

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

**Influência de Componentes Relacionados à Cascata de Coagulação-Inflamação na  
Morbidade da Malária por *Plasmodium vivax***

por

Marina Lima Silva Santos

Belo Horizonte

2019

TESE DCS-IRR

M.L.S.SANTOS

2019

Marina Lima Silva Santos

**Influência de Componentes Relacionados à Cascata de Coagulação-Inflamação na Morbidade da Malária por *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dr. Bernardo Simões Franklin

Belo Horizonte

2019

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 / 1975

S237i Santos, Marina Lima Silva.  
2019

Influência de Componentes Relacionados à Cascata de Coagulação-Inflamação na Morbidade da Malária por *Plasmodium vivax* / Marina Lima Silva Santos – Belo Horizonte, 2019.

XV, 114 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 88 – 103

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. *Plasmodium vivax*/metalobilismo 2. Plaquetas/imunologia 3. Inflamação I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Franklin, Bernardo Simões (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Marina Lima Silva Santos

**Influência de Componentes Relacionados à Cascata de Coagulação-Inflamação na Morbidade da Malária por *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca examinadora:

Dra. Luzia Helena Carvalho (IRR – FIOCRUZ MINAS) Presidente

Dra. Fernanda Fortes de Araújo (IRR – FIOCRUZ MINAS) Titular

Dr. André Machado de Siqueira (INI Evandro Chagas – FIOCRUZ) Titular

Dr. Matheus de Souza Gomes (UFU) Titular

Dr. Frederico Marianetti Soriani (UFMG) Titular

Dra. Sandra Grossi Gava (IRR – FIOCRUZ MINAS) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 25/02/2019.

*“Mas é preciso ter manha  
É preciso ter graça  
É preciso ter sonho sempre  
Quem traz na pele essa marca  
Possui a estranha mania  
De ter fé na vida.”*

**Milton Nascimento e Fernando Brant**

Aos meus amados pais, Rita de Cássia e José  
Maria, que me trouxeram até aqui.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dra. Luzia Carvalho, pela confiança, dedicação e por tanto contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal, desde 2009.

Ao meu coorientador, Dr. Bernardo Franklin, pela grande contribuição intelectual para este trabalho e por tão bem me receber em seu laboratório na Alemanha.

À Dra. Cristiana Brito, por todo o apoio e carinho.

À Dra. Taís Nóbrega e à Dra. Flora Kano, pelas excelentes discussões e outras tantas ajudas.

Aos nossos colaboradores, em especial, ao Dr. Cor Fontes, Dr. Marcus Lacerda, Dr. Dhelio Pereira, Dra. Alessandra Pontillo, Dra. Rosangela Soares e Dr. Roney Coimbra, pela enorme contribuição para este trabalho.

Ao Instituto de Imunidade Inata (III, Universidade de Bonn, Alemanha), por toda a infraestrutura e pelas contribuições técnica e intelectual prestadas.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Malária, pela excelente convivência!

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

Aos colegas e amigos do AG Franklin e AG Latz, por terem feito minha estada alemã mais suave, mais alegre!

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

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

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

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

E, de forma especial, a Deus: *“Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou, o que vier a ser, vem de Ti Senhor”*.

A Nossa Senhora, por passar sempre na frente em minha vida.

Às agências de fomento, em especial ao CNPq pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche no exterior, em parceria com o DAAD (Programa Conjunto de Bolsas de Doutorado na República Federal da Alemanha – Seleção 2017/2018 – CAPES/CNPq/DAAD).

Ao povo brasileiro, que custeou os meus estudos desde a graduação, *“uma gente que ri quando deve chorar e não vive, apenas aguenta”*.



