer atividade tóxica contra a célula alvo infectada. O NO vai agir contra essas células se ligando a certas enzimas necessárias para a atividade respiratória, impedindo o funcionamento dessa célula [109].

Na malária, há evidências conflitantes sobre o papel do NO na resistência contra os parasitas e nos mecanismos de imunossupressão. Acredita-se que na malária a ação da nitrato redutase produza NO e espécies reativas de nitrogênio derivadas de NO dentro ou em torno do vacúolo parasitóforo [110]. Embora vários trabalhos relatem que a produção de NO durante a infecção malárica é limitada, sabe-se que altos níveis de NO podem ser produzidos para matar os parasitas, contribuindo ainda para a ativação patológica do sistema imune [111]. Estudos em modelo murino também sugerem um papel inibitório do

NO [112] na parasitemia e na sobrevivência do *P. berghei* em camundongos [113] ou do *P. berghei Anka* em ratos [114]. Em humanos, a malária grave está associada com a diminuição da produção de NO [115] e formas de iNOS [116]. Mesmo que diversos estudos indiquem que NO esteja diretamente envolvido com a infecção malárica, tal envolvimento não é independente de outros mediadores do sistema imune, tais como as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10.

### **2.11.1. O gene NOS2A**

O óxido nítrico pode ser sintetizado por muitas células através de hemeoproteínas da família P450-like, chamadas de NO sintases (NOS). As NOS são enzimas que exercem sua atividade dependente de oxigênio ( $O_2$ ), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH), flavinas e biopterinas, para formar NO a partir da L-arginina. Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas (cNOS) em determinadas células e uma induzível (iNOS), semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir dos respectivos genes [105].

A forma induzível da enzima óxido nítrico sintase, iNOS ou NOS2, está envolvida na resposta imune. Ela não é expressa constitutivamente, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos bacterianos e/ou citocinas [117]. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso é o que caracteriza sua participação em vários processos patológicos.

O gene humano que expressa a iNOS está localizado no cromossomo 17 na região 17q11.2-q12. Ele é constituído por 27 éxons com sítio iniciador da transcrição no éxon 2 e códon de parada no éxon 27. A região do éxon 1 ao 13 codifica o domínio da oxigenase, e a região do éxon 14 ao 27 codifica o domínio redutase da proteína sintase, representando dois domínios funcionais da enzima [118].

A expressão gênica é regulada por várias vias: NF- $\kappa$ B, IFN- $\gamma$  (sinalizando através da cascata JAK-STAT) e fatores indutores de hipoxia (HIF-1), as quais induzem a expressão, e TGF- $\beta$  e interleucinas 4, 10 e 13, as quais inibem a expressão. A regulação pós-transcricional ocorre por prevenção da homodimerização da iNOS pela proteína associada à NOS de 110kDa (NAP110). A expressão deste gene está envolvida no sistema imune inato e atua na atividade antibactericida, antiviral e antifúngica, sendo expresso principalmente no sangue, mas também no fígado e no tecido esquelético ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

### **2.11.2. Polimorfismos do gene NOS2A**

Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), variação no número de cópias e repetição de sequências simples são variações importantes que têm sido relatados no genoma humano. A presença de tais variações na região reguladora afeta o nível de produto do gene na célula, enquanto que a variação na região codificadora influencia a estrutura das proteínas e sua atividade. Esta alteração no nível de produto do gene e a estrutura da molécula de proteína podem ser responsáveis pelo resultado final do outcome genético, bem como das doenças infecciosas [105].

O gene *NOS2A*, com uma repetição pentanucleotídica, dois polimorfismos de nucleotídeos na região promotora e um polimorfismo do éxon 16, implicado em várias doenças. Também previram computacionalmente vários polimorfismos na região promotora, o que pode afetar o fator de transcrição de ligação local (TFBS) e a hipótese de que esses polimorfismos possam ter algum papel putativo no prognóstico de doenças [119].

A presença de polimorfismos no *NOS2A* tem papel importante em várias doenças que afligem diferentes populações. Polimorfismos na região codificante alteram a atividade do produto, enquanto polimorfismos na região reguladora alteram os níveis do produto do gene. Na região promotora humana foram descritos três polimorfismos: um SNP (G/C) na posição -954 e duas repetições de microsatélite (TAAA e CCTTT). Esses polimorfismos mostraram forte associação da expressão da enzima iNOS e produção de NO com casos de diabetes [120], HIV [121] e artrite reumatóide [122].

Na malária, um estudo na Tailândia mostrou uma forte associação entre as formas longas da repetição CCTTT no promotor de *NOS2A* e malária grave, sendo este um significativo fator de risco. Contudo, nenhuma correlação entre o número de repetições CCTTT e os níveis de NO foi vista. Mas por outro lado, o nível de transcrição da iNOS é afetado e o alelo C na posição *NOS2A-954G/C* também investigado mostrou associação com altos níveis de atividade da enzima NOS [123]. Mais dois estudos tiveram resultados divergentes na investigação do polimorfismo na posição -954G/C. Kun e colaboradores [8] encontrou associação desse polimorfismo com a proteção à malária em crianças africanas (Gabão, Nigéria e Senegal) enquanto Burgner e colaboradores viram uma associação alélica relativamente fraca na população de Gâmbia, o que evidencia a necessidade de conhecer o papel desses polimorfismos em diferentes populações [124].

### 3. JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença infecciosa, febril e potencialmente grave, causada por hematozoários do filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*, transmitido ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. A doença é considerada uma das endemias de maior prevalência no mundo com cerca de 40% da população mundial exposta ao risco de contrair a doença, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se cerca de 135 a 287 milhões de casos, responsáveis por 473 a 789 mil mortes, especialmente em crianças menores de cinco anos (WHO, 2013).

Atualmente a malária humana é atribuída à infecção por cinco espécies do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* [9]. Contudo, *P. falciparum* e *P. vivax* são as espécies mais prevalentes no mundo e responsáveis pela maioria dos casos relatados.

Os sintomas da malária diferem de pessoa para pessoa, podendo se apresentar de forma assintomática até complicações graves decorrentes do acometimento cerebral, pulmonar e/ou renal, além de anemia intensa levando a morte, no caso de infecção por *P. falciparum* e mais recentemente também associada ao *P. vivax* [125-126]. Essa diferença na manifestação clínica da malária e os mecanismos envolvidos na patogenia da doença ainda não são totalmente compreendidos.

Fatores genéticos do hospedeiro e ambiental podem influenciar a suscetibilidade à malária, tanto conferindo resistência inata como influenciando na resposta imune. Em áreas endêmicas de malária, várias mutações gênicas são altamente prevalentes e estão associados com a proteção ou suscetibilidade à infecção. Diversos polimorfismos gênicos têm sido descritos em diferentes regiões endêmicas de malária no mundo, mas no Brasil, esses estudos são raros ou inexistentes. No presente projeto nos propomos a avaliar em populações do Brasil expostas naturalmente à malária a ocorrência de polimorfismos gênicos que podem afetar a resposta imune. Dentro desse contexto, destacamos a importância dos mecanismos envolvidos com a molécula de óxido nítrico (NO), como espécie reativa de oxigênio, e as citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-10 (IL-10), devido o papel crucial que desempenham na infecção. Na malária, há evidências da ação do NO tanto no controle da parasitemia quanto na ativação patológica da resposta imune [110-111]. A produção de NO é favorecida pela secreção de IFN- $\gamma$  que juntamente com outras citocinas pró-inflamatória, participa da resposta inflamatória no controle da densidade parasitária. A ação do IFN- $\gamma$ , assim como das demais citocinas pró-

inflamatórias, deve ser controlada para que ocorra produção em nível adequado e, conseqüentemente, a eliminação da infecção com poucos danos para o hospedeiro [45]. A presença de IL-10 previne esses danos teciduais desencadeados pela inflamação, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  [127]. A IL-10 tem a capacidade de regular negativamente a resposta inflamatória e os níveis altos de IL-10 têm sido associado com a proteção à malária cerebral e anemia severa associada à infecção [128-129]. Contudo, altos níveis de IL-10 reduzem a capacidade efetiva do clearance parasitário [130].

Atualmente sabe-se que a participação do IFN- $\gamma$ , IL-10 e NO são fundamentais durante o controle da parasitemia nas fases iniciais da infecção e também para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora nas fases tardias. A capacidade de produção desses mediadores é dependente de controle genético o qual compreende genes promotores de natureza polimórfica. Dentro desse contexto existem estudos em diferentes populações que associam o polimorfismo nos genes destes mediadores com a eficácia da resposta imune naturalmente adquirida e também no agravamento dos sintomas clínicos. Portanto, uma investigação detalhada sobre a presença de polimorfismos nos genes que codificam as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, assim como a enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), será fundamental para elucidar tais questionamentos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Avaliar os polimorfismos nos genes das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 (*IFNG* e *IL10A*) e da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (*NOS2A*) e sua influência nos níveis séricos e susceptibilidade à malária em indivíduos residentes em áreas endêmicas da Amazônia brasileira.

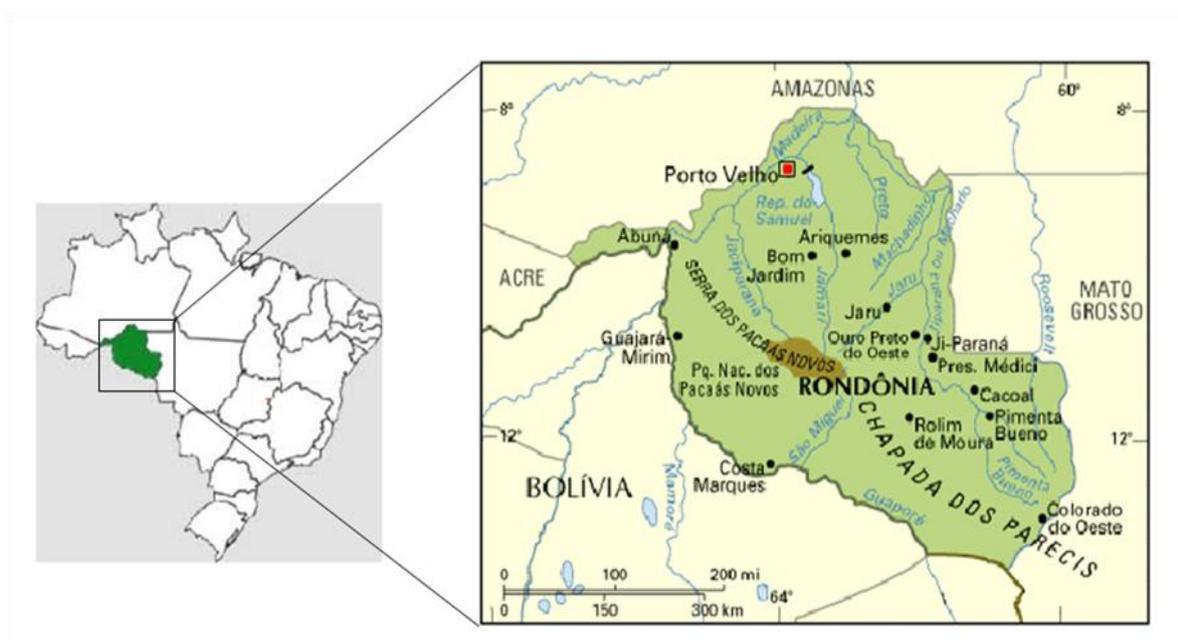
### 4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) nos genes do IFN- $\gamma$  (posição +874T/A), da IL-10 (posições -1082G/A, -592A/C e -819T/C) e da NOS (posição -954G/C);
- Determinar os níveis séricos das citocinas circulantes IL-10 e IFN- $\gamma$  e de radicais de nitrito e nitrato;
- Verificar associação destes polimorfismos com a susceptibilidade à malária, aos níveis séricos das citocinas e aos radicais de nitrogênio, e à densidade parasitária em indivíduos infectados.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Área de Estudo

A área selecionada para realização do estudo foi o município de Porto Velho, capital do estado de Rondônia. O estado de Rondônia pertence à região norte do Brasil, possui 52 municípios numa área de 237.576.167 km<sup>2</sup>, cerca de 1,7 milhões de habitantes, e tem como limites os estados do Amazonas ao norte, Mato Grosso a leste, Acre a oeste, e a Bolívia a oeste e sul. A capital, Porto Velho, com população de 484 mil habitantes no ano de 2013, é coberta por floresta tropical, temperatura média e umidade relativa do ar elevadas, com chuvas abundantes.



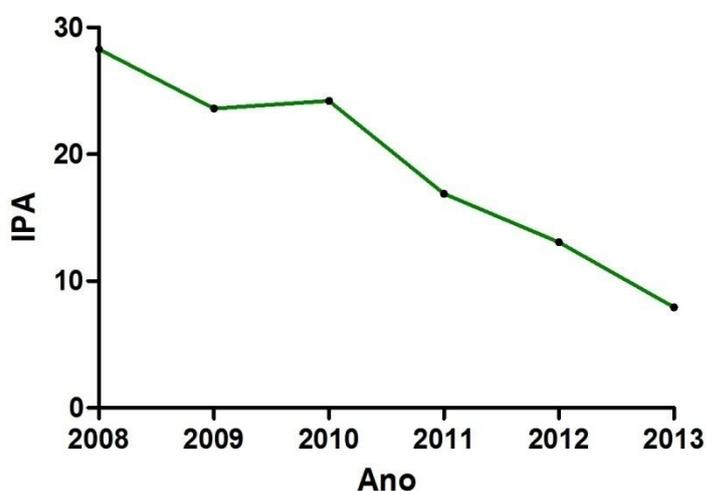
<http://www.quetalviajar.com/rodoviario/distancias-rodovias/distancia-rondonia.htm> e  
<http://www.guianet.com.br/ro/maparo.htm>

**Figura 7.** Mapa geográfico de Rondônia

O estado de Rondônia ocupou o segundo lugar no número de casos registrados no Brasil em 2007, apresentando 81.929 casos, 17,9% dos casos nacionais. Nos anos de 2007, 2010 e 2011, o número de casos foi de 81.956, 43.576 e 35.120 respectivamente (17,9%, 13% e 11,9% dos casos nacionais), sendo Porto Velho responsável por mais da metade desses casos relatados. Distintos padrões de transmissão e intensidade da

malária são vistos dentre os municípios de Rondônia, inclusive dentro de Porto Velho essa distribuição também é bastante heterogênea, sendo a região urbanizada praticamente livre de casos de malária enquanto os bairros periféricos e a população ribeirinha são responsáveis pelos maiores índices de malária no município.

O índice parasitário anual – IPA, indicador que estima o risco de ocorrência de malária em uma população é calculado através do número de exames por mil habitantes e estimado na seguinte escala: alto ( $\geq 50$ ), médio (10-49) e baixo (1-9,9). O IPA no ano de 2008 foi de 28,29 e em 2013 de 7,93, correspondendo a uma queda de 72%. Persistem ainda, alguns casos de malária de fronteira, áreas de invasão com assentamentos desprovidos de infraestrutura que apresentam IPA muito elevado, assim como casos (Figura 8).



SIVEP/IBGE

**Figura 8.** Índice parasitário anual - IPA. Rondônia 2008 a 2013

## 5.2. Aspectos Éticos

As questões éticas e metodológicas levantadas no estudo foram avaliadas e aprovadas pelo Comitê de Ética da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa referente ao número CEP 024/09 (Anexo 1).

## 5.3. Voluntários

O presente trabalho avaliou o perfil gênico das citocinas e da enzima iNOS de indivíduos que buscaram diagnóstico para malária no posto de diagnóstico para malária ou

por visitas a suas residências nos anos de 2007, 2010 e 2011. O trabalho foi realizado, nas áreas rurais e periferia do município de Porto Velho, Rondônia. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo leram e assinaram um termo de consentimento (Anexo 2) que formaliza a participação destes como voluntários. Após o consentimento, os voluntários foram avaliados clinicamente por um médico e participaram de uma cuidadosa entrevista que tinha como objetivo a investigação de dados pessoais e epidemiológicos através do preenchimento de um questionário (Anexo 3).

Participaram do nosso estudo 267 indivíduos, 73 indivíduos foram diagnosticados positivos para malária e 194 negativos. Para efeito de comparação e verificação da possível influência da malária no perfil gênico, o grupo de pacientes, composto, foi dividido em um grupo de indivíduos com diagnóstico positivo para malária (grupo positivo) e outro grupo com diagnóstico negativo (grupo negativo). O diagnóstico parasitológico foi feito por gota espessa e esfregaço e confirmado por PCR. Além da presença ou ausência da infecção, para avaliar a característica de susceptibilidade, analisamos o número de episódios anteriores de malária dos indivíduos, a partir de uma média de seis episódios de malária. Assim, a partir de uma média determinada pela confiabilidade da resposta do indivíduo (em que este se lembraria com certeza do número de episódios), foram formados mais dois subgrupos de acordo com o número de episódios, maior do que seis episódios ( $> 6$  episódios) e menor ou igual do que seis episódios ( $\leq 6$  episódios), como 1 indivíduo com diagnóstico negativo não teve nenhum episódio de malária, foram 266 indivíduos nessa análise. Foram excluídos desse estudo, pacientes com idade inferior a 10 anos, populações indígenas, presidiários, doentes mentais, gestantes e parturientes independentes da idade.

Foram coletados 30 mL de sangue por via endovenosa utilizando o sistema a vácuo de coleta (vacutainer) em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Todo material utilizado para coleta foi descartável. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz e congeladas à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso, na obtenção de plasma e DNA para os testes imunológicos e moleculares respectivamente.

#### **5.4. Extração de DNA genômico dos pacientes**

O DNA das amostras foi extraído de sangue periférico seguindo o protocolo do kit comercial QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi (QIAGEN, Valencia, CA, USA), utilizando apenas 1 mL de sangue de cada amostra, previamente descongelada e a temperatura ambiente

(TA). Após a extração, o filtrado contendo o DNA isolado (0,41 µg/µL) foi coletado, quantificado em NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, e armazenado num tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL previamente identificado e estocado a -20°C até o momento do diagnóstico molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) e da detecção dos SNPs nos genes *IFNG*, *IL10A* e *NOS2A*.

### 5.5. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA é importante para a eficiência dos produtos de PCR. Por isso, as amostras de DNA extraídas e isoladas foram quantificadas em NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer e apresentaram uma média de concentração de DNA de 110.99 ng/µL.

Todas as variantes alélicas foram detectadas nos polimorfismos *IFNG+874T/A* (figura 9. A), *IL10A-1082G/A* (figura 9. C), *IL10A-592A/C* (figura 9. D) e *IL10A-819T/C* (figura 9. D). Porém no polimorfismo *NOS2A-954G/C* não encontramos o genótipo homozigoto variante CC dentro das amostras de estudo (figura 9. B).

### 5.6. Diagnóstico parasitológico e molecular

O exame parasitológico foi feito por distensão sanguínea e/ou gota espessa, coradas pelo Giemsa para confirmar o diagnóstico realizado no posto de Saúde e examinadas durante 15 minutos por dois microscopistas experientes em momentos diferentes. A parasitemia foi avaliada na gota espessa através da contagem do número de parasitas (todas as espécies e estágios presentes) em 500 leucócitos. A confirmação do diagnóstico através da pesquisa de plasmódio pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada após a extração de DNA. O PCR amplificou diferentes regiões gênicas de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* utilizando-se oligonucleotídeos específicos. Este diagnóstico parasitológico foi feito em colaboração com a Dra. Dalma Banic do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz e Dra Luzia Helena de Cravalho de Laboratório de Malária, Centro de Pesquisa René Rachou.

## 5.7. Dosagem de citocinas

Os níveis das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  foram detectados no plasma dos pacientes utilizando um ensaio multiplex (Bio-Plex assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o sistema Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) e analisado com um sistema de matriz de suspensão Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories). A intensidade da fluorescência foi transformada em concentração da citocina utilizando o software gerenciador de Bio-Plex (versão 3.0). Um mínimo de 100 beads por região foi analisado. Um ajuste de curva foi aplicado a cada curva padrão de acordo com o manual do fabricante e as concentrações das amostras foram interpoladas a partir da curva padrão. O menor limite de detecção foi de 2 pg/mL e os valores abaixo deste limiar foram definidos como 2 pg/mL.