## Resumo

A despeito da redução na incidência de malária entre os anos 2010 e 2015, um aumento recente dos casos tem sido registrado na América Latina, particularmente na Região Amazônica, onde o *Plasmodium vivax* é predominante. Dado o aumento de evidências que relacionam a infecção por *P. vivax* a quadros de gravidade e óbitos, um melhor entendimento dos mecanismos de morbidade da doença pode contribuir para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas. Em vista do potencial da cascata de coagulação-inflamação em influenciar a morbidade da malária por *P. vivax*, este trabalho teve como objetivo investigar a contribuição de polimorfismos de genes relacionados ao inflamassoma, bem como do principal receptor plaquetário para o fator de von Willebrand ( $\text{GPIIb}\alpha$ ), para a patogênese da infecção. Adicionalmente, foi feita a dosagem de mediadores inflamatórios e microRNAs (miRNAs) no plasma de indivíduos infectados. A abordagem experimental incluiu pacientes com malária sintomática, sendo a maior parte dos indivíduos classificada como malária não complicada pelos critérios da Organização Mundial de Saúde. As genotipagens dos polimorfismos de inflamassoma e plaquetas foram realizadas por meio do sistema TaqMan® e PCR-RFLP; a detecção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, através de ensaio baseado na tecnologia Luminex; e a caracterização de miRNAs circulantes, com o uso da plataforma nCounter®. Em conjunto, os resultados demonstraram que: (i) a variabilidade genética de componentes do inflamassoma pode estar associada à alteração de parâmetros hematológicos na malária por *P. vivax*, com destaque para a relação entre um polimorfismo de NLRP1 e a redução na contagem plaquetária; (ii) a variabilidade do gene de  $\text{GPIIb}\alpha$  influenciou no desenvolvimento da anemia, o que sugere mecanismos envolvendo a forma ativa do vWF; (iii) a malária aguda por *P. vivax* foi caracterizada por elevados níveis de mediadores pró e anti-inflamatórios, sendo a maioria associada à baixa contagem de plaquetas e, em menor extensão, a outros parâmetros, como hemoglobina; (iv) seis dos 800 miRNAs estudados (miR-520f-3p, miR-4454+7975, miR-150-5p, let-7b-5p, miR-122-5p e miR-126-3p) foram diferencialmente expressos em grupos de pacientes com e sem trombocitopenia. De interesse, esses miRNAs parecem regular vias da resposta inflamatória, podendo contribuir para as manifestações clínicas da malária. Este trabalho apresenta novos direcionamentos acerca da patogênese associada a *P. vivax* e destaca a complexa relação entre componentes da cascata de coagulação-inflamação na malária por essa espécie de *Plasmodium*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium vivax*, patogênese, plaquetas, inflamassoma

## Abstract

Despite the global reduction in malaria incidence achieved between 2010 and 2015, a recent increase in registered cases has occurred in Latin America, especially in the Amazon Region where *Plasmodium vivax* predominates. Particular features of *P. vivax* biology, including its ability to form long-lasting liver stages, challenge current control and elimination strategies. Given increasing evidences of *P. vivax* infections related to severe and fatal disease, a better understanding of mechanisms associated to morbidity may accelerates the development of new drugs and vaccines against the parasite. Based on the potential of the coagulation-inflammation cycle as a cofactor for *P. vivax* morbidity, we investigated here the contribution of polymorphisms in inflammasome-related genes, as well as in the main platelet receptor for von Willebrand factor (GPIIb), to *P. vivax*-derived pathogenesis. Additionally, inflammatory mediators and cell-free microRNAs (miRNAs) were assessed in plasma from *P. vivax* patients. The experimental approach included symptomatic *P. vivax* outpatients, most of them classified as uncomplicated malaria according to the criteria of World Health Organization. Genetic polymorphisms of inflammasome and platelets were assessed by TaqMan® assays and PCR-RFLP; detection of cytokines, chemokines and growth factors in plasma, by Luminex-based technology; and further characterization of circulating miRNAs, by using the nCounter® platform. Taken together, the results demonstrated that: (i) genetic variability of inflammasome components was associated to altered clinical and hematological parameters of vivax malaria, and showed for the first time the relationship between NLRP1 polymorphism and low platelet counts; (ii) GPIIb variability influenced development of anemia by patients, possibly through a mechanism involving active form of vWF; (iii) acute *P. vivax* infection was characterized by elevated levels of both pro and anti-inflammatory mediators, most of them associated to low platelet counts, and, in less extension, with other hematological parameters such as hemoglobin levels; (iv) six out of 800 miRNAs evaluated (miR-520f-3p, miR-4454+7975, miR-150-5p, let-7b-5p, miR-122-5p and miR-126-3p) were differentially expressed in groups of patients categorized according to the presence or absence of thrombocytopenia. Of interest, these miRNAs seem to regulate pathways related to inflammatory response and thus possibly contribute to malaria clinical presentation. This work presents new insights into uncomplicated *P. vivax*-derived pathogenesis and highlights the intriguing relationship between components of the coagulation-inflammation cascade in *P. vivax* infection.