## 5.8. Dosagem de radicais de nitrogênio

A dosagem de óxido nítrico foi realizada utilizando a reação de Griess. Resumidamente, 60 $\mu$ L de plasma dos pacientes foi dispensado em duplicata em tubos eppendorf de 1.5 mL para medir as concentrações de nitrito e nitrato (NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> respectivamente). Foi adicionada nas amostras 10  $\mu$ L da enzima Nitrato redutase (5 U/mL) juntamente com o seu cofator 30  $\mu$ L de NADPH, que reduziram nitrato em nitrito, para a determinação do nitrato circulante. Dessa forma, o óxido nítrico, que é convertido rapidamente a nitrato e nitrito, é medido de forma indireta, pelos níveis totais de nitrito. O reagente de Griess (sulfonilamida 1 % em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% + 2' naftiletileno diamida 0,1 %) foi adicionado à cada amostra para a determinação dos níveis de nitrito. Foi adicionado também TCA 10% para a precipitação de proteínas. A mistura resultante foi lida a 540nm em espectrofotômetro.

## 5.9. Detecção dos polimorfismos *IFNG*+874T/A e *IL10A* (-1082G/A, -819T/C e -592A/C)

A técnica de ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*) foi utilizada para a detecção dos polimorfismos nos genes *IFNG* na posição +874T/A, e *IL10A* nas posições -1082G/A, -819T/C e -592A/C, a partir do DNA extraído dos indivíduos participantes do estudo. Esse método se baseia na detecção de mutações de uma única base e consiste em duas reações complementares: uma contendo um *primer* específico

para a seqüência normal do DNA e incapaz de amplificar o DNA mutante no *locus* e outro contendo um *primer* mutante específico que não amplifica o DNA normal [131]. Cada reação ocorre com um *primer* antisenso genérico e um de dois *primers* sensores alelo específicos. Como controle interno da amplificação em ambas as reações foi utilizado um par de *primers* desenhados a partir da seqüência nuclueotídica do hormônio de crescimento humano de 426 bp. As amplificações para IFNG tiveram volume final de 20  $\mu$ L contendo 25 - 100 ng de DNA, Tampão 1,5X (5X GoTaq Flexi Buffer, Promega),  $MgCl_2$  3mM (25mM, Promega), 40 $\mu$ M de cada dNTP (200  $\mu$ M, Applied Biosystems), 0,12 unidades de Taq DNA polimerase (5U/  $\mu$ L, Invitrogen), 0,5 $\mu$ M de cada primer de controle interno e 5 $\mu$ M do primer genérico e de um dos dois primers alelo específicos A ou T (tabela 2) sobre as seguintes condições: 95°C (3 minutos), 10 ciclos de 95°C (15 segundos), 65°C (50 segundos), 72°C (40 segundos) seguidos por 20 ciclos de 95°C (20 segundos), 55°C (50 segundos) e 72°C (50 segundos), 72°C (7 minutos) 4°C (temperatura de incubação). Para IL10, as amplificações tiveram volume final de 10  $\mu$ L contendo 25-100 ng de DNA; Tampão 1X (5X GoTaq Flexi Buffer, Promega),  $MgCl_2$  1,5mM (25mM, Promega), 20 $\mu$ M de cada dNTP (200 $\mu$ M, Applied Biosystems), 0.25 unidades de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1 $\mu$ M de cada primer de controle interno, 10 $\mu$ M do primer genérico e de um dos dois primers alelo específicos G ou A (Invitrogen) (tabela 2) sobre as seguintes condições: 95°C (1 minuto), 10 ciclos de 95°C (15 segundos), 65°C (50 segundos), 72°C (40 segundos) seguido por 20 ciclos de 95°C (20 segundos), 59°C (50 segundos) e 72°C (50 segundos), 4°C (temperatura de incubação). As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### **5.10. Detecção do polimorfismo NOS2A-954G/C**

A técnica PCR-RFLP – Polimorfismos de comprimentos dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi utilizada para a detecção do polimorfismo da iNOS na posição -954 do gene (*NOS2A*). Essa técnica consiste na amplificação da região alvo do DNA seguida da restrição dos fragmentos por endonucleases, que são enzimas bacterianas que reconhecem e clivam pares de bases específicos em moléculas de DNA. As amplificações para *NOS2A* tiveram volume final de 20  $\mu$ L contendo 25 - 100 ng de DNA, Tampão 1,25X (5X GoTaq Flexi Buffer, Promega),  $MgCl_2$  4mM (25mM, Promega), 40 $\mu$ M de cada dNTP (200  $\mu$ M, Applied Biosystems), 0,075 unidades de Taq DNA polimerase (5U/  $\mu$ L, Invitrogen) e 0,1 $\mu$ M de cada primer (senso e antisenso) (tabela 2 ) sobre as seguintes condições: 92°C (3 minutos), 40 ciclos de 92°C

(30 segundos), 60°C (1 minuto), 72°C (1 minuto) seguidos por 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de incubação). Os produtos de amplificação foram submetidos à digestão por 50 unidades da enzima de restrição BSAI (New England BioLabs) e tampão CutSmart 0,35X (50mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 20mM C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 10mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> e 100µg/mL BSA) sobre as seguintes condições: 50°C (60 minutos), 65°C (20 minutos) e 4°C (temperatura de incubação).

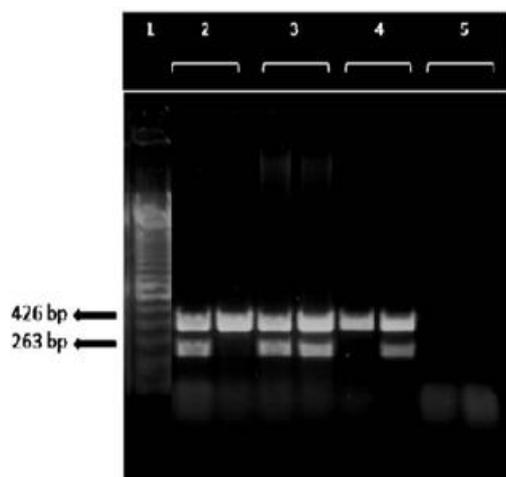
**Tabela 2.** Primers utilizados na detecção dos polimorfismos investigados.

Região alvo	PCR	Primers	Sequência nucleotídica 5' - 3'	Fragmento (pares de base)
<b><i>IFNG+874T/A</i></b>	ARMS	Genérico antisenso	TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA	263
		Específico T senso	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT	
		Específico A senso	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA	
<b><i>IL10-1082G/A</i></b>	ARMS	Genérico antisenso	CAGTGCCAACCTGAGAATTTGG	258
		Específico G senso	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG	
		Específico A senso	ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA	
<b><i>IL10-592A/C -819T/C</i></b>	ARMS	Genérico antisenso	AGGATGTGTTCCAGGCTCCT	233
		Específico C senso	CCCTTGACAGGTGATGTAAC	
		Específico T senso	ACCCTTGACAGGTGATGTAAT	
<b><i>NOS2A-954G/C</i></b>	RFLP	Antisenso	TCT GAA CTA GTC ACT TGA GG	573
		Senso	CAT ATG TAT GGG AAT ACT GAT TTT CAG	
<b>Controle interno</b>	ARMS	Antisenso	GCC TTC CAA CCATTC CCT TA	429
		Senso	TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C	

### **5.11. Visualização dos fragmentos amplificados**

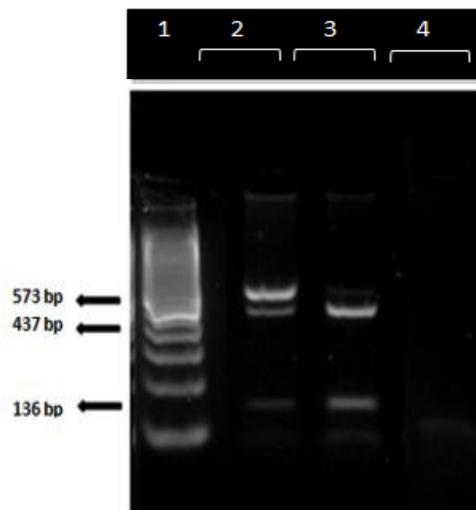
Ao final das reações de PCR, os produtos amplificados foram submetidos à migração em gel de agarose 1,5% (Sigma), para os polimorfismo de IL10 e IFNG, e gel 2%, para o polimorfismo de iNOS, em tampão UltraPure™ TBE 1X (1M Tris, 0,9 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 0,01M EDTA - Invitrogen) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (EtBr) a uma corrente constante de 72 V/cm durante aproximadamente 60 min. Em cada slot do gel foram aplicados 10 µL do produto amplificado previamente no PCR. A fim de estimar o peso molecular dos fragmentos amplificados, também será aplicado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases na concentração de 0,25 µg/mL (Invitrogen) homogeneizado em 0,5 µL de Gel Loading Dye, Blue 6X (New England BioLabs) no primeiro slot do gel. Após a eletroforese, os fragmentos serão visualizados e as imagens serão fotografadas em um transiluminador MultiDoc-It™ Digital Imaging System (UVP, Upland, CA) e registradas através do software Doc-It®LS Analysis (UVP) (figura 10). Os resíduos de brometo foram descontaminados pelo método de Armour e descartados de acordo com as normas de biossegurança.

**A. *IFNG+874T/A***



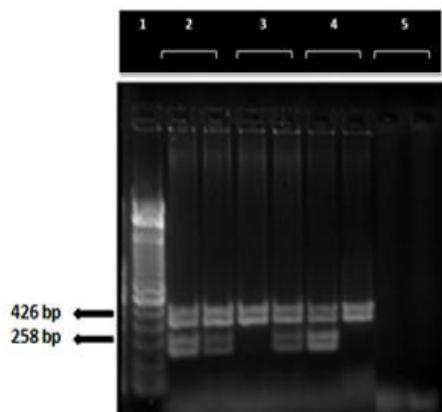
1. DNA Ladder 100 bp;
2. Indivíduo homocigoto variante AA;
3. Indivíduo heterocigoto AT;
4. Indivíduo homocigoto selvagem TT;
5. Controle negativo

**B. *NOS2A-954G/C***



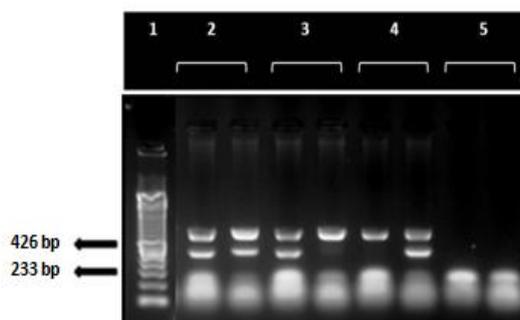
1. DNA Ladder 100 bp;
2. Indivíduo heterocigoto GC;
3. Indivíduo homocigoto selvagem GG;
4. Controle negativo

**C. *IL10A-1082G/A***



1. DNA Ladder 100 bp;
2. Indivíduo heterocigoto AG;
3. Indivíduo homocigoto selvagem GG;
4. Indivíduo homocigoto variante AA;
5. Controle negativo

**D. *IL10A-592A/C* e *IL10-819T/C***



1. DNA Ladder 100 bp;
2. Indivíduo homocigoto variante CC;
3. Indivíduo heterocigoto AC/TC;
4. Indivíduo homocigoto selvagem AA/TT;
5. Controle negativo

Fragmento de 426 pb: banda que corresponde ao controle interno; Fragmento de 263 pb: bandas específicas aos alelos T e A do polimorfismo *IFNG+874T/A*; Fragmento de 573 pb: banda específica ao alelo C do polimorfismo *NOS2A-954G/C*; Fragmento de 437 e 136 pb: bandas específicas ao alelo G do polimorfismo *NOS2A-954G/C*; fragmento de 258 pb: bandas específicas aos alelos G e A do polimorfismo *IL10A-1082G/A*; Fragmento de 233 pb: bandas específicas aos alelos A/T e C dos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C*

**Figura 9.** Genotipagem dos polimorfismos investigados

## 5.12. Armazenamento e análise estatística dos dados

Os dados epidemiológicos, hematológicos e experimentais foram armazenados no banco de dados Epi-Info 3.5.1 (CDC, Atlanta, USA). As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os indivíduos e avaliadas utilizando o teste  $\chi^2$ . O risco para malária associado aos polimorfismos foi estimado utilizando o odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (CI). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi calculado com o teste  $\chi^2$  de Person e de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas utilizando SNPStats software e GraphPad Prism 5.0 (San Diego, California, EUA). Diferenças entre os parâmetros epidemiológicos e hematológicos foram analisadas por teste t não-paramétrico. Foi considerado estatisticamente significante valores de  $P < 0.05$ . As análises genéticas correspondem ao modelo de regressão logística codominante (alelo principal homozigoto VS. heterozigoto + homozigoto secundário). A frequência de haplótipos foi considerada pelo cálculo do estimador de máxima verossimilhança via algoritmo EM (Maximização da Expectativa) utilizando dois passos, o passo “E” (esperança) e o passo “M” (máximo) até se atingir a convergência.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Descrição dos voluntários

Participaram do nosso estudo 267 indivíduos residentes em área rural do município de Porto Velho, Estado de Rondônia. No momento da coleta 73 (27,3%) se encontravam positivos para malária e 194 negativos. Para avaliarmos a possível influência de polimorfismos dos genes estudados na susceptibilidade a malária, os voluntários foram separados em dois grupos: grupo de indivíduos com diagnóstico positivo para malária (Malária (+)) e grupo com diagnóstico negativo (Malária (-)). Comparando os dois grupos, observamos uma maior frequência de indivíduos do sexo masculino nos grupos. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos indivíduos quanto à idade, nem em relação ao tempo de residência em área endêmica, parâmetros associados ao tempo de exposição à malária, sendo o tempo médio de residência em área endêmica de pelo menos 23 anos (Tabela 3).

A história pregressa de malária na população foi avaliada com base em dados relatados pelos indivíduos, referentes aos diagnósticos anteriores no exame parasitológico direto (gota espessa). Deste modo, com base nestes dados analisamos o número de episódios anteriores de malárias (NEAM) e o tempo desde a última infecção (TDUI). Conforme demonstrado na Tabela 3, os indivíduos sem malária (Malária (-)) tiveram mais episódios anteriores de malária e estão a mais tempo sem malária do que o grupo de indivíduos com malária (Malária (+)). Entretanto essa diferença não foi significativa.

**Tabela 3.** Dados Epidemiológicos dos Grupos de Estudo

<b>Diagnóstico de Malária</b>				
	<b>Positivo N=73</b>	<b>Negativo N=194</b>	<b>Total N=267</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Gênero n(%)</b>				
♀	21 (28,8%)	98 (50,5%)	119 (44,6%)	0,001
♂	52 (71,2%)	96 (49,5%)	148 (55,4%)	0,001
<b>Idade (X±DP)</b>	30,5±11,9	30,1±15,4	30,2±14,5	0,531
<b>TRAE (X±DP)</b>	26,6±11,8	23,9±12,7	24,7±12,5	0,079
<b>NEAM (X±DP)</b>	6,7±8,4	11,1±15,5	9,9±14,0	0,072
<b>TDUI (X±DP)</b>	36,4±78,1	43,1±68,2	41,2±70,9	0,016

X=média aritmética; DP=desvio padrão.

TRAE: Tempo de Residência em Área Endêmica (anos); NEAM: Número de Episódios Anteriores de Malária (n); TDUI: tempo desde a última infecção (meses).

Nos indivíduos com malária, 72,6% estavam infectados com *P. vivax* e 27,4% com *P. falciparum* (Tabela 4). Todos os indivíduos infectados apresentavam sintomas de malária independente da espécie plasmodial diagnosticada sendo cefaleia e febre os sintomas mais frequentes. Nenhum indivíduo apresentou malária grave e não houve diferença na média de parasitemia entre os indivíduos infectados com *P. falciparum* ou com *P. vivax*.

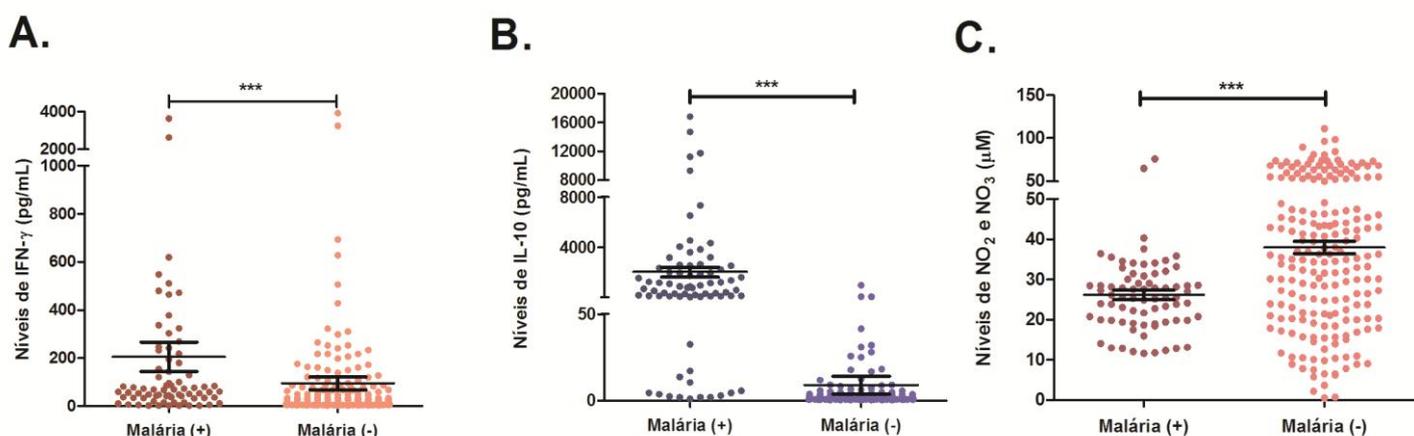
**Tabela 4.** Descrição das Espécies Plasmodiais e Sintomatologia.

Malária			
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Total
Número de infectados n(%)	53 (72,6%)	20 (27,4%)	73
Parasitemia ( $\bar{X}\pm DP$ )	4410,3 $\pm$ 4549,8	3130,0 $\pm$ 3665,6	4071,4 $\pm$ 4344,2
Início dos sintomas ( $\bar{X}\pm DP$ )	2,7 $\pm$ 1,3	3,5 $\pm$ 2,5	3,0 $\pm$ 1,9
Febre	38 (71,7%)	15 (75%)	53 (72,6%)
Cefaléia	40 (75,5%)	15 (75%)	55 (75,3%)
Calafrio	32 (60,4%)	13 (65%)	45 (61,6%)
Mialgia	31 (58,5%)	14 (70%)	45 (61,6%)
Náusea	20 (37,7%)	11 (55%)	31 (42,5%)

X=média aritmética; DP=desvio padrão;  
Parasitemia expressa por parasitas/ $\mu$ l.

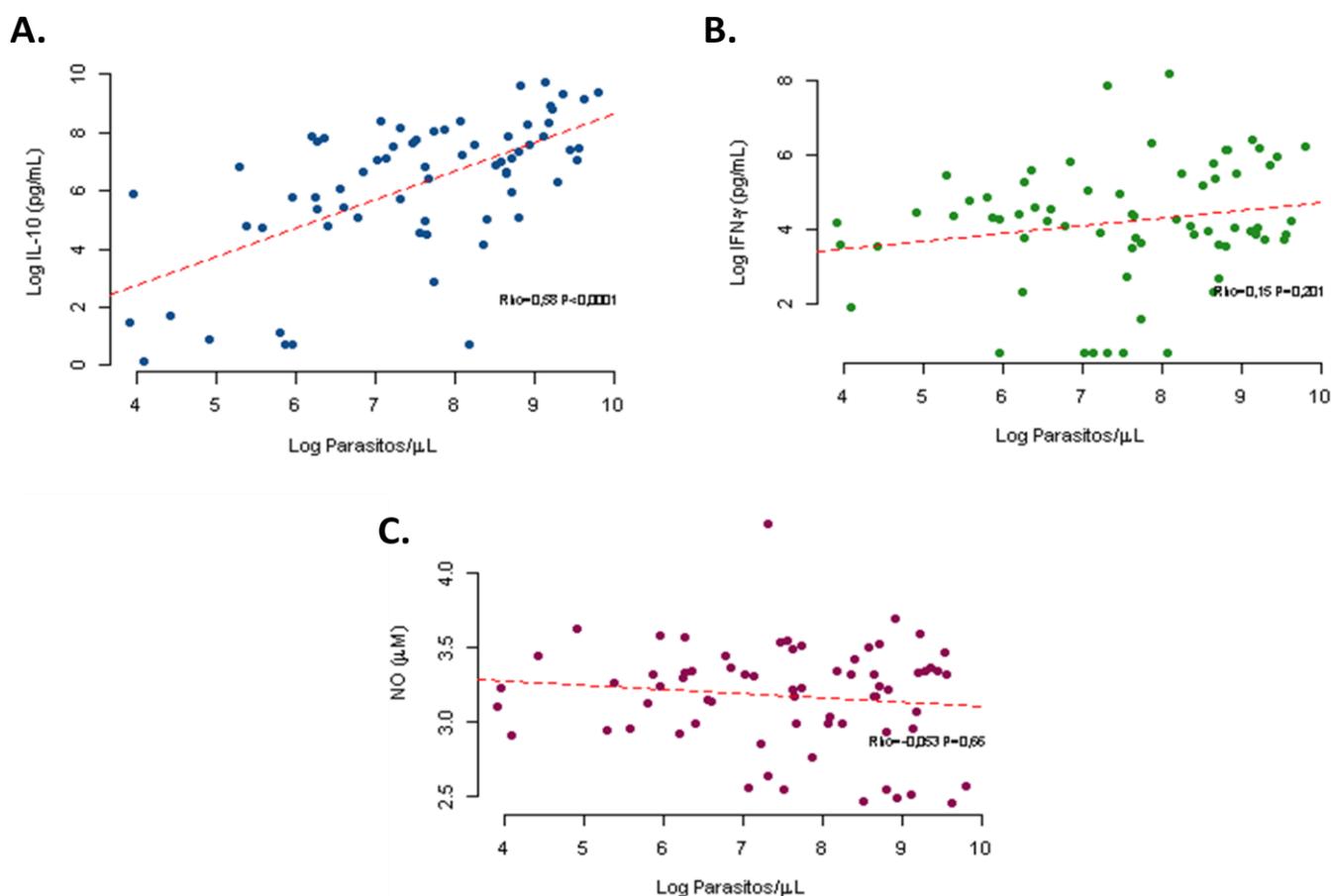
## 6.2. Níveis plasmáticos das Citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 e dos Radicais de Nitrogênio nos grupos de Estudo

Comparando os níveis plasmáticos das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 e dos radicais de nitrogênio ( $NO_2 + NO_3$ ) entre os indivíduos com e sem para malária observamos que os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e IL-10 foram maiores nos indivíduos com malária (figura 10. A e B). Em contraste, como esperado, os níveis dos radicais de nitrogênio foram maiores nos indivíduos que tiveram diagnóstico negativo para a malária ( $P < 0,0001$ ) (figura 10. C).



**Figura 10.** Níveis plasmáticos dos mediadores (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10 e (C) NO nos indivíduos com diagnóstico positivo e negativo de malária.

Nos indivíduos com malária também avaliamos se os níveis séricos das citocinas e dos radicais de nitrogênio estavam correlacionados com a densidade parasitária. Os resultados na Fig. 11A mostram que os níveis de IL-10 correlacionam positivamente com a parasitemia ( $r= 0,58$ ). Contudo, as concentrações de IFN- $\gamma$  e dos radicais de nitrogênio ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) não se correlacionaram com a densidade parasitária (figura 11. B e C) ( $r= 0,15$ ;  $r= 0,05$ ).

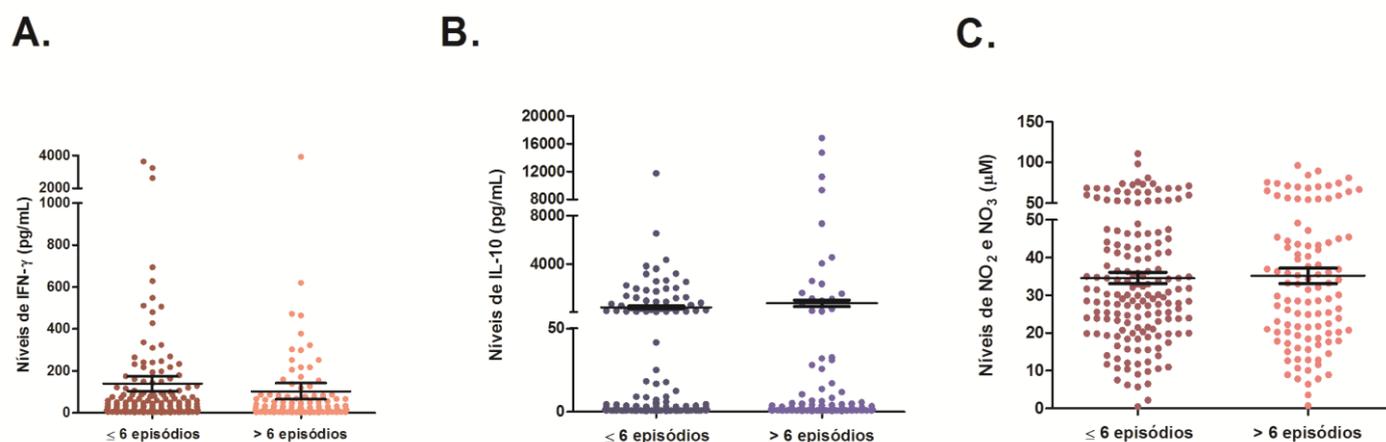


**Figura 11.** Correlação dos níveis das citocinas e dos radicais de nitrogênio com a densidade parasitária

### 6.3. Influência da história prévia de malária na concentração plasmática das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 e dos radicais de Nitrogênio

As concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$ , IL-10 e NO, também foram analisadas separando os grupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária. Os dados na Fig. 12 mostram que os níveis séricos das citocinas (Fig. 12A e B) e dos radicais

de nitrogênio (Fig. 12C) foram semelhantes nos indivíduos que tiveram menos que 6 episódios de malária no passado quando comparados com o grupo de indivíduos que tiveram mais que 6 episódios.



**Figura 12.** Níveis plasmáticos dos mediadores IFN- $\gamma$ (A), IL-10(B) e NO(C) nos grupos de acordo com o número de infecções anteriores de malária.

#### 6.4. Frequências Alélicas e Genóticas do Polimorfismo *IFNG* +874T/A

As frequências dos genótipos e dos alelos de *IFNG* +874T/A nos grupos estudados estão listadas na Tabela 5. Primeiramente, observou-se uma maior frequência de homozigotos AA (52%) do que heterozigotos AT (41,1%) e homozigotos para o alelo selvagem T (6,8%), tanto no grupo Malaria (+) quanto no grupo Malária (-) (AA: 52,1%; AT: 39,7%; TT: 8,2%). As frequências alélicas de *IFNG* +874T/A foram semelhante em ambos os grupos, cujo alelo variante *IFNG* +874 A foi mais frequente do que o T selvagem. A distribuição dos genótipos nos grupos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,07$ ,  $P = 0,78$ ;  $\chi^2 = 0,06$ ,  $P = 0,80$ ).

**Tabela 5.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IFNG+874T/A* nos grupos positivo e negativo para malária.

Polimorfismo <i>IFNG+874T/A</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de <i>P</i>
	Malária (+) (N=73)	Malária (-) (N=194)		
<b>Alelos</b>				
A	106 (73%)	279 (72%)	0,16 (0,68 – 1,58)	0,87
T	40 (27%)	109 (28%)		
<b>Genótipos</b>				
AA	38 (52%)	101 (52,1%)	1,00	
AT	30 (41,1%)	77 (39,7%)	0,97 (0,55 – 1,70)	0,92
TT	5 (6,8%)	16 (8,2%)	1,20 (0,41 – 3,51)	

*IFNG*, gene interferon gama; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  utilizando o modelo de codominância.

### 6.5. Frequências Alélicas e Genóticas dos Polimorfismos do gene *IL10A*

Na tabela 6, podemos observar que as frequências dos alelos A e G para o polimorfismo *IL10A-1082G/A* foram respectivamente, 48% e 52% no grupo com malária e 55% e 45% no grupo com diagnóstico negativo. Nas análises genóticas, o genótipo heterozigoto AG foi o mais frequente em ambos os grupos e maior no grupo com malária (87,7%) quando comparado com o grupo com diagnóstico negativo (69,6%;  $P= 0,0009$ ). Entretanto, as proporções genóticas dos grupos não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2= 41,76$ ,  $P= 0,00$ ;  $\chi^2= 32,33$ ,  $P= 0,000$ ), invalidando a possível associação do polimorfismo *IL10A-1082G/A* com a malária.

**Tabela 6.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IL10-1082G/A* nos grupos positivo e negativo para malária.

Polimorfismo <i>IL10-1082G/A</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de P
	Malária (+) (N=73)	Malária (-) (N=194)		
<b>Alelos</b>				
A	70 (48%)	215 (55%)	0,74 (0,50 – 1,08)	0,12
G	76 (52%)	173 (45%)		
<b>Genótipos</b>				
AA	3 (4,1%)	40 (20,6%)	1,00	
AG	64 (87,7%)	135 (69,6%)	0,16 (0,05 – 0,53)	0,0009
GG	6 (8,2%)	19 (9,8%)	0,24 (0,05 – 1,05)	

*IL10A*, gene interleucina 10; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  utilizando o modelo de codominância.

Para os polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* foi feita uma única análise devido o desequilíbrio de ligação que ocorre nos dois polimorfismos, ou seja, quando ocorre o SNP (troca de nucleotídeo) em um, obrigatoriamente ocorre no outro, sendo assim temos as mesmas frequências dos alelos e genótipos selvagens e variantes.

A distribuição das frequências dos grupos está listada na tabela 7 e seguiram o modelo de regressão logística de codominância e teste  $\chi^2$ . Tanto as distribuições alélicas quanto genotípica apresentaram diferença significativa. Os alelos selvagens A/T foram mais frequentes no grupo Malária (+) (58%), enquanto no grupo Malária (-) observamos o contrário, maior prevalência do alelo C variante (62%) (OR= 0,45; P=0,0001). Para os genótipos, os homozigotos selvagens AA/TT também foram mais frequentes no grupo Malária (+) (32,9%) e o homozigoto variante CC mais frequente no grupo Malária (-) (36,1%), sendo a frequência do genótipo heterozigoto semelhante nos dois grupos (49,3% e 51,5%) (P= 0,0002). O modelo de codominância associa os alelos selvagens A/T a malária e ao alelo C variante uma menor chance de ter a doença.

**Tabela 7.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IL10-592A/C* e *IL10-819T/C* nos grupos positivo e negativo para malária.

Polimorfismos <i>IL10-592A/C</i> e <i>IL10-819T/C</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de <i>P</i>
	Malária (+) (N=73)	Malária (-) (N=194)		
<b>Alelos</b>				
C	62 (42%)	240 (62%)	0,45 (0,30 – 0,67)	0,0001
A/T	84 (58%)	148 (38%)		
<b>Genótipos</b>				
CC	13 (17,8%)	70 (36,1%)	1,00	
CA/CT	36 (49,3%)	100 (51,5%)	0,52 (0,26 – 1,04)	0,0002
AA/TT	24 (32,9%)	24 (12,4%)	0,19 (0,08 – 0,42)	

*IL10A*, gene interleucina 10; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  utilizando o modelo de codominância.

### 6.6. Frequências Alélicas e Genóticas do Polimorfismo *NOS2A-954G/C*

Para o polimorfismo *NOS2A-954G/C* foi feito teste  $X^2$  de Fisher utilizando o modelo de regressão logística codominante. As análises estão listadas na tabela 8, na qual observamos que o genótipo homocigoto selvagem GG foi mais frequente nos dois grupos (Malária (+) 95,9% e Malária (-) 94,3%). A frequência alélica apresentou distribuição semelhante em ambos os grupos, sendo mais frequente o alelo G selvagem ( $P= 0,60$ ). As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2= 0,03$ ,  $P= 0,85$ ;  $\chi^2= 0,16$ ,  $P= 0,68$ ).

**Tabela 8.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *NOS2A-954G/C* nos grupos positivo e negativo

Polimorfismo <i>NOS2A-954G/C</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de <i>P</i>
	Malária (+) (N=73)	Malária (-) (N=194)		
<b>Alelos</b>				
G	143 (98%)	377 (97%)	1,39 (0,38 – 5,05)	0,6
C	3 (2%)	11 (3%)		
<b>Genótipos</b>				
GG	70 (95,9%)	183 (94,3%)	1,00	
CG	3 (4,1%)	11 (5,7%)	1,40 (0,38 – 5,18)	0,6
CC	-	-	-	

*NOS2A*, gene óxido nítrico sintase indutase; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  de Fisher utilizando o modelo de codominância.

### 6.7. Análise Haplótípica do Gene *IL10A*

Neste estudo também analisamos se a associação dos polimorfismos da região promotora -1082/-592/-819 do *IL10A* pode contribuir para a susceptibilidade ou resistência à malária. Dessa forma, conseguimos construir quatro haplótipos a partir de combinações dos polimorfismos investigados no gene *IL10A*. Através do cálculo do estimador de máxima verossimilhança via algoritmo EM e do modelo de regressão logística, foi considerada a frequência dos haplótipos.

O haplótipo mais frequente ou haplótipo de referência foi o haplótipo 1 - GCC (Hap1), seguido pelo haplótipo 2 - AAT (Hap2). Os haplótipos Hap1 e Hap2 apresentaram frequência semelhante nos grupos com diagnóstico positivo e negativo (Hap1=0,3257 e Hap2=0,37; Hap1=0,3805 e Hap2=0,3056, respectivamente) (*P*= 0,66). Contudo, os haplótipos 3 - ACC e 4 - GAT (Hap3 e Hap4) apresentaram diferença significativa, com maior prevalência do Hap3 no grupo com diagnóstico negativo (0,2486) e maior

prevalência do Hap4 no grupo positivo (0,1948). Essa distribuição e os dados obtidos da análise indicam que o Hap3 está associado com proteção à malária (OR=0,36;  $P= 0,036$ ) e o Hap4 está associado ao risco de contrair a malária (OR=3,83;  $P=0,009$ ) (tabela 9).

**Tabela 9.** Frequências dos haplótipos do gene *IL10A* nos grupos positivo e negativo.

<i>Frequências dos Haplótipos</i>							
	-1082	-819	-592	Malária (+)	Malária (-)	OR (95% CI)	*Valor de $P$
<i>Hap1</i>	G	C	C	0,3257	0,37	1,00	-
<i>Hap2</i>	A	T	A	0,3805	0,3056	0,85 (0,40 – 1,77)	0,66
<i>Hap3</i>	A	C	C	0,0989	0,2486	0,36 (0,14 – 0,93)	0,036
<i>Hap4</i>	G	T	A	0,1948	0,0759	3,83 (1,40 – 10,45)	0,009

-1082/-592/-819: posições dos polimorfismos na região promotora do gene interleucina 10; OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo cálculo de EMV via algoritmo EM utilizando modelo de regressão logística.

### 6.8. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IFNG+874T/A* de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

Avaliamos o polimorfismo *IFNG+874T/A* nos subgrupos de indivíduos de acordo com o número de episódios de malária através da análise de  $\chi^2$  e o uso do modelo de regressão logística co-dominante, e vimos que a distribuição dos genótipos foi significativamente diferente entre os dois subgrupos, com maior frequência do genótipo homozigoto variante AA no grupo com  $\leq 6$  episódios (55,6%) e maior frequência do genótipo homozigoto selvagem TT no grupo  $> 6$  episódios (12,3%) ( $P= 0,08$ ). Essa diferença se reflete na distribuição alélica de *IFNG +874T/A*, na qual o alelo variante A foi significativamente mais frequente do que o T selvagem e apresentou o valor de  $OR < 1$  e  $P=0,04$ , indicando uma associação protetora do alelo A à malária (tabela 10). Os grupos analisados de acordo com o número de episódios estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $> 6$  episódios:  $\chi^2= 0,61$  e  $P= 0,78$ ;  $\leq 6$  episódios:  $\chi^2= 0,06$  e  $P= 0,80$ ).

**Tabela 10.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IFNG*+874T/A nos subgrupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

Polimorfismo <i>IFNG</i> +874T/A	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de <i>P</i>
	Indivíduos com nº de episódios >6 (N=106)	Indivíduos com nº de episódios ≤6 (N=160)		
<b>Alelos</b>				
A	143 (67%)	241 (75%)	0,67 (0,46 – 0,99)	0,04
T	69 (33%)	79 (25%)		
<b>Genótipos</b>				
AA	50 (47,2%)	89 (55,6%)	1,00	
AT	43 (40,6%)	63 (39,4%)	0,82 (0,49 – 1,38)	0,08
TT	13 (12,3%)	8 (5%)	0,35 (0,13 – 0,89)	

*IFNG*, gene interferon gama; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  utilizando o modelo de codominância.

### 6.9. Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos do gene *IL10A* de acordo com o número de episódios anteriores de malária

As frequências alélicas do polimorfismo *IL10A-1082G/A* foram 51% do alelo A variante e 49% do alelo G selvagem no subgrupo >6 episódios e 55% do alelo A variante e 45% do alelo G selvagem no subgrupo ≤6 episódios. O genótipo heterozigoto AT do polimorfismo *IL10A-1082G/A* manteve-se presente em frequências aumentadas (72,6% e 75,6%), porém não foi significativo ( $P= 0,43$ ), assim como na distribuição alélica ( $P= 0,45$ ) (Tabela 11). O equilíbrio de Hardy-Weinberg também não se manteve nos subgrupos >6 e ≤6 episódios ( $\chi^2= 21,84$ ,  $P= 0,00$ ;  $\chi^2= 44,25$ ,  $P= 0,00$ , respectivamente).

**Tabela 11.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IL10-1082G/A* nos subgrupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

Polimorfismo <i>IL10-1082G/A</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de <i>P</i>
	Indivíduos com nº de episódios >6	Indivíduos com nº de episódios ≤6		
	(N=106)	(N=160)		
<b>Alelos</b>				
A	109 (51%)	175 (55%)	0,87 (0,61 – 1,24)	0,45
G	103 (49%)	145 (45%)		
<b>Genótipos</b>				
AA	16 (15,1%)	27 (16,9%)	1,00	
AG	77 (72,6%)	121 (75,6%)	0,93 (0,47 – 1,84)	0,43
GG	13 (12,3%)	12 (7,5%)	0,55 (0,20 – 1,49)	

*IL10A*, gene interleucina 10; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  utilizando o modelo de co-dominância.

As análises de acordo com o número de episódios anteriores de malária para os polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* se encontram listadas na tabela 12. Apesar da diferença significativa encontrada nos subgrupos de acordo com diagnóstico para esses polimorfismos, em relação ao número de casos as frequências alélicas foram semelhantes nos dois subgrupos (>6 episódios: 56% do alelo C variante e 44% dos alelos selvagens A/T; ≤6 episódios: 57% do alelo C variante e 43% dos alelos selvagens A/T) ( $P=0,78$ ). Assim como a distribuição alélica, a distribuição dos genótipos foi homogênea e não apresentou nenhuma diferença significativa ( $P=0,88$ ). Os subgrupos apresentados na tabela 11 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=0,52$ ,  $P=0,46$ ;  $\chi^2=0,06$  e  $P=0,80$ ).

**Tabela 12.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *IL10-592A/C* e *IL10-819T/C* nos subgrupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

Polimorfismos <i>IL10-592A/C</i> e <i>IL10-819T/C</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de <i>P</i>
	Indivíduos com n <sup>o</sup> de episódios >6 (N=106)	Indivíduos com n <sup>o</sup> de episódios ≤6 (N=160)		
<b>Alelos</b>				
C	118 (56%)	182 (57%)	0,95 (0,67 – 1,35)	0,78
A/T	94 (44%)	138 (43%)		
<b>Genótipos</b>				
CC	31 (29,2%)	51 (31,9%)	1,00	
CA/CT	56 (52,8%)	80 (50%)	0,87 (0,50 – 1,52)	0,88
AA/TT	19 (17,9%)	29 (18,1%)	0,93 (0,45 – 1,93)	

*NOS2A*, gene óxido nítrico sintase indutase; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  de Fisher utilizando o modelo de co-dominância.