**Key Words:** Plasmodium vivax, pathogenesis, platelets, inflammasome

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática dos principais receptores de plaquetas e suas respectivas interações	24
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática estrutural do fator de von Willebrand (vWF)	25
<b>Figura 3:</b> Ativação de inflamação na presença de patógeno ou dano celular	28
<b>Figura 4:</b> Perfil eletroforético do polimorfismo T-5C (rs2243093) de GPIb $\alpha$ , para amostras de três indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	52
<b>Figura 5:</b> Associação entre níveis de hemoglobina e o polimorfismo T-5C de GPIb $\alpha$	53
<b>Figura 6:</b> Associação entre anemia e o polimorfismo T-5C de GPIb $\alpha$	54
<b>Figura 7:</b> Associação entre vWF ativo e polimorfismo de GPIb $\alpha$	56
<b>Figura 8:</b> Níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em pacientes com malária por <i>P. vivax</i> (n=78) e indivíduos saudáveis sem histórico de malária, provenientes de área endêmica (n=9)	58
<b>Figura 9:</b> As concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 e de quimiocinas da subfamília CXC (IP-10/CXCL10 e IL-8/CXCL8) e CC (MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 e MCP-1/CCL2) se correlacionam inversamente com os níveis plaquetários em pacientes com malária por <i>P. vivax</i>	60
<b>Figura 10:</b> Correlação entre plaquetas, VPM e citocinas	61
<b>Figura 11:</b> As concentrações plasmáticas de IL-18, SDF-1 $\alpha$ e VEGF-A se correlacionam inversamente com os níveis plaquetários e de Hb em pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	62
<b>Figura 12:</b> As concentrações plasmáticas de eotaxina e HGF se correlacionam positivamente com o número de leucócitos e negativamente com a contagem de plaquetas no sangue periférico de pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	63
<b>Figura 13:</b> A concentração plasmática de HGF também está relacionada ao aumento da parasitemia que, por sua vez, está associada à diminuição da contagem plaquetária	64
<b>Figura 14:</b> Proteínas diferencialmente detectadas nos plasmas de controles e pacientes infectados por <i>P. vivax</i> , com (P1 e P2) ou sem	65

trombocitopenia (P3)	
<b>Figura 15:</b> Proteínas diferencialmente detectadas em grupos de pacientes e controles	66
<b>Figura 16:</b> Proteínas diferencialmente detectadas em pelo menos uma das comparações realizadas entre pacientes (P1 a P3) e controles	67
<b>Figura 17:</b> Amplificação do alvo <i>U6</i> snRNA, realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), em amostra de um paciente infectado por <i>P. vivax</i> (Paciente 1)	68
<b>Figura 18:</b> Análise de Componentes Principais a partir dos dados obtidos por meio da plataforma multiplex nCounter® para 34 amostras plasmáticas, incluindo 26 pacientes infectados por <i>P. vivax</i> e 8 controles sem histórico de malária	69
<b>Figura 19:</b> Representação gráfica dos miRNAs diferencialmente expressos em grupos de pacientes (P1, P2 e P3) e indivíduos não infectados	70
<b>Figura 20:</b> Via de sinalização de IL-6	74
<b>Figura 21:</b> Via de sinalização de IL-8	75
<b>Figura 22:</b> Via de sinalização de IL-10	76

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Dados demográficos, clínico-epidemiológicos e hematológicos dos 308 indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> envolvidos no estudo	37
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros e sistema de pontuações utilizados para estratificar indivíduos com malária não grave por <i>P. vivax</i>	39
<b>Tabela 3:</b> Sondas utilizadas para a genotipagem de polimorfismos em genes do inflamassoma	40
<b>Tabela 4:</b> Mediadores inflamatórios aumentados (↑) ou diminuídos (↓) nos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> , quando comparados aos controles não expostos à malária	57
<b>Tabela 5:</b> Razão IFN- $\gamma$ /IL-10 em pacientes categorizados de acordo com o nível plaquetário	67
<b>Tabela 6:</b> Biofunções e doenças associadas aos miRNAs cuja expressão diferiu entre pacientes (P1, P2 e P3) e controles não infectados	71