#### 6.10. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *NOS2A-954G/C* acordo com o número de episódios anteriores de malária.

No polimorfismo *NOS2A-954G/C* foi utilizado o teste  $\chi^2$  de Fisher com o modelo de regressão logística codominante. O genótipo homocigoto selvagem GG foi mais frequente em nos subgrupos >6 e ≤6 episódios anteriores de malária, 96,2% e 93,8%, respectivamente. Porém essa diferença não parece mostrar associação com a malária (OR=1,70; *P*= 0,37). A frequência alélica apresentou distribuição semelhante nos grupos, sendo mais frequente o alelo G selvagem (*P*= 0,38) (tabela 13). As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2$ = 0,39, *P*= 0,84;  $\chi^2$ = 0,16 e *P*= 0,68).

**Tabela 13.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *iNOS-954G/C* nos subgrupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

Polimorfismo <i>iNOS-954G/C</i>	Frequências n (%)		OR (95% CI)	*Valor de P
	Indivíduos com n <sup>o</sup> de episódios >6 (N=106)	Indivíduos com n <sup>o</sup> de episódios ≤6 (N=160)		
<b>Alelos</b>				
G	208 (98%)	310 (97%)	1,67 (0,51 – 5,41)	0,38
C	4 (2%)	10 (3%)		
<b>Genótipos</b>				
GG	102 (96,2%)	150 (93,8%)	1,00	
CG	4 (3,8%)	10 (6,2%)	1,70 (0,52 – 5,57)	0,37
CC	-	-	-	

*NOS2A*, gene óxido nítrico sintase indutase; Alelos, n(%); Genótipos, n(%); OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo teste  $\chi^2$  de Fisher utilizando o modelo de co-dominância.

### 6.11. Frequências dos haplótipos do gene *IL10A* nos subgrupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

A análise dos subgrupos >6 e ≤6 episódios anteriores de malária para o haplótipos está representada na tabela 14. O Hap1 foi o mais frequente nos dois grupos (0,369 e 0,334), seguido pelo Hap2 (0,3265 e 0,3121). Hap3 e Hap4 ocorreram em menor frequência, porém diferente da análise dos grupos positivo e negativo, não houve diferença significativa na distribuição dos haplótipos (Hap3: OR=1,46; P=0,24 e Hap4: OR=1,05; P=0,92).

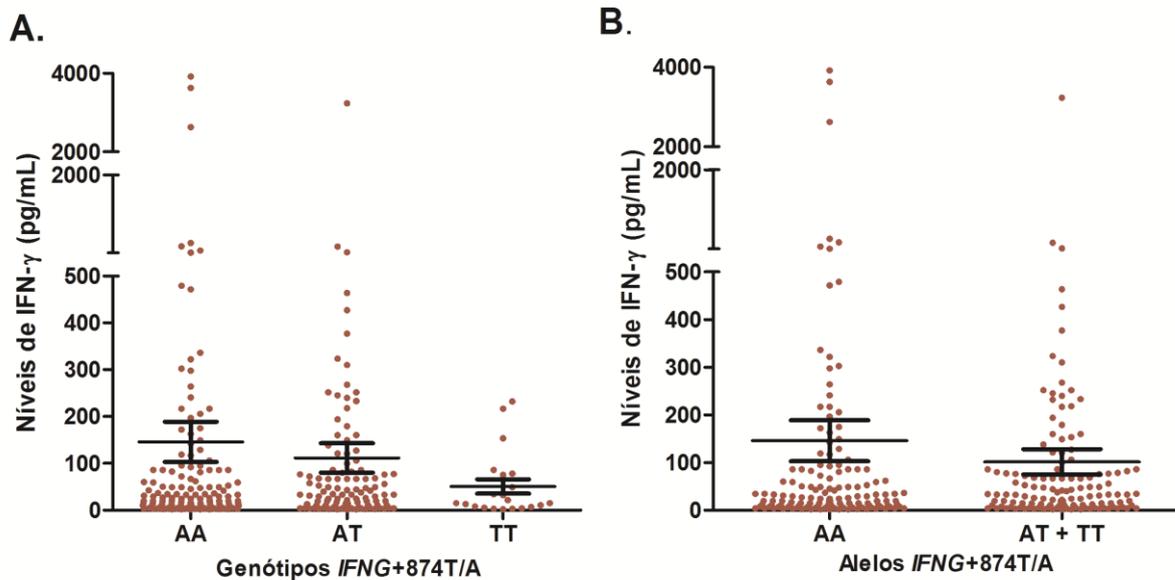
**Tabela 14.** Frequências dos haplótipos do gene *IL10A* nos subgrupos de acordo com o número de episódios anteriores de malária.

<i>Frequências dos Haplótipos</i>							
	-1082	-819	-592	Indivíduos com Número de Episódios > 6	Indivíduos com Número de Episódios ≤ 6	OR (95% CI)	*Valor de P
<i>Hap1</i>	G	C	C	0,369	0,334	1,00	-
<i>Hap2</i>	A	T	A	0,3265	0,3121	1,16 (0,64 – 2,09)	0,63
<i>Hap3</i>	A	C	C	0,1876	0,2347	1,46 (0,78 – 2,75)	0,24
<i>Hap4</i>	G	T	A	0,1169	0,1191	1,05 (0,46 – 2,39)	0,92

-1082/-592/-819: posições dos polimorfismos na região promotora do gene interleucina 10; OR (95% CI), cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança (CI) de 95%; \*Análise pelo cálculo de EMV via algoritmo EM utilizando modelo de regressão logística.

## 6.12. Análise Funcional do Polimorfismo *IFNG+874T/A*

Com o intuito de verificar se os polimorfismos investigados influenciavam nos níveis séricos da citocina IFN $\gamma$ , comparamos as concentrações desse mediador com os genótipos e alelos encontrados na população estudada (Fig. 13A e B). Os indivíduos com genótipo homocigoto variante AA tiveram em média 145,72±506,44 pg/mL de IFN- $\gamma$ , o genótipo heterocigoto AT 111,62 ± 326,35 pg/mL e o homocigoto selvagem TT 50,71 ± 69,17 pg/mL, porém essas diferenças não foram significativas (P=0,33). As concentrações de IFN- $\gamma$  associadas aos alelos foram 130,89 ± 436,85 pg/mL para os genótipos que carregam o alelo variante A e 101,62 ± 300,27 pg/mL para os carreadores do alelo selvagem T, estatisticamente semelhantes, com valor de P= 0,45.

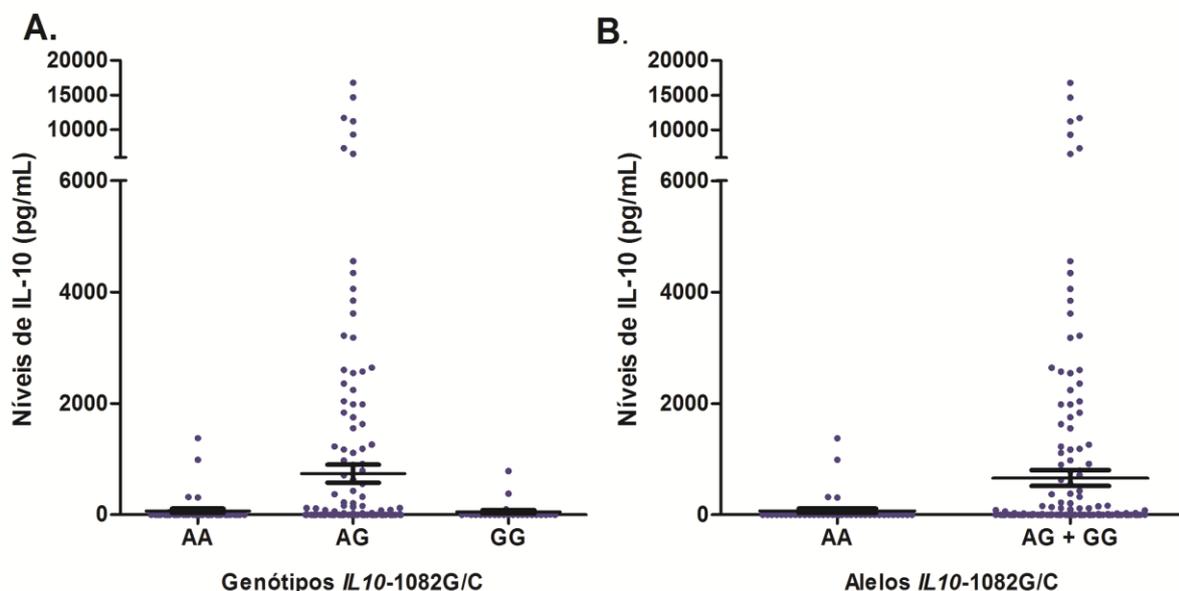


**Figura 13.** Concentração de IFN- $\gamma$  de acordo com os genótipos e alelos presentes no polimorfismo *IFNG+874T/A*.

### 6.13. Análise Funcional dos Polimorfismos do Gene *IL10A*

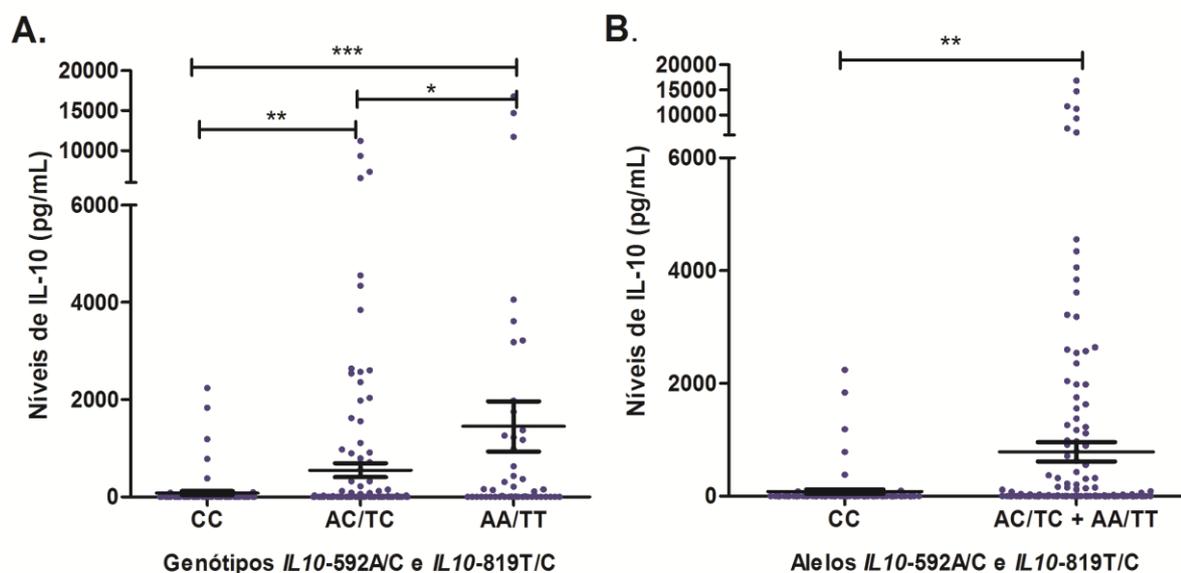
Na figura 14 foram observadas concentrações de IL-10 de  $73,40 \pm 260,16$  pg/mL para o genótipo homocigoto variante AA,  $738,54 \pm 260,16$  pg/mL para o heterocigoto AG e  $53,03 \pm 171,30$  pg/mL para o homocigoto GG, que foi representado por um pequeno número de indivíduos. As médias das concentrações de IL-10 para os carreadores dos alelos foram  $620,35 \pm 2069,82$  pg/mL para os genótipos que carregam o alelo variante A e  $662,03 \pm 2144,07$  pg/mL para os que carregam o alelo G selvagem.

O polimorfismo *IL10A-1082G/A* não apresentou diferença significativa entre os genótipos (Fig. 14A) e os alelos carregados pelos genótipos (Fig. 14B) e IL-10. O valor de *P* foi 0,28 para o polimorfismo *IL10A-1082G/A*.



**Figura 14.** Concentração de IL-10 de acordo com os genótipos e alelos presentes no polimorfismo *IL10A-1082G/A*

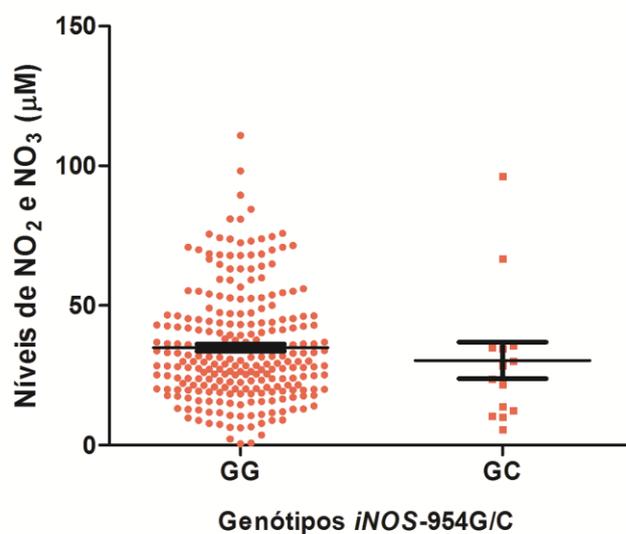
Os genótipos e alelos presentes nos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* apresentaram forte associação com os níveis plasmáticos de IL-10. As concentrações de IL-10 foram mais baixas nos indivíduos que portavam o genótipo homocigoto variante CC ( $82,26 \pm 349,82$  pg/mL), quando comparadas aos indivíduos com genótipo heterocigoto AC/TC com níveis intermediários de IL-10 ( $551,25 \pm 1664,37$  pg/mL) e aos indivíduos com genótipo homocigoto selvagem AA/TT com níveis elevados do mediador ( $1451,13 \pm 3571,25$  pg/mL) ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15A). Os genótipos carreadores do alelo C variante apresentaram níveis muito reduzidos ( $373,50 \pm 1346,65$  pg/mL) comparados aos indivíduos carreadores dos alelos A ou T selvagens ( $785,50 \pm 1346,65$ ) ( $P=0,007$ ) (Fig. 15B).



**Figura 15.** Concentração de IL-10 de acordo com os genótipos e alelos presentes nos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C*

#### 6.14. Análise Funcional do Polimorfismo *NOS2A-954G/C*

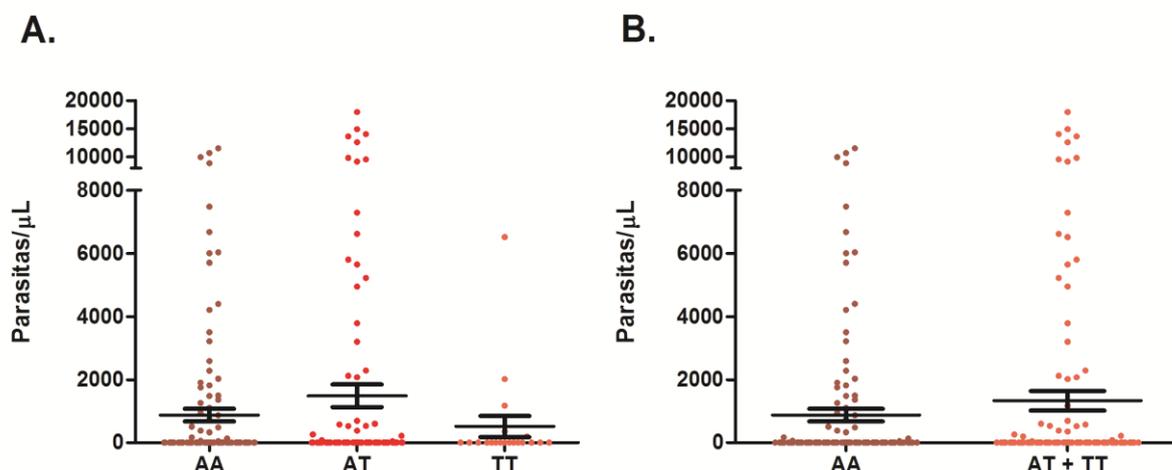
As concentrações dos radicais de nitrogênio foram em média  $34,99 \pm 19,57$  pg/mL para o homocigoto GG selvagem e  $30,34 \pm 24,59$  pg/mL para o heterocigoto GC. Não houve amostra para o genótipo CC, e observando os alelos carregados tivemos análise idêntica à genotípica devido a ausência do genótipo CC. O polimorfismo *NOS2A-954G/C* não apresentou diferença significativa entre os genótipos (figura 16) e alelos carregados, e as concentrações de radicais de nitrogênio. O valor de *P* foi 0,19 para o polimorfismo *NOS2A-954G/C*.



**Figura 16.** Concentrações dos radicais de nitrogênio de acordo com os genótipos presentes no polimorfismo *NOS2A-954G/C*

#### 6.15. Influência do Polimorfismo *IFNG+874T/A* na Densidade Parasitária

Na Fig. 17, não observamos nenhuma influência no polimorfismo *IFNG+874T/A* na densidade parasitária do grupo com malária. Não houve diferença significativa nos níveis de parasitemia entre os genótipos heterozigotos AT ( $1487,34 \pm 3665,82$  parasitas/ $\mu\text{L}$ ), homozigoto selvagem TT ( $512,95 \pm 1501,54$  parasitas/ $\mu\text{L}$ ) e homozigoto variante AA ( $875,59 \pm 2229,39$  parasitas/ $\mu\text{L}$ ) (Fig. 17A), e nem avaliando os alelos carregados pelos genótipos, T selvagem e A variante (Fig. 17B).



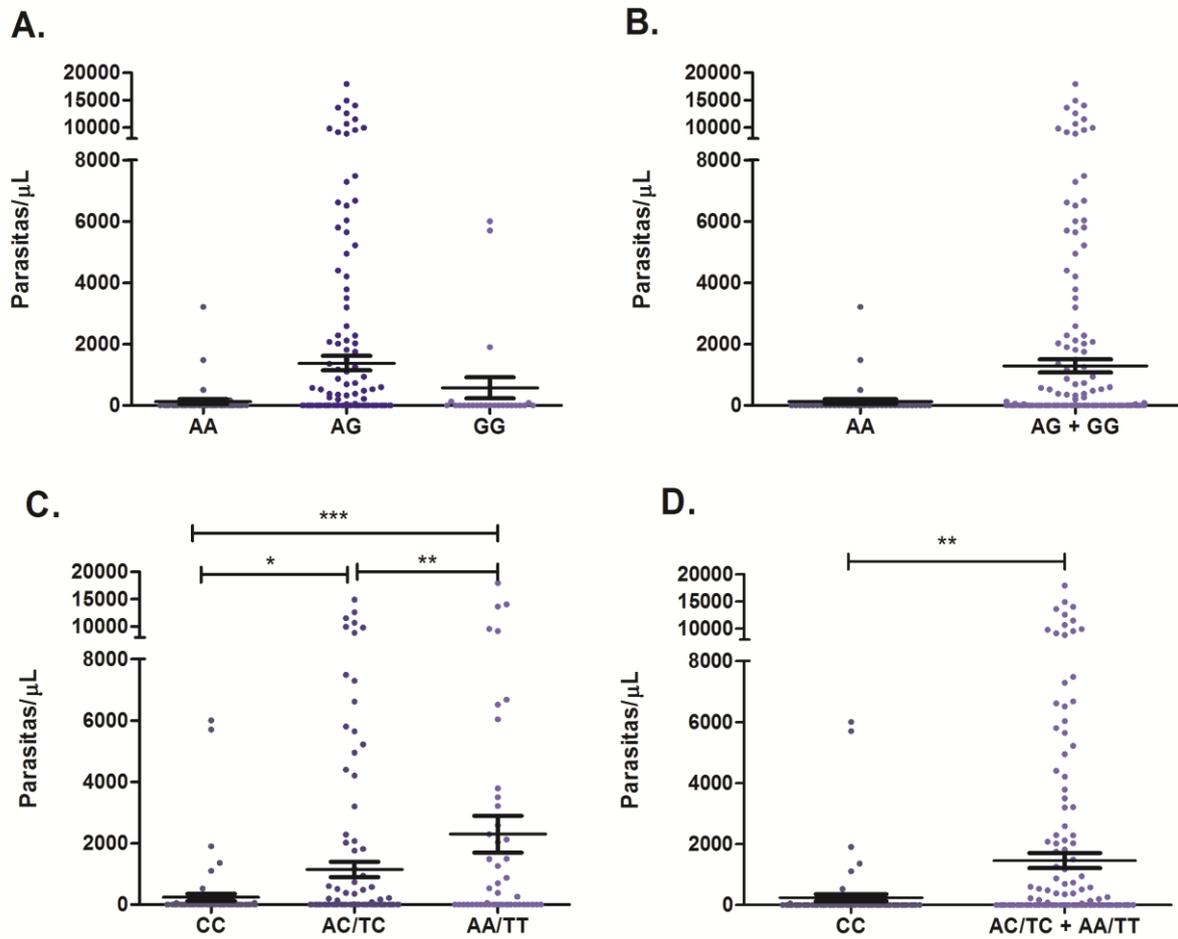
**Figura 17.** Comparação da densidade parasitária e as variantes do polimorfismo *IFNG+874T/A*

### 6.16. Influência dos polimorfismos do gene *IL10A* na Densidade Parasitária

As médias das densidades parasitárias foram estatisticamente semelhantes nos diferentes genótipos do polimorfismo *IL10A-1082G/A*, nas quais o homozigoto variante AA apresentou  $130,95 \pm 549,85$  parasitas/ $\mu\text{L}$ , o heterozigoto AG  $1378,72 \pm 3238,91$  parasitas/ $\mu\text{L}$ , e o homozigoto selvagem GG  $576,13 \pm 1670,49$ . A baixa parasitemia observada nos indivíduos homozigoto GG não é significativa e pode ser devido a número pequeno de indivíduos com esse genótipo. Entretanto, as densidades parasitárias encontradas nos indivíduos homozigotos AA foram significativamente menores do que nos heterozigotos AG ( $P= 0,007$ ), demonstrando associação desses genótipos com maiores parasitemias (figura 18. A). Além disso, a variante alélica carregada do polimorfismo *IL10A-1082G/A* apresentou diferença significativa quando comparamos as densidades parasitárias ( $P= 0,004$ ) (figura 18. B).

Nos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C*, nos quais vemos as mesmas médias devido o desequilíbrio de ligação nos dois polimorfismos, encontramos  $2295,31 \pm 4169,11$  parasitas/ $\mu\text{L}$  nos indivíduos homozigoto selvagem AA ou TT,  $1143,54 \pm 2875,53$  parasitas/ $\mu\text{L}$  nos indivíduos heterozigotos AC ou TC, e  $233,40 \pm 997,35$  parasitas/ $\mu\text{L}$  nos indivíduos homozigoto variante CC. A parasitemia de acordo com os genótipos foi significativamente diferente, com valor de  $P < 0,0001$ , indicando que o genótipo homozigoto variante CC apresenta baixa parasitemia, seguido por uma parasitemia intermediária no genótipo heterozigoto AC/TC, e parasitemia aumentada nos indivíduos

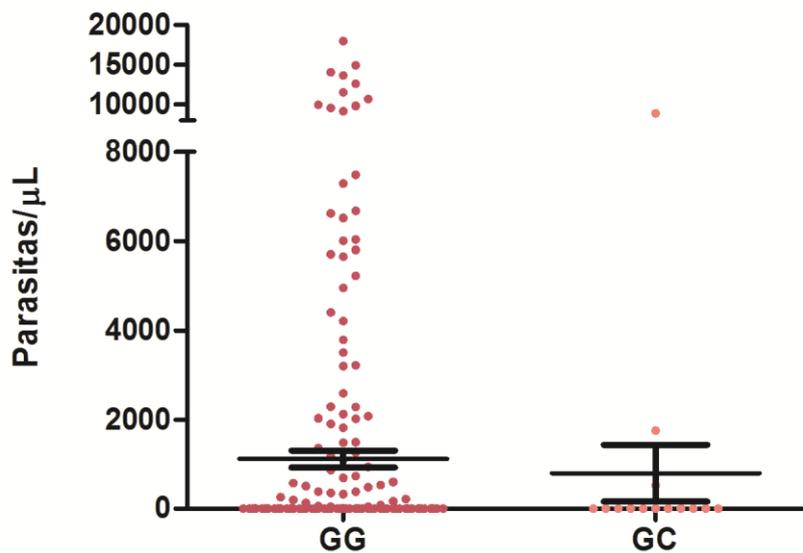
que carregam o genótipo homocigoto selvagem AA/TT (figura 18. C). Essa diferença foi significativa e a forte associação da densidade parasitária com os polimorfismos *IL10A*-592A/C e *IL10A*-819T/C se manteve quando comparamos os alelos carregados pelos genótipos ( $P=0,008$ ; figura 18. D).



**Figura 18.** Comparação da densidade parasitária nos genótipos e alelos carregados pelos genótipos no polimorfismo do gene *IL10A*

### 6.17. Influência do polimorfismo *NOS2A-954G/C* na Densidade Parasitária

Para o polimorfismo *NOS2A-954G/C* não detectamos o genótipo homocigoto variante CC e não encontramos nenhuma diferença significativa entre a densidade parasitária do genótipo heterocigoto GC ( $797,86 \pm 2376,97$  parasitas/ $\mu\text{L}$ ) e homocigoto selvagem GG ( $1117,00 \pm 2913,91$  parasitas/ $\mu\text{L}$ ) (figura 19).



**Figura 19.** Comparação da densidade parasitária e as variantes do polimorfismo *NOS2A-954G/C*

## 7. DISCUSSÃO

A compreensão da variabilidade da resposta do hospedeiro à infecção malárica continua a ser um grande desafio. Fatores genéticos, tanto do hospedeiro como ambientais, contribuem para essa variabilidade, conferindo resistência inata ou interferindo de alguma forma na resposta imune.

É possível destacar como fontes de variabilidade no caráter de susceptibilidade à malária, fatores inerentes ao hospedeiro, tais como polimorfismos genéticos que ocorrem em eritrócitos e células do sistema imune [51, 132-133]. Alguns genes relevantes para a resposta imune e o processo de inflamação também têm sido associados à malária [6, 134-137]. Dentre eles, destacamos nesse estudo de associação genética a presença de polimorfismos nos genes das citocinas interferon gama (IFN- $\gamma$ ) [138] e interleucina 10 (IL-10) [123], e da enzima óxido nítrico sintase induzida [139] em uma população amazônica brasileira exposta à malária. Polimorfismos funcionais em genes que podem confirmar diferenças interindividuais na síntese e secreção destas proteínas têm sido associados a doenças que têm uma patogênese inflamatória como a malária.

Os nossos resultados fornecem evidências da relação entre os polimorfismos investigados e a susceptibilidade à malária. Primeiramente, foram avaliadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *IFNG+874T/A* na nossa população de área endêmica. O alelo variante A foi o mais comum na população, assim como o genótipo homozigoto AA correspondente. Essas frequências encontradas na nossa população de estudo, estão de acordo com estudos anteriores realizados em outras regiões amazônicas brasileiras [89] e colombianas [140]. No entanto, estudos realizados no Brasil em áreas não amazônicas observaram que o genótipo homozigoto AA era predominante em pacientes com tuberculose, enquanto, os indivíduos de grupo controle da mesma região tinham o genótipo heterozigoto AT predominante, demonstrando uma composição heterogênea nas diferentes regiões geográficas do Brasil, além da importante associação desse polimorfismo à tuberculose [78, 83].

Após conhecer a frequência do polimorfismo *IFNG+874T/A* na população avaliamos a possível associação do polimorfismo comparando os indivíduos com malária aos indivíduos sem malária no momento da coleta, e não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos. Visto que os indivíduos com diagnóstico negativo viviam em área endêmica e relataram infecções prévias de malária, utilizamos como parâmetro adicional o número de episódios prévios de malária, e encontramos frequências

significativamente maiores do genótipo homozigoto variante AA nos indivíduos com menor número de episódios, enquanto os indivíduos com maior número de episódios apresentaram maior frequência do genótipo homozigoto selvagem TT, sugerindo um caráter de proteção ligada ao alelo A variante. A análise da função biológica deste SNP sugere que os portadores do alelo variante são baixos produtores de IFN- $\gamma$  [74, 140]. Contudo, esse efeito protetor se mostrou controverso ao avaliarmos as concentrações de IFN- $\gamma$  e da parasitemia de acordo com a distribuição alélica e genotípica, nas quais não foi observada nenhuma diferença significativa na comparação dos genótipos e alelos na nossa população. Nossos resultados foram diferentes de Medina e colaboradores que relataram pela primeira vez numa população de área endêmica no Brasil, que a concentração de IFN- $\gamma$  no soro de pacientes foi significativamente menor em indivíduos AA em comparação com os portadores do alelo T selvagem [89].

Complementando nossos resultados, a análise dos níveis de IFN- $\gamma$  na população indicou que os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  foram significativamente maiores no grupo com diagnóstico positivo em comparação ao grupo com diagnóstico negativo. Esta observação era esperada uma vez que o IFN- $\gamma$  contribui para a polarização da resposta Th1 das células T e também está relacionado com a proteção contra a alta densidade de parasitas, como é mostrado pela associação entre níveis elevados de concentração de IFN- $\gamma$  e o controle da parasitemia em alguns estudos [141].

Ao analisarmos então o polimorfismo do gene *IL10A*, na posição -1082, associado à diminuição da produção de IL-10 [142] observamos que a frequência alélica era semelhante, porém quanto aos genótipos, a população foi predominantemente portadora do genótipo heterozigoto AG, com frequências muito baixas de indivíduos homozigotos selvagens GG. Alguns estudos que abordaram esse polimorfismo descreveram frequências maiores do alelo variante A, além de variação dessa distribuição de acordo com a etnia [89, 102, 143-145].

Nas análises de susceptibilidade, não foi possível encontrar associações significativas deste polimorfismo com os níveis de IL-10, com a ocorrência da doença, ao compararmos indivíduos com diagnóstico positivo e negativo no momento da coleta, e com a recorrência da doença, de acordo com a análise das variantes e o número de episódios anteriores de malária relatados pelos pacientes. Além disso, os grupos avaliados não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando a necessidade de uma amostra representativa para verificar uma possível relação desse polimorfismo com a malária. Esse mesmo polimorfismo já foi associado com infecção por vírus Epstein Barr [146], hepatite [146], câncer gástrico [147] e asma [145].

Ainda no gene *IL10A* analisamos mais dois polimorfismos nas posições -592 e -819 da região promotora, também associados à produção efetiva de IL-10 que tem importante papel na resposta imune no curso da infecção. Estes dois polimorfismos, são comumente investigados por apresentarem desequilíbrio de ligação, com  $D' = 0,999$  entre os polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* ( $D'$  representa a probabilidade de ocorrer o desequilíbrio de ligação). Dessa forma, obtivemos as mesmas frequências genéticas e alélicas nos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C*.

As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* demonstraram que as frequências alélicas são semelhantes e há uma frequência um pouco maior de indivíduos heterozigotos AC/TC na população total. Contudo, ao compararmos os grupos de indivíduos com malária contra os indivíduos sem malária encontramos alta prevalência do alelo C variante e do homozigoto CC/CC nos indivíduos sem malária, e maior prevalência dos alelos A/T e genótipo homozigoto AA/TT nos indivíduos com malária. Essa diferença é significativa, com valor de  $P < 0,0001$ , e indica que o alelo C tem efeito de proteção na população devido sua prevalência no grupo negativo e o valor de  $OR < 1$ . Como nos demais polimorfismos, utilizamos como parâmetro de susceptibilidade o número de infecções maláricas relatadas e não observamos nenhuma associação significativa com esse fator. Porém, as análises das concentrações da citocina IL-10 e da densidade parasitária confirmaram o efeito protetor associado ao alelo C variante. O alelo C e o genótipo homozigoto CC apresentaram baixos níveis de IL-10 comparados aos outros alelos e genótipos, concordando com a literatura que sugere que esses polimorfismos estão associados à diminuição na produção de IL-10 e que os altos níveis de IL-10 reduzem a capacidade efetiva do clearance parasitário [130], como demonstrado na baixa densidade parasitária observada nos portadores do alelo C variante baixo produtor de IL-10 e o contrário com os portadores dos alelos A/T selvagens alto produtor de IL-10 e com alta densidade parasitária.

Na análise dos haplótipos compostos pelos nucleotídeos que ocorrem nas posições -1082, -592 e -819 do *IL10A* observamos que o haplótipo mais frequente foi o haplótipo designado GCC, seguido em frequência pelo haplótipo denominado ATA. Porém, esses haplótipos não apresentaram associação significativa com a malária. Os resultados encontrados corroboram com estudos que demonstraram a formação de haplótipos comuns, ATA e GCC [148]. Mais dois haplótipos, ACC e GTA, foram encontrados em menor frequência na nossa população. Mas, apesar da menor frequência, esses haplótipos tiveram diferença significativa na comparação dos grupos com malária e sem malária, e foi possível observar um efeito de proteção ligada ao haplótipo ACC, devido a

maior frequência em indivíduos de diagnóstico negativo ( $P=0,036$ ) e  $OR < 1$ , e um caráter de risco ligado ao haplótipo GTA com maior frequência nos indivíduos positivos ( $P=0,009$ ) e  $OR > 1$ .

Um estudo de meta-análise de Zheng e colaboradores demonstrou que o haplótipo ATA está associado à susceptibilidade à asma, enquanto outro estudo de meta-análise que também investigou relação com a asma não encontrou associação com nenhum haplótipo dos polimorfismos de *IL10A* da região promotora [145]. Já Garcia e colaboradores sugeriram que o haplótipo ACC está estreitamente relacionado à proteção do desenvolvimento da hanseníase numa população brasileira, assim como os nossos resultados [149].

Na infecção malárica um estudo transversal realizado em uma população do Gâmbia em um grupo de caso-controle e intrafamiliar combinado demonstraram que o haplótipo do gene *IL10A* nas -919C/-627G/-1117C/-3585T foi fracamente associado com a proteção na malária cerebral e anemia grave [150]. Outro estudo que analisou os mesmos SNPs do *IL10A* que o nosso estudo encontrou associação do haplótipo -1082A/-819T/-592A, o haplótipo ATA, com o aumento da susceptibilidade à anemia severa e a redução significativa da produção de IL-10 [151].

Para as análises do polimorfismo do gene *NOS2A* é interessante destacar que devido à importância do NO e dos radicais de nitrogênio na morte de parasitas intracelulares, o gene responsável pela produção desses radicais tem sido cada vez mais investigado. Assim, vários SNPs têm sido descritos no gene *NOS2A* relacionando a presença destes polimorfismos com doenças infecciosas. Verificamos o polimorfismo no locus -954 e observamos que não foram detectados todos os possíveis genótipos. O genótipo homozigoto variante CC não foi encontrado e a prevalência foi de indivíduos portadores do genótipo homozigoto GG com baixa frequência de indivíduos com o genótipo heterozigoto GC. Quanto à frequência alélica verificamos alta frequência do alelo selvagem G. A frequência de *NOS2A-954G/C* pode variar entre as populações. O alelo C variante vem se mostrando ser ausente na população caucasiana, e em baixa frequência na Ásia. No entanto, ele se apresenta em alta frequência na população africana. Um estudo desenvolvido no Brasil relacionando polimorfismo do *NOS2A* com a tuberculose encontrou frequências bem altas do genótipo GG, frequências baixas do heterozigoto GC e ainda menores do homozigoto CC, frequências que se assemelham ao nosso estudo [152]. A avaliação dos indivíduos de acordo com o diagnóstico e com o número de episódios de malária não demonstrou nenhuma associação significativa do polimorfismo *NOS2A-954G/C* com a malária. O mesmo se deu para os níveis dos radicais de nitrogênio

e para a parasitemia, nos quais os genótipos e alelos do polimorfismo não demonstraram relação com esses parâmetros. Por essa razão, nossos dados sugerem que o polimorfismo *NOS2A-954G/C* não exerce influência na susceptibilidade à malária. Este polimorfismo já foi associado à doenças como diabetes [120], HIV [121], 2004) e artrite reumatóide [122], porém na malária ele apresenta resultados controversos. Ohashi et al (2002) mostrou associação com altos níveis de atividade da enzima iNOS, enquanto Kun et al (2001) encontrou associação desse polimorfismo com a proteção à malária em crianças africanas. No Brasil, Messias-Reason não encontrou nenhuma associação de variantes do gene *NOS2A* com formas clínicas da hanseníase, além disso, o mesmo estudo não detectou o polimorfismo do locus -954 na população [153]. Outro estudo caso-controle investigou o polimorfismo *NOS2A-954G/C* e também não obteve associação significativa com a tuberculose e nem com os níveis dos radicais de nitrogênio em uma população brasileira [152].

Os resultados desse estudo confirmam a importância da resposta imune, em particular das citocinas, na patogênese da malária, devido à associação que mostramos dos polimorfismos *IL10A-592A/C* e *IL10A-819T/C* e dos haplótipos com os parâmetros de avaliação da susceptibilidade à malária, a ocorrência da doença, a recorrência, o nível da citocina e a densidade parasitária. Esta importante associação sugere que possa haver um balanço de IL-10 que influencia a ocorrência da doença e o controle da parasitemia. Neste trabalho não foi possível inferir uma possível associação do polimorfismo *IL10-1082G/A* devido à representatividade da amostra. Contudo, nossos achados nos polimorfismos de *IFNG* e *NOS2A* em área endêmica brasileira são comparáveis a outras regiões endêmicas de malária, onde a distribuição das variantes e a ausência de associação com a malária também foram relatadas.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

Na infecção malárica os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e IL-10 se encontram aumentados e os dos radicais de nitrogênio estão diminuídos quando comparados aos indivíduos negativos para malária;

A história pregressa de malária não está associada aos polimorfismos nem aos níveis plasmáticos das citocinas e dos radicais de nitrogênio;

Os polimorfismos T/A no locus 874 do gene *IFNG* e G/A no locus -1082 do gene *IL10A* parecem não estar associados com a ocorrência de malária nem com a produção destas citocinas;

O polimorfismo G/C no locus 954 do gene *NOS2A* não está associado com a ocorrência de malária e nem a produção dos derivados de nitrogênio;

Nos polimorfismos A/C no locus 592 e T/C no locus 819 do gene *IL10A*, o alelo C variante está associado a um caráter protetor e os alelos selvagens A/T sugerem um caráter de risco de contrair a malária;

A associação dos polimorfismos da região promotora -1082/-592/-819 do *IL10A*, mostrou que o haplótipo ACC está associado com proteção antiparasitária à malária e o haplótipo GAT está associado ao risco de contrair a malária;

## 9. PERSPECTIVAS

- Avaliar os polimorfismos em outras regiões do gene IFNG (*IFNG*-183G/T) e de outras citocinas como TNF- $\alpha$ ;
- Verificar se estes polimorfismos interferem com a resposta imune celular específica para antígenos plasmodias através da estimulação *in vitro* das células destes voluntários com peptídeos representando epítomos de células T presentes em proteínas candidatas a compor uma vacina.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clark, I.A., et al., *Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release*. Malar J, 2006. **5**: p. 85.
2. Matos, G.I., et al., *IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 33.
3. Cabantous, S., et al., *Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria*. J Infect Dis, 2005. **192**(5): p. 854-60.
4. Giordani, L., et al., *Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes*. Clin Chem, 2003. **49**(10): p. 1664-7.
5. Carpenter, D., et al., *Genetics of susceptibility to malaria related phenotypes*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(1): p. 97-103.
6. Ouma, C., et al., *Polymorphic variability in the interleukin (IL)-1beta promoter conditions susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-1beta production*. J Infect Dis, 2008. **198**(8): p. 1219-26.
7. Dhangadamajhi, G., et al., *A new allele (eNOS4e) in the intron 4 (VNTR) of eNOS gene in malaria infected individuals of the population of Orissa (an eastern Indian state)*. Nitric Oxide, 2010. **22**(1): p. 58-9.
8. Kun, J.F., et al., *Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria*. J Infect Dis, 2001. **184**(3): p. 330-6.
9. White, N.J., *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 172-3.
10. Amino, R., et al., *Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(2): p. 88-96.
11. Yamauchi, L.M., et al., *Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1215-22.
12. Carrolo, M., et al., *Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1363-9.
13. Silvie, O., et al., *Interactions of the malaria parasite and its mammalian host*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(4): p. 352-9.
14. Hulden, L., *Activation of the hypnozoite: a part of Plasmodium vivax life cycle and survival*. Malar J, 2011. **10**: p. 90.
15. Sturm, A., et al., *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids*. Science, 2006. **313**(5791): p. 1287-90.
16. Soni, S., et al., *Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 201-11.
17. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 673-9.
18. Tuteja, R., *Malaria - an overview*. FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4670-9.
19. Muller, I.B. and J.E. Hyde, *Folate metabolism in human malaria parasites--75 years on*. Mol Biochem Parasitol, 2013. **188**(1): p. 63-77.
20. Singh, R., et al., *A comparative study of clinical profiles of vivax and falciparum malaria in children at a tertiary care centre in uttarakhand*. J Clin Diagn Res, 2013. **7**(10): p. 2234-7.
21. Adu, D., et al., *Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria*. Clin Exp Immunol, 1982. **49**(2): p. 310-6.
22. Modrek, S., et al., *The economic benefits of malaria elimination: do they include increases in tourism?* Malar J, 2012. **11**: p. 244.
23. Gil, L.H., et al., *Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia*. J Med Entomol, 2003. **40**(5): p. 636-41.
24. Barata, R.C., *[Malaria in Brazil: trends in the last ten years]*. Cad Saude Publica, 1995. **11**(1): p. 128-36.

25. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
26. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
27. Menard, D., F. Arieu, and O. Mercereau-Puijalon, [*Plasmodium falciparum* susceptibility to antimalarial drugs: global data issued from the Pasteur Institutes international network]. Med Sci (Paris), 2013. **29**(6-7): p. 647-55.
28. Zeyrek, F.Y., et al., *Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey*. Parasite Immunol, 2006. **28**(5): p. 201-7.
29. Malu, D.T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor: a downregulator of early T cell-dependent IFN-gamma responses in Plasmodium chabaudi adami (556 KA)-infected mice*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6271-9.
30. Tachado, S.D., et al., *Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4022-7.
31. Good, M.F. and D.L. Doolan, *Immune effector mechanisms in malaria*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(4): p. 412-9.
32. Plebanski, M. and A.V. Hill, *The immunology of malaria infection*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(4): p. 437-41.
33. Riley, E.M., *Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections?* Immunol Today, 1999. **20**(5): p. 228-33.
34. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
35. Kremsner, P.G., et al., *Prediction of accelerated cure in Plasmodium falciparum malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production*. Am J Trop Med Hyg, 1995. **53**(5): p. 532-8.
36. Kwiatkowski, D., *Malarial toxins and the regulation of parasite density*. Parasitol Today, 1995. **11**(6): p. 206-12.
37. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
38. Wenisch, C., et al., *Plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 1999. **179**(3): p. 747-50.
39. Torre, D., et al., *Serum levels of interleukin-18 in patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(2): p. 361-4.
40. Torre, D., et al., *Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(2): p. 348-51.
41. Puren, A.J., et al., *Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures*. J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1830-4.
42. Day, N.P., et al., *The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1288-97.
43. Perkins, D.J., J.B. Weinberg, and P.G. Kremsner, *Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 988-92.
44. Dodoo, D., et al., *Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 2002. **185**(7): p. 971-9.

45. Artavanis-Tsakonas, K. and E.M. Riley, *Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2956-63.
46. Omer, F.M., et al., *Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1817-27.
47. Walther, M., et al., *Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 287-96.
48. Chaiyaroj, S.C., et al., *Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria*. Acta Trop, 2004. **89**(3): p. 319-27.
49. Othoro, C., et al., *A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya*. J Infect Dis, 1999. **179**(1): p. 279-82.
50. Yuthavong, Y. and P. Wilairat, *Protection against malaria by thalassaemia and haemoglobin variants*. Parasitol Today, 1993. **9**(7): p. 241-5.
51. Bunn, H.F., *The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria*. Blood, 2013. **121**(1): p. 20-5.
52. Hill, A.V., et al., *Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 595-600.
53. Min-Oo, G. and P. Gros, *Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect*. Cell Microbiol, 2005. **7**(6): p. 753-63.
54. Williams, T.N., *Red blood cell defects and malaria*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **149**(2): p. 121-7.
55. Williams, T.N., *Human red blood cell polymorphisms and malaria*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 388-94.
56. Zanella, A., et al., *Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association*. Blood Rev, 2007. **21**(4): p. 217-31.
57. Hendriksen, I.C., et al., *Evaluation of a PfHRP2 and a pLDH-based rapid diagnostic test for the diagnosis of severe malaria in 2 populations of African children*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(9): p. 1100-7.
58. Henao, M.I., et al., *Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2006. **86**(1): p. 11-9.
59. Gentile, D.A., et al., *Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with respiratory syncytial virus infection*. Hum Immunol, 2003. **64**(3): p. 338-44.
60. Chau, K.Y., et al., *IFN-gamma gene expression is controlled by the architectural transcription factor HMGA1*. Int Immunol, 2005. **17**(3): p. 297-306.
61. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
62. John, C.C., et al., *Lymphocyte proliferation and antibody responses to Plasmodium falciparum liver-stage antigen-1 in a highland area of Kenya with seasonal variation in malaria transmission*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(4): p. 372-8.
63. Brustoski, K., et al., *IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1738-45.
64. Trent, J.M., S. Olson, and R.M. Lawn, *Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7809-13.
65. Gray, P.W., et al., *Expression of human immune interferon cDNA in E. coli and monkey cells*. Nature, 1982. **295**(5849): p. 503-8.

66. Brown, D.A., et al., *The human interferon-gamma gene contains an inducible promoter that can be transactivated by tax I and II*. Eur J Immunol, 1991. **21**(8): p. 1879-85.
67. Ye, J., et al., *Characterization of a silencer regulatory element in the human interferon-gamma promoter*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25728-34.
68. Penix, L., et al., *Two essential regulatory elements in the human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1483-96.
69. Young, M.R., et al., *Increasing infiltration and activation of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes after eliminating immune suppressive granulocyte/macrophage progenitor cells with low doses of interferon gamma plus tumor necrosis factor alpha*. Cancer Immunol Immunother, 1994. **38**(1): p. 9-15.
70. Melvin, A.J., et al., *Hypomethylation of the interferon-gamma gene correlates with its expression by primary T-lineage cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 426-30.
71. Young, H.A. and K.J. Hardy, *Role of interferon-gamma in immune cell regulation*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(4): p. 373-81.
72. Bream, J.H., et al., *Polymorphisms of the human IFNG gene noncoding regions*. Immunogenetics, 2000. **51**(1): p. 50-8.
73. Rossouw, M., et al., *Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene*. Lancet, 2003. **361**(9372): p. 1871-2.
74. Pravica, V., et al., *A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production*. Hum Immunol, 2000. **61**(9): p. 863-6.
75. Perrey, C., et al., *ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms*. Transpl Immunol, 1999. **7**(2): p. 127-8.
76. Pravica, V., I.J. Brogan, and I.V. Hutchinson, *Rare polymorphisms in the promoter regions of the human interleukin-12 p35 and interleukin-12 p40 subunit genes*. Eur J Immunogenet, 2000. **27**(1): p. 35-6.
77. Chong, W.P., et al., *The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome*. BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 82.
78. Pacheco, A.G., C.C. Cardoso, and M.O. Moraes, *IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study*. Hum Genet, 2008. **123**(5): p. 477-84.
79. Amim, L.H., et al., *Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects*. Mol Biol Rep, 2008. **35**(4): p. 563-6.
80. Torres, O.A., et al., *Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population*. Infect Genet Evol, 2010. **10**(5): p. 682-5.
81. Cheong, J.Y., et al., *Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection*. Biochem Genet, 2006. **44**(5-6): p. 246-55.
82. Gangwar, R., S. Pandey, and R.D. Mittal, *Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population*. BJOG, 2009. **116**(12): p. 1671-7.
83. Vallinoto, A.C., et al., *IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis*. Hum Immunol, 2010. **71**(7): p. 692-6.
84. Albuquerque, M.C., et al., *The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(3): p. 451-5.
85. Bendicho, M.T., et al., *Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis*. Pancreas, 2005. **30**(4): p. 333-6.
86. Moran, L.B., D.C. Duke, and M.B. Graeber, *The microglial gene regulatory network activated by interferon-gamma*. J Neuroimmunol, 2007. **183**(1-2): p. 1-6.

87. Pereira, F.A., et al., *Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection*. J Med Virol, 2008. **80**(1): p. 58-64.
88. Tangwattanachuleeporn, M., et al., *Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(11): p. 1921-4.
89. Medina, T.S., et al., *Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in Plasmodium vivax malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism*. Malar J, 2011. **10**: p. 264.
90. Cabantous, S., et al., *Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria*. Journal of Infectious Diseases, 2005. **192**(5): p. 854-860.
91. Prakash, S., W.E. Paul, and P.W. Robbins, *Fibrosin, a novel fibrogenic cytokine, modulates expression of myofibroblasts*. Exp Mol Pathol, 2007. **82**(1): p. 42-8.
92. Lazarus, R., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups*. Genomics, 2002. **80**(2): p. 223-8.
93. Nussenblatt, V., et al., *Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(6): p. 1164-70.
94. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
95. Sanni, L.A., et al., *Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 3054-8.
96. Malaguarnera, L., et al., *Increased levels of interleukin-12 in Plasmodium falciparum malaria: correlation with the severity of disease*. Parasite Immunol, 2002. **24**(7): p. 387-9.
97. Li Jeon, N., et al., *Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(8): p. 826-30.
98. Kingo, K., et al., *Influence of genetic polymorphisms on interleukin-10 mRNA expression and psoriasis susceptibility*. J Dermatol Sci, 2005. **37**(2): p. 111-3.
99. Cox, E.D., et al., *Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6*. Transplantation, 2001. **72**(4): p. 720-6.
100. Koss, K., et al., *Interleukin-10 gene promoter polymorphism in English and Polish healthy controls. Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in forward and reverse primers*. Genes Immun, 2000. **1**(5): p. 321-4.
101. Cordeiro, C.A., et al., *Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(5): p. 1979-82.
102. Salhi, A., et al., *Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6139-48.
103. Moorthy, V.S., M.F. Good, and A.V. Hill, *Malaria vaccine developments*. Lancet, 2004. **363**(9403): p. 150-6.
104. Richards, A.K., et al., *Cross-border malaria control for internally displaced persons: observational results from a pilot programme in eastern Burma/Myanmar*. Trop Med Int Health, 2009. **14**(5): p. 512-21.
105. Qidwai, T. and F. Jamal, *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence*. Scand J Immunol, 2010. **72**(5): p. 375-87.
106. Augustine, M.S. and L.K. Rogers, *Measurement of arginine metabolites: regulators of nitric oxide metabolism*. Curr Protoc Toxicol, 2013. **58**: p. 17 16 1-9.
107. Strobl, M., et al., *Exhaled nitric oxide measurement to monitor pulmonary hypertension in a pneumonectomy-monocrotaline rat model*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(7): p. L485-90.
108. Snyder, S.H., *Nitric oxide and neurons*. Curr Opin Neurobiol, 1992. **2**(3): p. 323-7.
109. Fang, F.C., *Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity*. J Clin Invest, 1997. **99**(12): p. 2818-25.

110. Ostera, G., et al., *Plasmodium falciparum*: food vacuole localization of nitric oxide-derived species in intraerythrocytic stages of the malaria parasite. *Exp Parasitol*, 2008. **120**(1): p. 29-38.
111. Sobolewski, P., et al., *Nitric oxide bioavailability in malaria*. *Trends Parasitol*, 2005. **21**(9): p. 415-22.
112. Wang, R., J.D. Smith, and S.H. Kappe, *Advances and challenges in malaria vaccine development*. *Expert Rev Mol Med*, 2009. **11**: p. e39.
113. Duranton, C., et al., *A high specificity and affinity interaction with serum albumin stimulates an anion conductance in malaria-infected erythrocytes*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. **22**(5-6): p. 395-404.
114. Safeukui, I., et al., *Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen*. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2520-8.
115. Yeo, T.W., et al., *Pharmacokinetics of L-arginine in adults with moderately severe malaria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(12): p. 4381-7.
116. Cramer, J.P., et al., *Age-dependent effect of plasma nitric oxide on parasite density in Ghanaian children with severe malaria*. *Trop Med Int Health*, 2005. **10**(7): p. 672-80.
117. Dascombe, M.J. and H. Nahrevanian, *Pharmacological assessment of the role of nitric oxide in mice infected with lethal and nonlethal species of malaria*. *Parasite Immunol*, 2003. **25**(3): p. 149-59.
118. Xu, R. and D.A. Cuebas, *The reactions catalyzed by the inducible bifunctional enzyme of rat liver peroxisomes cannot lead to the formation of bile acids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(2): p. 271-8.
119. Savinkova, L., et al., *An experimental verification of the predicted effects of promoter TATA-box polymorphisms associated with human diseases on interactions between the TATA boxes and TATA-binding protein*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e54626.
120. Warpeha, K.M., et al., *Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy*. *FASEB J*, 1999. **13**(13): p. 1825-32.
121. Hersberger, M., et al., *CCTTT-repeat polymorphism of the inducible nitric oxide synthase is not associated with HIV pathogenesis*. *Clin Exp Immunol*, 2004. **137**(3): p. 566-9.
122. Varade, J., et al., *NO role of NOS2A susceptibility polymorphisms in rheumatoid arthritis*. *Nitric Oxide*, 2009. **21**(3-4): p. 171-4.
123. Ohashi, J., et al., *Significant association of longer forms of CCTTT Microsatellite repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter with severe malaria in Thailand*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(4): p. 578-81.
124. Burgner, D. and M. Levin, *Genetic susceptibility to infectious diseases*. *Pediatr Infect Dis J*, 2003. **22**(1): p. 1-6.
125. Rodriguez-Morales, A.J., et al., *Imported cases of malaria admitted to two hospitals of Margarita Island, Venezuela, 1998-2005*. *Travel Med Infect Dis*, 2009. **7**(1): p. 44-8.
126. Genton, B., et al., *Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea*. *PLoS Med*, 2008. **5**(6): p. e127.
127. Malaguarnera, L. and S. Musumeci, *The immune response to Plasmodium falciparum malaria*. *Lancet Infect Dis*, 2002. **2**(8): p. 472-8.
128. Kossodo, S., et al., *Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria*. *Immunology*, 1997. **91**(4): p. 536-40.
129. Kurtzhals, J.A., et al., *Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria*. *Lancet*, 1998. **351**(9118): p. 1768-72.
130. Hugosson, E., et al., *Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of Plasmodium falciparum parasites*. *Parasite Immunol*, 2004. **26**(3): p. 111-7.
131. Newton, C.R., et al., *Analysis of Any Point Mutation in DNA - the Amplification Refractory Mutation System (Arms)*. *Nucleic Acids Research*, 1989. **17**(7): p. 2503-2516.

132. Manjurano, A., et al., *Association of sub-microscopic malaria parasite carriage with transmission intensity in north-eastern Tanzania*. *Malar J*, 2011. **10**: p. 370.
133. Zimmerman, R.H., et al., *Nightly biting cycles of malaria vectors in a heterogeneous transmission area of eastern Amazonian Brazil*. *Malar J*, 2013. **12**: p. 262.
134. Lokossou, A.G., et al., *Association of IL-4 and IL-10 maternal haplotypes with immune responses to P. falciparum in mothers and newborns*. *BMC Infect Dis*, 2013. **13**: p. 215.
135. Planche, T., et al., *Nitric oxide generation in children with malaria and the NOS2G-954C promoter polymorphism*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010. **299**(5): p. R1248-53.
136. Sortica, V.A., et al., *IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with Plasmodium vivax malaria in Brazil*. *Malar J*, 2012. **11**: p. 409.
137. Apinjoh, T.O., et al., *Association of cytokine and toll-like receptor gene polymorphisms with severe malaria in three regions of cameroon*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81071.
138. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 169-80.
139. Clark, I.A., et al., *Does malarial tolerance, through nitric oxide, explain the low incidence of autoimmune disease in tropical Africa?* *Lancet*, 1996. **348**(9040): p. 1492-4.
140. Lopez-Maderuelo, D., et al., *Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(7): p. 970-5.
141. Akinosoglou, K.S., E.E. Solomou, and C.A. Gogos, *Malaria: a haematological disease*. *Hematology*, 2012. **17**(2): p. 106-14.
142. Turner, D.M., et al., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter*. *Eur J Immunogenet*, 1997. **24**(1): p. 1-8.
143. Chatterjee, A., et al., *Genetic association of IL-10 gene promoter polymorphism and HIV-1 infection in North Indians*. *J Clin Immunol*, 2009. **29**(1): p. 71-7.
144. Pan, X.F., et al., *Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and risk of gastric cancer in a Chinese population: single nucleotide and haplotype analyses*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **14**(4): p. 2577-82.
145. Zheng, X.Y., et al., *Interleukin-10 Promoter 1082/-819/-592 Polymorphisms are Associated with Asthma Susceptibility in Asians and Atopic Asthma: A Meta-Analysis*. *Lung*, 2014. **192**(1): p. 65-73.
146. da Silva, G.N., et al., *Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma*. *Arch Pathol Lab Med*, 2007. **131**(11): p. 1691-6.
147. Pan, X.F., et al., *Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphisms and Risk of Gastric Cancer in a Chinese Population: Single Nucleotide and Haplotype Analyses*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013. **14**(4): p. 2577-2582.
148. Lowe, P.R., et al., *Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients*. *Crit Care Med*, 2003. **31**(1): p. 34-8.
149. Garcia, P., et al., *Haplotypes of the IL10 gene as potential protection factors in leprosy patients*. *Clin Vaccine Immunol*, 2013. **20**(10): p. 1599-603.
150. Wilson, J.N., et al., *Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria*. *Genes Immun*, 2005. **6**(6): p. 462-6.
151. Ouma, C., et al., *Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production*. *Hum Genet*, 2008. **124**(5): p. 515-24.
152. Leandro, A.C., et al., *No association of IFNG+874T/A SNP and NOS2A-954G/C SNP variants with nitric oxide radical serum levels or susceptibility to tuberculosis in a Brazilian population subset*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 901740.
153. Messias-Reason, I.J., H. van Tong, and T.P. Velavan, *Analysis of polymorphic sites in the promoter of the nitric oxide synthase 2 gene in Brazilian patients with leprosy*. *Int J Immunogenet*, 2014.



## 11. ANEXOS

### 11.1. Comitê de Ética



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

Rio de Janeiro, 26 de março de 2009.

Carta: 024/09

De: CEP/FIOCRUZ

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

Prezados Senhores,

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

Atenciosamente

Carla Dias Netto  
Secretária Geral  
CEP/Fiocruz

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

## 11.2. Termo de Consentimento

### Anexo 2

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

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

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

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

**Nome do Voluntário:** \_\_\_\_\_

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

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

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

### **Pelo responsável fui informado de que:**

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

A minha participação no projeto consiste em autorizar a realização de exames para avaliar se tenho estas doenças e que esse material seja utilizado neste estudo. Também autorizo que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como objetivo a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos de diagnóstico; avaliação da resposta a antígenos candidatos a uma vacina etc. desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa. É importante saber das seguintes informações:

### **A- O problema de saúde objeto da investigação:**

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

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

## **B- Objetivo do trabalho dos pesquisadores:**

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

## **C- Exames, procedimentos e tratamento que serão utilizados:**

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença através de uma entrevista detalhada e preenchimento de um questionário por um membro da equipe, exame médico e coleta de sangue para realização de vários exames (distensão e gota espessa para diagnóstico, hemograma completo, testes imunológicos, tipagem de células e produtos secretados por elas, entre outros). Para isto será necessária a coleta 30mL de sangue por via endovenosa em duas ocasiões: no dia do diagnóstico antes do tratamento (D0), podendo ser solicitada para uma coleta em outra ocasião para verificação de cura. Se a médica suspeitar que eu tenho Leishmaniose farão um teste na pele (injeção de 0,1 mL em um dos braços), chamado teste de Montenegro (para leishmaniose) para auxiliar no diagnóstico dessa doença. Além disso, se eu tiver alguma ferida no corpo que seja suspeita de leishmaniose, será feita uma biópsia (com anestesia) com retirada de um pedaço (não maior eu 6mm de diâmetro) da ferida, que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasita e fazendo histopatologia, e para o estudo científico. No caso de suspeita de tuberculose eu terei de colher uma amostra de escarro para diagnóstico de tuberculose em pote limpo e levar um pote limpo para casa para colher uma amostra de escarro na manhã do dia seguinte ao despertar. Para verificar se eu tenho alguma verminose vou ter que colher uma amostra de fezes em um pote limpo (chamada amostra fresca) e uma amostra de fezes num pote contendo um líquido vermelho (chamada fezes conservadas). Fui informado que o líquido vermelho (MIF) não é para ser tomado, e sim para colocar as fezes nele dentro do pote (as fezes servem para fazer o diagnóstico das parasitoses intestinais). Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para confirmar que estou com um dos parasitas que provocam as doenças que vão ser estudadas. Eu posso fazer todos os

exames ou apenas alguns, mas como cada um deles serve para doenças diferentes poderei não ser diagnosticado para algumas deles se não fizer todos os exames.