## Lista de Siglas e Abreviaturas

**ACP** – Análise de Componentes Principais

**ADAMTS-13** – *A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13*

**Ag** – Antígeno

**Ago2** – *Argonaute2*

**AIC** – Critério de Informação de Akaike

**AIM2** – *Absent in melanoma 2*

**ANOVA** – Análise de Variância

**BMIM** – Grupo de Pesquisas em Biologia Molecular e Imunologia da Malária

**CARD8** – *Caspase recruitment domain family, member 8*

**CB** – *Collagen Binding*

**CCL2** – *C-C motif chemokine ligand 2*

**CCL3** – *C-C motif chemokine ligand 3*

**CCL4** – *C-C motif chemokine ligand 4*

**CCL5** – *C-C motif chemokine ligand 5*

**CCL11** – *C-C motif chemokine ligand 11*

**CEPEM** – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

**CNAs** – Ácidos nucleicos circulantes

**CRP** – Proteína C-reativa

**CXCL4** – *CXC chemokine ligand 4*

**CXCL7** – *CXC chemokine ligand 7*

**CXCL8** – *CXC chemokine ligand 8*

**CXCL10** – *CXC chemokine ligand 10*

**CXCL12a** – *CXC chemokine ligand 12a*

**CXCR1** – *CXC chemokine receptor 1*

**CXCR2** – *CXC chemokine receptor 2*

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

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática

**FC** – *Fold change*

**GLM** – Modelos lineares generalizados

**GPIa/IIa** – Glicoproteína Ia/IIa  
**GPIb-IX-V** – Glicoproteína Ib-IX-V  
**GPIb $\alpha$**  – Glicoproteína Ib $\alpha$   
**GPIIb/IIIa** – Glicoproteína IIb/IIIa  
**Hb** – Hemoglobina  
**HDL** – *High density lipoprotein*  
**HGF** – Fator de crescimento de hepatócito  
**HIV-1** – Vírus da imunodeficiência humana tipo 1  
**HTC** – Hematócrito  
**IFN- $\gamma$**  – Interferon  $\gamma$   
**IgG** – Imunoglobulina G  
**IIQ** – Intervalo interquartil  
**IL-6** – Interleucina 6  
**IL-8** – Interleucina 8  
**IL-10** – Interleucina 10  
**IL-18** – Interleucina 18  
**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1  $\beta$   
**IL-1RA** – Antagonista do receptor de interleucina-1  
**IP-10** – *Interferon gamma-induced protein 10*  
**IPA** – *Ingenuity Pathway Analysis*  
**IRR** – Instituto René Rachou  
**Mac-1** – *Macrophage antigen-1*  
**MCP-1** – *Monocyte Chemotactic Protein-1*  
**MEFV** – Gene da febre Mediterrânea  
**MIP-1  $\alpha$**  – *Macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$*   
**MIP-1  $\beta$**  – *Macrophage inflammatory protein-1  $\beta$*   
**miRNA** – microRNA  
**MPs** – Micropartículas  
**mRNA** – RNA mensageiro  
**MS** – Ministério da Saúde  
**MVs** – Microvesículas  
**N.** – Número  
**n** – Número amostral

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

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

**NLRs** – *NOD like receptors*

**NOD** – *Nucleotide oligomerization domain*

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**p** – Valor de p

**PB** – Pares de bases

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PF4** – Fator plaquetário quatro

**PM** – Peso molecular

**PMPs** – Micropartículas de plaquetas

**Q1** – Primeiro quartil

**Q3** – Terceiro quartil

**qPCR** – PCR quantitativa

**RANTES** – *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

**RFLP** – *Restriction fragment length polymorphism*

**RNA** – Ácido ribonucleico

**rRNA** – Ácido ribonucleico ribossomal

**SCF** – *Stem cell factor*

**SDF-1 $\alpha$**  – *Stromal cell-derived factor 1  $\alpha$*

**SFTS** – *Severe fever with thrombocytopenia syndrome*

**snRNA** – Pequeno RNA nuclear

**SVS** – Secretaria de Vigilância em Saúde

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular

**VPM** – Volume plaquetário médio

**Vs.** – Versus

**vWF** – Fator de von Willebrand

**WHO** – *World Health Organization*



## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	16
1.1 Malária humana no Brasil e no mundo	17
1.2 Aspectos patogênicos da malária causada por <i>P. vivax</i>	18
1.3 Plaquetas, malária e patogenia	20
1.3.1 Receptores de superfície plaquetária	22
1.4 Componentes do inflamassoma e variabilidade genética	25
1.5 Ácidos nucleicos circulantes: microRNAs plasmáticos e associação com morbidade	29
1.6 Justificativa	30
<b>2 OBJETIVOS</b>	32
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
<b>3 METODOLOGIA</b>	34
3.1 Indivíduos estudados	35
3.2 Diagnóstico de malária	37
3.3 Escore para avaliação de malária aguda por <i>P. vivax</i>	38
3.4 Coleta de sangue para obtenção de DNA e plasma	39
3.5 Genotipagem dos polimorfismos em genes de componentes do inflamassoma utilizando o sistema TaqMan®	39
3.6 Genotipagem de polimorfismo no gene do receptor plaquetário para o fator de von Willebrand (GPIb $\alpha$ ) por PCR-RFLP	40
3.7 Genotipagem do grupo sanguíneo ABO por PCR-RFLP	41
3.8 Dosagem plasmática de vWF, vWF ativo e atividade de ADAMTS-13	41
3.9 Quantificação de citocinas, quimiocinas e outras proteínas plasmáticas por ensaio multiplex	42
3.10 Extração de RNA circulante no plasma e confirmação por PCR em tempo real	42
3.11 Caracterização de miRNAs circulantes no plasma	43
3.12 Análise dos dados	43
<b>4 RESULTADOS</b>	45
PARTE I – Estudo de polimorfismos em genes do hospedeiro vertebrado	46

4.1 Contribuição da variabilidade genética do inflamassoma na malária por <i>P. vivax</i>	46
4.1.1 Artigo intitulado “Contribution of inflammasome genetics in <i>Plasmodium vivax</i> malaria”	47
4.2 Influência da variabilidade genética da glicoproteína GPIb $\alpha$ , receptor plaquetário para fator de von Willebrand (vWF), na malária por <i>P. vivax</i>	52
4.2.1 Níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (vWF) e da enzima ADAMTS-13	55
PARTE II – Papel de mediadores inflamatórios e miRNAs plasmáticos na malária por <i>P. vivax</i>	57
4.3 Influência de mediadores inflamatórios nos parâmetros hematológicos associados à malária por <i>P. vivax</i>	57
4.4 Concentração plasmática dos mediadores inflamatórios em pacientes categorizados de acordo com a presença ou ausência de trombocitopenia	64
4.5 Caracterização de miRNAs plasmáticos em função dos níveis plaquetários de pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	68
4.6 Identificação de vias de sinalização associadas aos miRNAs diferencialmente expressos nos indivíduos estudados	73
<b>5 DISCUSSÃO</b>	77
<b>6 CONCLUSÕES</b>	86
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	88
<b>APÊNDICES</b>	104
Apêndice 1 – Artigo científico publicado	105
Apêndice 2 – Conjunto de miRNAs alvos identificados em amostras estudadas de pacientes e controles	110
Apêndice 3 – Vias de sinalização identificadas considerando-se as comparações entre grupos de pacientes (P1 a P3) e controles	111
<b>ANEXOS</b>	112
Anexo 1 – Parecer Comitê de Ética 03/2008	113
Anexo 2 – Parecer Comitê de Ética CAAE: 80235017.4.0000.5091	114

## **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## 1.1 Malária humana no Brasil e no mundo

Doença parasitária típica de países tropicais e subtropicais, a malária é responsável por grandes encargos sociais, políticos e econômicos em todo o globo. Apesar dos investimentos em políticas de controle e eliminação, evidenciados pela redução da mortalidade nos últimos anos, cerca de 219 milhões de casos da infecção foram estimados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o ano de 2017 (WHO, 2018). Comparado ao progresso obtido na redução de casos globais desde 2010, observou-se a estabilização desse processo entre 2015 e 2017, quando foi registrado aumento de 5 milhões de casos. Esse acréscimo foi significativo na região das Américas, particularmente, devido à crise política e humanitária que atingiu alguns países da região, como a República Bolivariana da Venezuela (Bello *et al.*, 2017). Todavia, o continente Africano segue como o responsável pelo maior número de casos da doença no mundo, concentrando cerca de 90% dos óbitos atribuídos à malária, representados, em sua maioria, por crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2018).

*Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* são as principais espécies de plasmódios responsáveis pela malária humana e, portanto, representam grande desafio para a saúde pública mundial. Enquanto o *P. falciparum*, espécie mais letal, tem maior prevalência no continente Africano, o *P. vivax* apresenta maior distribuição geográfica, incluindo países da Ásia, África, Oriente Médio e América Latina (Howes *et al.*, 2016). Nas Américas, essa espécie de *Plasmodium* é a predominante e responsável por 74% dos casos da doença no continente (WHO, 2018).

No Brasil, em 2015, foram notificados aproximadamente 140 mil casos de malária (Siqueira *et al.*, 2016), o que correspondeu a uma redução significativa no número de casos quando comparado aos anos anteriores. A diminuição observada foi resultado dos programas de controle e prevenção de malária que tiveram como foco o diagnóstico oportuno e o tratamento imediato (Griffing *et al.*, 2015). No entanto, o número de registros de malária voltou a subir na região da Amazônia Legal, o que resultou em uma estimativa de 218 mil casos para o ano de 2017 (WHO, 2018). O principal vetor da doença nessa região é o mosquito *Anopheles darlingi*, presente em cerca de 80% do território nacional (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Na Região Amazônica, ocorre a transmissão de pelo menos três espécies de parasitos causadores da malária humana: *P. vivax*, *P. falciparum* e *Plasmodium malariae*. Todavia, as infecções por *P. vivax* representam cerca de 90% dos casos registrados (Recht *et al.*, 2017).

De maneira especial, a malária causada por *P. vivax* desafia as estratégias de controle e eliminação, no Brasil e no mundo. A biologia única do parasito, que envolve a formação e posterior reativação de formas latentes no fígado (hipnozoítos), além da habilidade em infectar o vetor antes mesmo do aparecimento dos sintomas, favorece a perpetuação do seu ciclo (Adams e Mueller, 2017). A esse aspecto, acrescenta-se, ainda, a dificuldade no rastreamento dos indivíduos infectados devido a infecções subpatentes, além do insucesso em se estabelecer o cultivo contínuo do parasito *in vitro*, o que limita o conhecimento acerca de sua patofisiologia e o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas (Adapa *et al.*, 2019).

## 1.2 Aspectos patogênicos da malária causada por *P. vivax*

A infecção malárica acomete vários órgãos e sistemas, o que favorece o surgimento de complicações clínicas e o desenvolvimento da forma grave da doença. Apesar de sua notável complexidade, a patogênese da malária, especialmente a causada por *P. falciparum*, é caracterizada por uma resposta pró-inflamatória exacerbada, comprometimento do endotélio e obstrução de capilares sanguíneos, que podem culminar em desfechos fatais (Wahlgren *et al.*, 2017).

Embora *P. vivax* seja a espécie causadora de malária humana com maior distribuição global, a malária por *P. vivax* foi, durante muito tempo, uma doença negligenciada (Bourgard *et al.*, 2018). Consequentemente, grande parte dos estudos na área de patogenia se encontra direcionada para a espécie mais letal, *P. falciparum*. No entanto, a partir do emprego do diagnóstico molecular, tornou-se evidente que a monoinfecção por *P. vivax* pode ser responsável por graves complicações clínicas e hematológicas, assim como ocorre em pacientes infectados por *P. falciparum* (Price *et al.*, 2007). De fato, casos de infecções por *P. vivax* associados a internações e óbitos têm sido reportados com maior frequência, particularmente em países asiáticos (Genton *et al.*, 2008; Tjitra *et al.*, 2008; Kumar e Saravu, 2017) e na Região Amazônica brasileira (Mendonça *et al.*, 2015). A ocorrência de complicações pode ser atribuída a uma variedade de fatores, tais como: intensidade de transmissão, presença de comorbidades, características do hospedeiro – sexo, idade e *background* genético – além de resistência ao tratamento antimalárico (Costa *et al.*, 2012; Kumar e Saravu, 2017).