#### **D- Benefícios:**

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

#### **E- Inconvenientes:**

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

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

#### **F- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:**

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

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

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

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

**Nome do voluntário**

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

**Nome do Pesquisador**

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

**Testemunha 1<sub>1</sub>**

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

**Testemunha 2<sub>2</sub>**

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

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

### 11.3. Questionário

#### Anexo 3

#### Questionário Epidemiológico

<b>REGISTRO Nº</b>	<b>Data:</b>
--------------------	--------------

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

#### DADOS PESSOAIS

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

*TEMPO DE RESIDÊNCIA (ANOS):*

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

*Endereço atual:*

<b>LOCAL DE MORADIAS ANTERIORES DENTRO E FORA DE RONDONIA:</b>
--

#### HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

<b>NÚMERO DE INFECÇÕES ANTERIORES DE MALÁRIA:</b>
Espécies: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Não lembra
<b>NÚMERO DE INFECÇÕES ESSE ANO (2010):</b>
Espécies: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Não lembra
<b>DATA DA ÚLTIMA INFECÇÃO:</b>
Espécies: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Não lembra
<b>LOCAL PROVAVEL DE INFECÇÃO:</b>

<b>FEZ O TRATAMENTO COMPLETO?:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
<b>JA FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Data:	
<b>MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Data:	
<b>OBS:</b>			

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

### EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

<b>LOCALIZAÇÃO DA CASA</b>			
<input type="checkbox"/> Cidade	<input type="checkbox"/> Periferia	<input type="checkbox"/> Floresta	<input type="checkbox"/> Coleção d'água <input type="checkbox"/> Nenhuma
<i>TIPO DE CASA (PROTEÇÃO EM RELAÇÃO AO CONTATO COM MOSQUITO)</i>			
<input type="checkbox"/> Boa	<input type="checkbox"/> Parcial	<input type="checkbox"/> Nenhuma	
<b>ATIVIDADES AO AMANHECER:</b>			
<b>ATIVIDADES AO ANOITECER:</b>			
<b>SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA?</b>			
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Foi informado	<input type="checkbox"/> Foi informado, mas não acredita
<b>COMO?:</b>			
<b>USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS</b>			
<input type="checkbox"/> Mosquiteiro	<input type="checkbox"/> Inseticida	<input type="checkbox"/> antimaláricos	<input type="checkbox"/> Outras <input type="checkbox"/> Nenhuma
Data da última borrifação de inseticida (FNS):			

### INFECÇÃO ATUAL

#### SINTOMAS

<input type="checkbox"/> Febre, _____°C
<input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Calafrios <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Nenhum
<b>DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:</b>
<i>DIAGNÓSTICO:</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> <i>Nenhuma</i>
<b>PARASITEMIA:</b>
<b>LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO:</b>
<b>RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE?:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data:
<b>É DOADOR DE SANGUE?:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data da última doação:



HISTÓRIA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

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

#### **11.4. Artigo**

## Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection

Josué da Costa Lima-Junior<sup>1,2</sup>, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>1</sup>, Virgínia Araújo Pereira<sup>1</sup>, Fábio Luiz Storer<sup>3</sup>, Daiana de Souza Perce-da-Silva<sup>4</sup>, Daniela Leite Fabrino<sup>5</sup>, Fátima Santos<sup>6</sup>, Dalma Maria Banic<sup>5</sup>, Joseli de Oliveira-Ferreira<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunoparasitologia <sup>2</sup>Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz

<sup>3</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO, Brasil <sup>5</sup>Laboratório de Biotecnologia, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João Del Rei, Ouro Branco, MG, Brasil

<sup>6</sup>Departamento de Entomologia, Laboratório Central, Porto Velho, RO, Brasil

*The haematological changes and release of soluble mediators, particularly C-reactive protein (CRP) and nitric oxide (NO), during uncomplicated malaria have not been well studied, especially in Brazilian areas in which the disease is endemic. Therefore, the present study examined these factors in acute (day 0) and convalescent phase (day 15) patients infected with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon. Haematologic parameters were measured using automated cell counting, CRP levels were measured with ELISA and NO plasma levels were measured by the Griess reaction. Our data indicate that individuals with uncomplicated P. vivax and P. falciparum infection presented similar inflammatory profiles with respect to white blood cells, with high band cell production and a considerable degree of thrombocytopenia during the acute phase of infection. Higher CRP levels were detected in acute P. vivax infection than in acute P. falciparum infection, while higher NO was detected in patients with acute and convalescent P. falciparum infections. Although changes in these mediators cannot predict malaria infection, the haematological aspects associated with malaria infection, especially the roles of platelets and band cells, need to be investigated further.*

Key words: malaria - C-reactive protein - nitric oxide - band neutrophils

Haematologic changes, such as anaemia, thrombocytopenia and leucocytosis or leucopenia, are well recognised to be associated with malaria infection. The extent of these alterations varies with the level of malaria endemicity, patient genetic background (e.g., presence of haemoglobinopathies), nutritional status, demographic factors and malaria immunity (Price et al. 2001, Erhart et al. 2004). Changes in the total white cell (WC) and platelet (PLT) counts have been documented in several clinical vivax and falciparum malaria cases in immune and naïve patients of all ages (Martelo et al. 1969, Winters & Murray 1992, Ladhani et al. 2002, Taylor et al. 2008) and the disease is often associated with mild or moderate thrombocytopenia in adults and children from malaria-endemic areas. Profound thrombocytopenia is unusual and rarely associated with haemorrhagic manifestations (Casals-Pascual et al. 2006). In most clinical studies, thrombocytopenia is not associated with disease severity or mortality, but the combination of a low PLT count

and high density of polymorphonuclear cells indicates a strong inflammatory profile. In this inflammatory milieu, neutrophils are one of the key players in the innate immune system and represent the first line of defence against invading microorganisms, mainly because they are the most numerous blood leucocyte cells (50-75%) and the most effective circulatory phagocytes. Neutrophils are generated in the bone marrow from myeloid human precursors cells by a highly coordinated differentiation process, which is characterised by significant morphological changes and the up-regulation of signalling pathways and receptors for inflammatory mediators (Mora-Jensen et al. 2011). Consequently, the neutrophil precursor count is also an important indicator of inflammation (Zhu et al. 2010, Corti et al. 2012) and variations in this parameter are routinely measured in the laboratory in malaria endemic areas as a sensitive, but non-specific indicator of infection with malaria parasites (Maina et al. 2010, Habeeb et al. 2012).

In addition to cytokines and chemokines, other un-specific mediators of inflammation are also biomarkers in malaria infection. Several soluble mediators released during malaria infection, particularly C-reactive protein (CRP) and nitric oxide (NO), were identified as important inflammatory biomarkers (McGuire et al. 1996, Armah et al. 2007, Conroy et al. 2011). In fact, NO and CRP levels have proven to be valuable in assessing the severity of malaria and as prognostic tools in the follow-up re-

Financial support: DCIT/CNPq, CAPES  
+ Corresponding author: lila@ioc.fiocruz.br  
Received 30 July 2012  
Accepted 14 September 2012

sponse to treatments (Gillespie et al. 1991, Nahrevanian et al. 2008). CRP is believed to play an important role as an early defence system against infection in the body; during acute inflammation, CRP levels increase to as much as 50,000 times above normal, typically within 6 h and peak at 48 h. The CRP level is an accurate indicator of inflammation and the only known factor to interfere with CRP production is liver failure. CRP is well characterised as a serum acute phase protein and has been shown to be involved in multiple immunoregulatory functions. For example, CRP activates the classical complement cascade, opsonises bacteria for phagocytosis and stimulates phagocytic cells (Dong & Wright 1996). Although CRP is predominantly produced and secreted by hepatocytes, other cells, including subsets of lymphocytes, Kupffer cells and blood monocytes, have also been shown to synthesise this protein (Dong & Wright 1996). The first identification of a role for CRP in defence against infection in humans was related to its capacity to bind to phosphorylcholine in membranes of microorganisms (Gotschlich & Edelman 1967). In malaria, CRP secretion is induced by proinflammatory cytokines that are secreted by host mononuclear cells (Harpaz et al. 1992) and strong correlations have been found between CRP levels and parasitaemias. Meanwhile, NO, which is highly toxic to intra-erythrocytic malaria parasites, seems to be associated with the severity of *Plasmodium falciparum* malaria. Indeed, the high NO production by neutrophils has been correlated with fast parasite clearance in *P. falciparum* malaria (Greve et al. 1999), suggesting that the release of nonspecific inflammatory markers might be more important for immune protection from malaria than is generally appreciated.

Although the basic haematologic changes in nonspecific markers of infection and inflammation associated with malaria infections are not recent findings, their contributions during acute uncomplicated malaria and after treatment remain unclear. Furthermore, the diagnostic value of these haematological parameters has not been well established in Brazilian endemic areas, in which more than 80% of malaria cases are caused by *Plasmodium vivax* (Oliveira-Ferreira et al. 2010). Therefore, the present study examined the changes in blood PLTs, neutrophils, CRP and NO in adults from the Brazilian Amazon with uncomplicated *P. falciparum* and *P. vivax* malaria who were followed up during the acute and convalescent phases of infection.

#### SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

**Study population** - The studied population included rainforest natives and migrants from several non-endemic areas of Brazil who resided in the region. Samples and survey data were collected during the dry months of June-August in 2007, coinciding with the period of increased malaria transmission in the state of Rondônia. The individuals who sought malaria diagnosis at the Polyclinic Ana Adelaide outpatient clinic in Porto Velho and tested positive by thick blood smear were formally invited to participate in our study. A total of 71 symptomatic malaria patients were enrolled and blood samples were collected on the day of diagnosis before

treatment (acute phase) and 15 days later (convalescent phase). Of the 71 initially enrolled patients, 55 returned for the 15-day follow-up. The patients were grouped by plasmodial species: *P. vivax* (n = 47) and *P. falciparum* (n = 24). Written informed consent was obtained from all adult donors or from the parents of underage donors. The study was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil.

**Clinical and epidemiological survey** - To evaluate the epidemiological factors that may influence the variations in the inflammatory markers studied and the symptoms, all donors were interviewed after providing informed consent. The survey included questions related to demographics, time of residence in the endemic area, personal and family histories of malaria, use of malaria prophylaxis, presence of malaria symptoms and personal knowledge of malaria. The survey data were entered into a database created with Epi Info 2007 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).

**Collection of human blood samples and malaria diagnosis** - Venous peripheral blood (10 mL) was collected into ethylenediamine tetraacetic acid tubes. Thin and thick blood smears from all donors were examined for malaria parasites at 1,000X magnification under oil immersion; all slides were examined by two researchers with expertise in malaria diagnosis. Donors who were positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* were subsequently treated with the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health. To confirm the parasitological diagnosis (day 0) and parasite clearance (day 15), we performed molecular analyses of all samples using primers specific for genus (*Plasmodium* sp.) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*). The amplification protocols were described previously (Snounou et al. 1993).

**PLT and neutrophil counts** - Complete blood counts were performed using an automatic haematology analyser (ABX Pentra) and peripheral smears of blood samples were made for routine differential blood cellular quantification. A manual differential WC count was also performed to distinguish the immature neutrophils. Neutropenia was defined as a neutrophil count  $< 1.20 \times 10^9/L$  and thrombocytopenia was defined as a PLT count  $< 150 \times 10^9/L$ .

**CRP levels** - The CRP levels were determined in all plasma samples using an in-house ELISA. Microtitre plates (Nunc/MaxiSorp, Rochester, NY, USA) were coated with a goat anti-human-CRP antibody (Sigma, USA; catalogue C8284) in carbonate-bicarbonate buffer (TCO<sub>4</sub>) overnight at 4°C. The plates were then washed three times with phosphate-buffered saline-0.05% Tween 20 (PBST) and plasma samples diluted 1:500 in PBST were incubated with the plates for 1 h at 37°C. The plates were then washed three times and incubated with rabbit anti-human-CRP antibody (Sigma, USA; catalogue C3527) in PBST for 1 h at 37°C. The plates were washed three times and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit-IgG antibodies (Sigma, USA; A0545) were added.

The wells were thoroughly washed to remove all unbound horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies and an o-phenyldiamine substrate solution was added to each well. The enzyme (HRP) and substrate were allowed to react for a short incubation period. The enzyme-substrate reaction was terminated by the addition of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the degree of colour change was measured at 492 nm ± 2 nm in a spectrophotometer (SpectraMax 250; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The plasma concentration of CRP was determined by comparison to standard concentrations of purified human CRP (Sigma, St. Louis, USA). The range of detection of CRP was 0.01-320 µg/mL. Sera from non-infected individuals were used on every plate as negative controls. Specific CRP optical density values were converted to concentration values (µg/mL) using sigmoidal curve-fit equations derived from CRP standard curves.

**Griess microassay detection of NO** - A modified Griess reaction was used to detect NO (Rockett et al. 1994, modified by Nahrevanian & Dascombe 2001). The NO levels in samples were indirectly measured after first converting nitrates to nitrites with a nitrate reductase treatment (*Aspergillus* species NAD[P]H, Sigma, UK) and NADPH β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). Griess reagent [5% phosphoric acid, 1% sulphanilic acid and 0.1% N-(1-naphthyl-1)-ethyldiamine dihydrochloride, all from Sigma, UK, dissolved in 100 mL deionised water] was added and proteins were subsequently precipitated by trichloroacetic acid (BDH, England). The tube contents were mixed and centrifuged (Eppendorf centrifuge 5415 C, Germany); two samples of each supernatant were transferred to a flat-bottomed microplate and their absorbencies were read at 520 nm using a microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Inc). NO values were calculated from standard calibration plots (Nahrevanian & Dascombe 2001).

## RESULTS

**Epidemiological and clinical characteristics of the studied population** - The mean age, length of time living in the endemic area, number of previous malaria infections and parasite density were similar between the *P. vivax* and *P. falciparum* malaria patient groups (Table). There were no significant differences in the general features of malaria exposure in the patient groups and malaria-endemic control group (group C), except for the number of months since the last malaria episode ( $p < 0.0001$ ). All patients in the acute phase of infection (day 0) presented symptomatic noncomplicated malaria. Fever and headache were the most frequent symptoms reported by patients infected with either parasite, indicating that the plasmodial species did not show differences in the clinical manifestation of disease ( $p > 0.05$  for all reported symptoms). Among the patients who returned at day 15, 87.5% had been diagnosed with *P. vivax* at day 0 and 62% had been diagnosed with *P. falciparum*. At day 15, no patients presented with symptoms and no parasites were detected by microscopic examination or polymerase chain reaction.

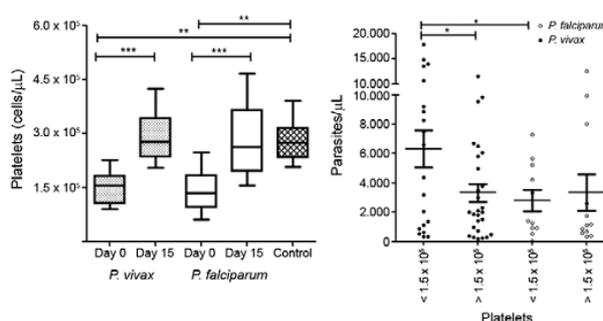


Fig. 1A: platelets concentration in plasma of studied individuals during acute and convalescent phase of malaria infection (box represent the interquartile range and whiskers represents the 95 percentiles); B: scatter dot plot of parasitaemia in infected individuals with and without thrombocytopenia.

**PLTs** - The PLT counts were significantly lower in the acute phase of malaria infection than in the convalescent phase [day 0 vs. day 15;  $t = 10.74$ , degrees of freedom = 54,  $p < 0.001$ ] or in the control group ( $p < 0.0001$ ). Indeed, thrombocytopenia (less than 150,000 PLTs/mm<sup>3</sup>) was observed in 44% of studied individuals in the acute phase, regardless of *Plasmodium* species (47% for *P. falciparum* and 42.6% for *P. vivax*). After treatment, the mean PLT levels returned to normal (292,208/mm<sup>3</sup>), with levels similar to that of the control group (Fig. 1). The PLT number did not correlate with any epidemiological or clinical parameter evaluated in our survey; however, the mean parasitaemia of individuals who presented thrombocytopenia (5,077 parasites/mL) was significantly higher than in individuals without thrombocytopenia (3,331 parasites/mL;  $t = 2.271$ ,  $p = 0.0422$ ). Interestingly, this phenomenon was observed only in *P. vivax*-infected individuals (6,328 vs. 3,326 parasites/mL;  $t = 2.297$ ,  $p = 0.0263$ ) and not in *P. falciparum*-infected individuals (2802 vs. 3343;  $t = 0.3659$ ,  $p = 0.8171$ ).

**Neutrophil and band cell variations in the acute and convalescent phases of malaria** - The mean neutrophil count in the control group ( $3.825 \pm 1.081$ ) was similar to the acute ( $3.503 \pm 1.515$ ;  $p = 0.3350$ ) and convalescent phases ( $3.035 \pm 1.433$ ;  $p = 0.3111$ ). The absolute number of neutrophils was not correlated with any epidemiological factor, but it was inversely correlated with parasitaemia in both *P. falciparum* and *P. vivax*-infected individuals ( $r = -0.284$ ,  $p = 0.017$ , respectively). Interestingly, 71% of the studied individuals presented high numbers of band cells (immature neutrophils). Indeed, the absolute number of band neutrophils was markedly high in the acute phases of the *P. vivax* ( $207.2 \pm 326.4/\mu\text{L}$ ) and *P. falciparum* ( $284.1 \pm 390.0/\mu\text{L}$ ) groups; in the convalescent phase, the band cell number returned to a level similar to that of the control group ( $12.1 \pm 28.0/\mu\text{L}$ ) (Fig. 2B). The number of band cells was not correlated with parasitaemia in the acute phase. However, band cell number was inversely correlated with the number of previous malaria infections ( $r = -0.258$ ;  $p = 0.0310$ ) and directly correlated with the number of months since the last malaria infection ( $r = 0.265$ ;  $p = 0.039$ ).

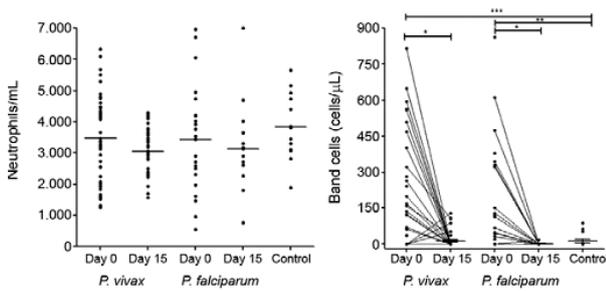


Fig. 2A: neutrophil count of studied individuals during acute and convalescent phase of malaria infection; B: variations in band neutrophil count during acute phase of malaria infection (day 0) and convalescent phase (day 15) indicate a significantly higher band neutrophil count in acute phase of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection.