Apesar dos mecanismos específicos determinantes da patogenia de *P. vivax* serem pouco conhecidos, a malária por *P. falciparum* tem sido historicamente mais estudada e

apresenta como característica patognomônica a citoadesão de hemácias parasitadas ao endotélio ativado, o que acarreta no sequestro do parasito e obstrução da microvasculatura (Wassmer *et al.*, 2015). Como resultado desse processo, trofozoítos maduros e esquizontes são raramente vistos na circulação periférica (Macpherson *et al.*, 1985) e a carga total parasitária subestimada. No entanto, estudos têm demonstrado que a carga de *P. vivax* também é subestimada pela contagem de parasitos circulantes no sangue periférico, sugerindo uma acumulação tecidual de eritrócitos parasitados (Barber *et al.*, 2015). De fato, a citoadesão de *P. vivax* a tecidos do hospedeiro foi demonstrada *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2010) e parece associada às formas parasitárias mais maduras, especialmente esquizontes (Lopes *et al.*, 2014). Achados mais recentes confirmam, ainda, a preferência de *P. vivax* por invadir reticulócitos jovens da medula óssea (Malleret *et al.*, 2015) e reiteram estudos prévios que descreveram a presença de eritrócitos infectados por *P. vivax* na medula óssea (O'donnell *et al.*, 1998; Ru *et al.*, 2009) e no baço (Machado Siqueira *et al.*, 2012). De grande relevância, foi demonstrado que marcadores enzimáticos do parasito que permitem avaliar a biomassa parasitária presente no hospedeiro – isto é, a carga parasitária circulante e acumulada nos tecidos – estavam associados à gravidade da malária por *P. vivax* e à produção de citocinas inflamatórias (Barber *et al.*, 2015).

Assim como ocorre na malária por *P. falciparum*, as manifestações clínicas da infecção malárica causada por *P. vivax* parecem estar profundamente associadas a uma potente resposta pró-inflamatória e a um desequilíbrio na produção de citocinas (Andrade *et al.*, 2010; Mendonca *et al.*, 2013). Com efeito, a malária por *P. vivax* leva a um processo inflamatório mais intenso que o induzido por *P. falciparum* (Dayananda *et al.*, 2018). Níveis plasmáticos de TNF – citocina relacionada ao paroxismo da infecção por *P. vivax* – aumentam de acordo com a gravidade da doença. Níveis de IFN- $\gamma$  também se mostraram elevados em pacientes com manifestações graves. Em contraste, IL-10, que possui papel modulador, apresentou níveis diminuídos nesses indivíduos (Andrade *et al.*, 2010). Outro estudo conduzido em Manaus demonstrou que pacientes repetidamente expostos à infecção tendem a apresentar maiores níveis de IL-10 plasmático, sugerindo o desenvolvimento gradual de uma imunidade modulatória (Chaves *et al.*, 2016).

A malária afeta quase todos os componentes da cascata de coagulação e inflamação, podendo ser considerada uma doença infecciosa sistêmica com comprometimento hematológico em grau variado (Lacerda *et al.*, 2011; O'sullivan *et al.*, 2016). Embora a anemia e a trombocitopenia sejam complicações hematológicas frequentes na malária

(Wickramasinghe e Abdalla, 2000), a destruição de eritrócitos é cerca de cinco vezes maior na infecção por *P. vivax*, quando comparada àquela causada por *P. falciparum* (Douglas *et al.*, 2012). As razões para esse fenômeno ainda não foram estabelecidas, fazendo com que estudos que visem caracterizar os fatores responsáveis pela anemia na malária sejam de grande relevância. A formação das chamadas “rosetas” – fenômeno de adesão entre um eritrócito infectado e células vermelhas não infectadas – que há décadas tem sido associada à patogenia da malária por *P. falciparum*, parece ser frequente também em infecções por *P. vivax* (Lee *et al.*, 2014). De relevância, as rosetas parecem ser um dos mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento da anemia nesses pacientes (Marin-Menendez *et al.*, 2013). Adicionalmente, a produção de autoanticorpos direcionados a eritrócitos não infectados parece estar associada à anemia na malária por *P. vivax*, podendo mediar a fagocitose dessas células. Nesse sentido, foi demonstrado que pacientes anêmicos possuem maiores níveis de IgG contra proteínas eritrocíticas diversas, quando comparados a indivíduos infectados sem anemia (Mourao *et al.*, 2018).