**CRP** - During the acute phase, an increased concentration of CRP was observed in 87% of studied individuals compared to the control group (cut-off = mean + 3 standard deviation). The overall mean concentration during the acute phase of infection (day 0) was 27-times higher ( $27.82 \pm 30.94 \mu\text{g/mL}$ ) than that in the control group ( $2.2 \pm 4.49 \mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.0001$ ), whereas in the convalescent phase (day 15), the CRP concentration dropped to basal levels ( $3.0 \pm 2.53 \mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0.0001$ ) comparable to those of the control group ( $p = 0.826$ ) (Fig. 3A). Interestingly, acute phase CRP levels were also higher in *P. vivax* patients (mean  $\pm$  standard error of the means;  $30.56 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$ ) than in *P. falciparum* patients ( $18.2 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$ ;  $p = 0.0273$ ). However, CRP levels were not correlated with any of the clinical or epidemiological factors considered in our analysis.

**NO** - The overall median levels of plasma nitrite in the acute phase were significantly higher in *P. falciparum*-infected individuals ( $7.01 \pm 5.90 \mu\text{M}$ ) than in *P. vivax*-infected individuals ( $3.1 \pm 2.4 \mu\text{M}$ ;  $p = 0.0014$ ) or the control group ( $2.99 \pm 2.60 \mu\text{M}$ ;  $p = 0.0292$ ). No differences in the nitrite levels of all groups were observed between the convalescent phase and acute phase. However, the levels were higher in the *P. falciparum* group

than the *P. vivax* ( $p = 0.0003$ ) and control ( $p = 0.0029$ ) groups. We did not observe any correlation between the nitrite plasma levels and symptoms, number of past malaria episodes, time of residence in the endemic area or number of months since the last malaria infection. However, the serum nitrite concentration was inversely correlated with the number of malaria infections in the past six months ( $r = -0.390$   $p = 0.030$ ).

**DISCUSSION**

In the present work, we detected classical inflammatory biomarkers (cells and mediators) in uncomplicated malaria patients infected with *P. falciparum* or *P. vivax* during the acute (day 0) and convalescent phases (day 15). In our cohort, the *P. vivax* and *P. falciparum* groups were comparable in gender, age, time of malaria exposure and number of past malaria infections. The cohort included rainforest region natives and transmigrants from non-endemic areas of Brazil who had lived in the region for more than 10 years and the majority of studied individuals reported a prior experience with *P. vivax* or *P. falciparum* malaria. All patients presented uncomplicated malaria and exhibited general clinical symptoms, such as a history of fever and headache, regardless of the *Plasmodium* species detected. Indeed, our control group, which was composed of exposed individuals who reported no malaria episodes in the last five years, was similar to the infected cohorts. The selection of these individuals as controls was ideal to distinguish whether the alterations found in cells and mediators were related to malaria infection or the social and health conditions of the native Amazon population.

Malaria is a complex multi-system disorder involving several inflammatory mediators. Monocytes, macrophages, endothelial cells, neutrophils and PLTs all express pattern recognition receptors, primarily toll-like receptors (Akira & Takeda 2004). Of these, PLTs and neutrophils are the most numerous, mobile and likely to encounter merozoites and parasite-altered erythrocytes early in infection. Therefore, one of the haematological hallmarks of acute malaria is thrombocytopenia. Despite the infrequent occurrence of severe bleeding in severe malaria or co-infection (Abbasi et al. 2009), malaria-related thrombocytopenia is usually observed at frequencies ranging

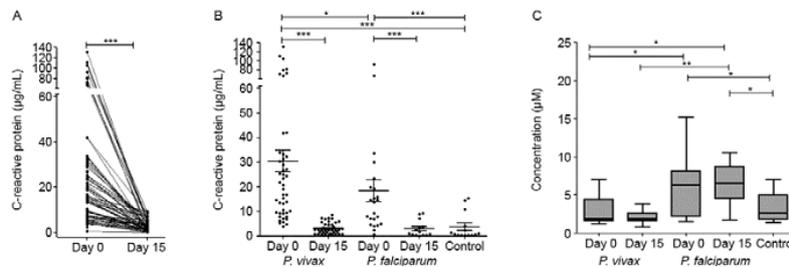


Fig. 3A: concentration of C-reactive protein (CRP) in plasma of all studied individuals during acute and convalescent phase of malaria infection; B: in scatter dot plot of CRP concentration in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infected individuals we observed significantly higher mean of CRP levels (line) were observed in *P. vivax* infected individuals when compared with *P. falciparum*; C: nitric oxide concentrations in plasma of studied individuals during acute and convalescent phase of malaria infection (box represent the interquartile range and whiskers represents the 95 percentiles).

from 24-94% (Lacerda et al. 2011). Moreover, it is unclear whether this haematological complication is more frequent in *P. vivax* or *P. falciparum* malaria. In our study, low PLT counts were present in a large portion of acute phase patients independent of the plasmodial species, but PLTs returned to basal levels in the convalescent phase. Among *P. vivax*-infected individuals, parasitaemia was significantly higher in individuals with confirmed thrombocytopenia than in non-thrombocytopenic individuals. The trend of decreasing PLT count with increasing levels of parasitaemia observed in this study has been extensively described in *P. falciparum* over the past several decades (Perrin et al. 1982, Rojanasthien et al. 1992, Richards et al. 1998), but it is less documented in the literature for *P. vivax* (Erhart et al. 2004). Thrombocytopenia in noncomplicated malaria appears to be immune mediated; the immune complexes circulating in malaria-infected patients may play a role in the peripheral destruction of PLTs and RBCs. Indeed, the phagocytosis of PLTs has also been reported in malaria patients. However, electron microscopy analyses have also demonstrated a direct interaction between plasmodium and PLTs in patients with malaria (McMorran et al. 2009).

Several reports indicate that neutrophils may be involved in the early control of blood parasites (Appelberg 2007). The activation of neutrophils in the initial stages of malaria infection is well supported (Graca-Souza et al. 2002, Mohammed et al. 2003) and transcriptome analyses of whole blood from humans infected with *P. falciparum* also revealed a unique gene expression profile related to neutrophil activity during early infection (Griffiths et al. 2005). Although low neutrophil count has been linked with acute *P. falciparum* malaria (Ladhani et al. 2002) and the contributions of neutrophils to host

defence have been long investigated (Brown & Smalley 1981, Kharazmi & Jepsen 1984), their roles in uncomplicated (*P. vivax* and *P. falciparum*) malaria remain unclear. Our data indicate that malaria-infected individuals had neither an increased frequency of neutropenia nor a low neutrophil count relative to the control group. However, the high band neutrophil count observed in the acute phase of infection and the return to normal levels in the convalescent phase suggest an accelerated production and/or release of neutrophils during malaria infection. Indeed, the inverse correlation of band count with the number of past malaria infections and the direct correlation of band count with the number of months since the last malaria infection suggest that less exposed individuals respond to parasite stimulus with a greater inflammatory profile and, consequently, increased neutrophil production.

Therefore, to evaluate the inflammatory profile associated with uncomplicated malaria infections, we investigated the plasma levels of two inflammatory mediators, CRP and NO, in patients with *P. falciparum* and *P. vivax* infections. As expected, we observed high levels of CRP in the acute phase of malaria infection (Pepys & Baltz 1983). However, the role of CRP in malaria pathogenesis or protection is not well established and the majority of data available concerns *P. falciparum* infections in African populations. In Brazilian populations, possible roles for CRP and other inflammation markers were reported in severe vivax malaria patients (Andrade et al. 2010); otherwise, the literature lacks data for CRP levels in patients with uncomplicated *P. falciparum* and *P. vivax* malaria in Brazilian endemic areas. In our work, higher CRP levels were found in the plasma of *P. vivax*-infected individuals compared to *P. falciparum*-infected

TABLE  
Clinical and epidemiological characteristics of the studied population

Variables	Control (n = 19)	Malaria (n = 71)	<i>Plasmodium vivax</i> (n = 47)	<i>Plasmodium falciparum</i> (n = 24)
Male [n° (%)]	8 (42.1)	54 (76)	35 (74.5)	19 (79.2)
Age [median of years (IQ)]	29 (29-40)	28 (22-40)	28 (22-38)	28.5 (23-41)
Years of residence in endemic area [median (IQ)]	29 (18-32)	25 (20-36)	24 (21-36)	27 (19-37)
Previous malaria episodes [median (IQ)]	1 (0-3)	3 (1-10)	3 (1-8)	4 (2-10)
Months since the last malaria episode [median (IQ)]	60 (20-180)	11 (2-34)	10 (2-24)	13 (2-102)
Elapsed days since symptoms onset [median (IQ)]	NA	3 (2-10)	3 (2-7)	3 (2-10)
Symptoms (frequency) [n° (%)]				
Fever	0	61 (85)	39 (83)	22 (91.7)
Headache	0	60 (84)	39 (83)	21 (87.5)
Myalgia	0	52 (73)	32 (68.1)	20 (83.3)
Shiver	0	52 (73)	31 (66)	21 (87.5)
Nausea	0	39 (69)	23 (48.9)	16 (66.7)
Parasitaemia [parasites (µL)]	-	2.051	1.256	2.293
Median (IQ)	0	(874-6.614)	(697-5.222)	(874-7.481)

IQ: interquartile range; NA: non-applicable.

individuals, suggesting a more robust inflammatory profile for *P. vivax* infection in the studied population. Due to a number of conflicting publications, the roles of CRP and NO in the immune response to *Plasmodium* remain uncertain (Kremsner et al. 1996, Gyan et al. 2002, Awasthi et al. 2003, Clark & Cowden 2003). NO, which is produced by various cells in the liver and peripheral blood, could serve as a defence against invading microorganisms and parasites (Ellis et al. 1998). In animal models, NO regulated by CD8 T cells can prevent the development of the exo-erythrocytic stage in the liver. The NO pathway may be a necessary component for the inhibition of sporozoite development and the elimination of infected hepatocytes (Seguin et al. 1994). It is not known whether the induction of NO activity is sufficient for protection against sporozoite development in the liver or necessary for CRP and/or other inflammatory mediators to induce pathogenic processes or protective responses against human malaria parasites.

In our cohort, the plasma levels of NO in the acute and convalescent phases were higher in *P. falciparum* patients than in controls and *P. vivax* patients. The presence of elevated NO in *P. falciparum* individuals was reported in uncomplicated and complicated *P. falciparum* malaria cases (el-Nashar et al. 2002, Gyan et al. 2002, Nahrevanian 2006, Yeo et al. 2007). Finally, we cannot rule out the possibility that genetic polymorphisms in the parasite and/or in the human genes encoding CRP (Israelsson et al. 2009, Giha et al. 2010, 2011) and NO (Kun et al. 2001, Hobbs et al. 2002, Levesque et al. 2010), which have been reported in different regions, could be responsible for the differences between the levels of these molecules in our population and those reported in other endemic areas.

In conclusion, our data indicate that individuals with uncomplicated *P. vivax* and *P. falciparum* infection presented similar white blood cell inflammatory profiles, with high band cell production and a considerable degree of thrombocytopenia during the acute phase of infection. Higher CRP levels were detected in acute *P. vivax* infection, while higher NO levels were detected in acute and convalescent *P. falciparum* infections. Although changes in these mediators are not diagnostic of malaria infection, the haematological parameters associated with malaria infection, particularly the role of PLTs and band cells, require further investigation.

## REFERENCES

- Abbasi A, Butt N, Sheikh QH, Bhutto AR, Munir SM, Ahmed SM 2009. Clinical features, diagnostic techniques and management of dual dengue and malaria infection. *J Coll Physicians Surg Pak* 19: 25-29.
- Akira S, Takeda K 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9: 13.
- Appelberg R 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 15: 87-92.
- Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, Adjei AA, Gyasi RK, Tettey Y, Wiredu EK, Tongren JE, Udhayakumar V, Stiles JK 2007. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J* 6: 147.
- Awasthi A, Kumar A, Upadhyay SN, Yamada T, Matsunaga Y 2003. Nitric oxide protects against chloroquine resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis* parasites *in vitro*. *Exp Parasitol* 105: 184-191.
- Brown J, Smalley ME 1981. Inhibition of the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* by human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Clin Exp Immunol* 46: 106-109.
- Casals-Pascual C, Kai O, Newton CR, Peshu N, Roberts DJ 2006. Thrombocytopenia in falciparum malaria is associated with high concentrations of IL-10. *Am J Trop Med Hyg* 75: 434-436.
- Clark IA, Cowden WB 2003. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther* 99: 221-260.
- Conroy AL, Liles WC, Molyneux ME, Rogerson SJ, Kain KC 2011. Performance characteristics of combinations of host biomarkers to identify women with occult placental malaria: a case-control study from Malawi. *PLoS ONE* 6: e28540.
- Corti A, Franzini M, Cianchetti S, Bergamini G, Lorenzini E, Melotti P, Paolicchi A, Paggiaro P, Pompella A 2012. Contribution by polymorphonucleate granulocytes to elevated gamma-glutamyl-transferase in cystic fibrosis sputum. *PLoS ONE* 7: e34772.
- Dong Q, Wright JR 1996. Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J Immunol* 156: 4815-4820.
- Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK 1998. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 31: 195-220.
- el-Nashar TM, el-Kholy HM, el-Shiety AG, Al-Zahaby AA 2002. Correlation of plasma levels of tumor necrosis factor, interleukin-6 and nitric oxide with the severity of human malaria. *J Egypt Soc Parasitol* 32: 525-535.
- Erhart LM, Yingyuen K, Chuanak N, Buathong N, Laoboonchai A, Miller RS, Meshnick SR, Gasser Jr RA, Wongsrichanalai C 2004. Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of western Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 70: 8-14.
- Giha HA, Nasr A, Ekstrom M, Israelsson E, Arambepola G, Arnot D, Theander TG, Troye-Blomberg M, Berzins K, Tornvall P, ElGhazali G 2010. Association of a single nucleotide polymorphism in the C-reactive protein gene (-286) with susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Med* 16: 27-33.
- Giha HA, Nasr A, Iriemenam NC, Troye-Blomberg M, Berzins K, Pandey JP, Elghazali G 2011. Associations of multi-locus polymorphisms in an immune network with susceptibility to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Daraweesh village, Eastern Sudan. *Infect Genet Evol* 11: 1674-1681.
- Gillespie SH, Dow C, Raynes JG, Behrens RH, Chiodini PL, McAdam KP 1991. Measurement of acute phase proteins for assessing severity of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Pathol* 44: 228-231.
- Gotschlich EC, Edelman GM 1967. Binding properties and specificity of C-reactive protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 706-712.
- Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL 2002. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 99: 4160-4165.
- Greve B, Lehman LG, Lell B, Luckner D, Schmidt-Ott R, Kremsner PG 1999. High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 179: 1584-1586.
- Griffiths MJ, Shafi MJ, Popper SJ, Hemingway CA, Kortok MM, Wathen A, Rockett KA, Mott R, Levin M, Newton CR, Marsh K, Relman DA, Kwiatkowski DP 2005. Genomewide analysis of the host response to malaria in Kenyan children. *J Infect Dis* 191: 1599-1611.

- Gyan B, Kurtzhals JA, Akanmori BD, Ofori M, Goka BQ, Hviid L, Behr C 2002. Elevated levels of nitric oxide and low levels of haptoglobin are associated with severe malarial anaemia in African children. *Acta Trop* 83: 133-140.
- Habeeb H, Ripper JR, Cohen A, Hinfey PB 2012. A case of imported severe *Plasmodium falciparum* malaria in the emergency department and the current role of exchange transfusion treatment. *J Emerg Med* PMID:22609412.
- Harpaz R, Edelman R, Wasserman SS, Levine MM, Davis JR, Sztein MB 1992. Serum cytokine profiles in experimental human malaria. Relationship to protection and disease course after challenge. *J Clin Invest* 90: 515-523.
- Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB 2002. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 360: 1468-1475.
- Israelsson E, Ekstrom M, Nasr A, Dolo A, Kearsley S, Arambepola G, Homann MV, Maiga B, Doumbo OK, Elghazali G, Giha HA, Troye-Blomberg M, Berzins K, Tornvall P 2009. Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. *Malar J* 8: 136.
- Kharazmi A, Jepsen S 1984. Enhanced inhibition of *in vitro* multiplication of *Plasmodium falciparum* by stimulated human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol* 57: 287-292.
- Kremsner PG, Winkler S, Wildling E, Prada J, Bienzle U, Graninger W, Nussler AK 1996. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 44-47.
- Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG 2001. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* 184: 330-336.
- Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB 2011. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 (Suppl. 1): 52-63.
- Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR 2002. Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *Br J Haematol* 119: 839-847.
- Levesque MC, Hobbs MR, O'Loughlin CW, Chancellor JA, Chen Y, Tkachuk AN, Booth J, Patch KB, Allgood S, Pole AR, Fernandez CA, Mwaikambo ED, Mutabingwa TK, Fried M, Sorensen B, Duffy PE, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB 2010. Malaria severity and human nitric oxide synthase type 2 (NOS2) promoter haplotypes. *Hum Genet* 127: 163-182.
- Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, Jones D, Ogutu BR 2010. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J* 9 (Suppl. 3): S4.
- Martelo OJ, Smoller M, Saladin TA 1969. Malaria in American soldiers. *Arch Intern Med* 123: 383-387.
- McGuire W, D'Alessandro U, Olaleye BO, Thomson MC, Langerock P, Greenwood BM, Kwiatkowski D 1996. C-reactive protein and haptoglobin in the evaluation of a community-based malaria control programme. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 10-14.
- McMorran BJ, Marshall VM, de Graaf C, Drysdale KE, Shabbar M, Smyth GK, Corbin JE, Alexander WS, Foote SJ 2009. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* 323: 797-800.
- Mohammed AO, Elghazali G, Mohammed HB, Elbashir MI, Xu S, Berzins K, Venge P 2003. Human neutrophil lipocalin: a specific marker for neutrophil activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop* 87: 279-285.
- Mora-Jensen H, Jendholm J, Fossum A, Porse B, Borregaard N, Theilgaard-Monch K 2011. Technical advance: immunophenotypical characterization of human neutrophil differentiation. *J Leukoc Biol* 90: 629-634.
- Nahrevanian H 2006. Immune effector mechanisms of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity versus cytoprotection. *Braz J Infect Dis* 10: 283-292.
- Nahrevanian H, Dascombe MJ 2001. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. *Parasite Immunol* 23: 491-501.
- Nahrevanian H, Gholizadeh J, Farahmand M, Assmar M 2008. Patterns of co-association of C-reactive protein and nitric oxide in malaria in endemic areas of Iran. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 39-44.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
- Pepys MB, Baltz ML 1983. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 34: 141-212.
- Perrin LH, Mackey LJ, Miescher PA 1982. The hematology of malaria in man. *Semin Hematol* 19: 70-82.
- Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ 2001. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65: 614-622.
- Richards MW, Behrens RH, Doherty JF 1998. Short report: hematologic changes in acute, imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 59: 859.
- Rockett KA, Awburn MM, Rockett EJ, Cowden WB, Clark IA 1994. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol* 16: 243-249.
- Rojanasthien S, Surakamolleart V, Boonpucknavig S, Isarangkura P 1992. Hematological and coagulation studies in malaria. *J Med Assoc Thai* 75 (Suppl. 1): 190-194.
- Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weier JP, Goodbary M, Slayter M, Raney JJ, Aniagolu JU, Green SJ 1994. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. *J Exp Med* 180: 353-358.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61: 315-320.
- Taylor WR, Widjaja H, Basri H, Ohrt C, Taufik T, Tjitra E, Baso S, Fryauff D, Hoffman SL, Richie TL 2008. Changes in the total leukocyte and platelet counts in Papuan and non Papuan adults from northeast Papua infected with acute *Plasmodium vivax* or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* 7: 259.
- Winters RA, Murray HW 1992. Malaria - the mime revisited: fifteen more years of experience at a New York City teaching hospital. *Am J Med* 93: 243-246.
- Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, Darcy CJ, Granger DL, Weinberg JB, Lopansri BK, Price RN, Duffull SB, Celermajer DS, Anstey NM 2007. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med* 204: 2693-2704.
- Zhu L, Chen G, Xia Q, Tang W, Huang Z, Wang M, Guo J, Yang X, Zhou Y 2010. Use of band cell percentage as an early predictor of death and ICU admission in severe acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology* 57: 1543-1548.