Apesar de não se tratar de um critério para malária grave, a trombocitopenia apresenta grande relevância clínica na malária. Dados provenientes da Índia mostraram que a trombocitopenia apresentou-se mais frequente e com maior gravidade em pacientes infectados por *P. vivax*, quando comparados aos diagnosticados com *P. falciparum* (Kochar *et al.*, 2010). No entanto, um estudo de meta-análise mostrou risco equivalente do desenvolvimento de trombocitopenia grave em pacientes com malária por *P. falciparum* e por *P. vivax* (Naing e Whittaker, 2018). Em um grupo de 17 pacientes de Manaus infectados apenas por *P. vivax*, com pelo menos um dos critérios de gravidade estabelecidos pela OMS, 14 apresentaram trombocitopenia (Alexandre *et al.*, 2010). Esta complicação hematológica apresenta-se logo no início da infecção, sendo que os níveis plaquetários tendem a retornar à normalidade após tratamento eficaz com antimaláricos. Os mecanismos determinantes da trombocitopenia associada à malária por *P. vivax* ainda não são claros; no entanto, podem estar relacionados a distúrbios de coagulação, sequestro de plaquetas no baço, alterações na medula óssea, destruição de plaquetas mediada por anticorpos, agregação plaquetária, estresse oxidativo e fagocitose (Lacerda *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2013; Naing e Whittaker, 2018).

### **1.3 Plaquetas, malária e patogenia**

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados liberados por megacariócitos da medula óssea e circulam em abundância na corrente sanguínea, onde garantem a integridade

dos vasos. Além do seu papel central na hemostasia, as plaquetas desempenham funções fundamentais relacionadas à modulação da resposta imune e à inflamação (Machlus e Italiano, 2013; Li *et al.*, 2017). Um extenso número de trabalhos tem demonstrado que esses fragmentos de megacariócitos influenciam o curso de processos inflamatórios, e assim contribuem para a proteção ou desenvolvimento de diversas patologias (Srivastava *et al.*, 2008; Smyth *et al.*, 2009; Clemetson, 2011). Durante o lúpus eritematoso sistêmico, por exemplo, as plaquetas circulantes parecem ricas em IL-1 $\beta$ , o que pode levar à ativação do endotélio e promover a adesão plaquetária à parede dos vasos (Boilard, 2017). Na malária murina, as plaquetas são ativadas precocemente durante o estágio eritrocítico do parasito e dão início à resposta de fase aguda do hospedeiro (Aggrey *et al.*, 2013).

Quando ativadas, as plaquetas liberam componentes que auxiliam na adesão, secretam mediadores inflamatórios e expressam diversas moléculas de superfície, responsáveis por recrutar e ativar células do sistema imune. Portanto, esses pequenos fragmentos anucleados são capazes de interagir com outros diferentes tipos celulares de forma direta – por mecanismos dependentes de contato – e indiretamente, por meio da secreção de mediadores solúveis (Nhek *et al.*, 2017). As plaquetas são a maior fonte das quimiocinas CXCL4 (*platelet factor 4*), CCL5 (RANTES) e CXCL7 (*Neutrophil-activating peptide-2*), as quais são liberadas após a ativação plaquetária e estão ativamente envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação (Rossaint *et al.*, 2018).

As plaquetas são uma fonte abundante de micropartículas (Ponomareva *et al.*, 2017), as quais consistem em vesículas de membrana liberadas por células ativadas em resposta a diversos estímulos, tais como, citocinas inflamatórias, indutores de estresse e apoptose (Sampaio *et al.*, 2017). Essas microvesículas são consideradas potenciais biomarcadores de inflamação e podem carrear um grande número de moléculas bioativas, como ácidos nucleicos (Jansen *et al.*, 2016). Em 2010, nosso grupo de pesquisas demonstrou níveis elevados de MPs derivadas de plaquetas (PMPs) no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*, estando os altos níveis associados às manifestações clínicas da doença (Campos *et al.*, 2010). Na malária causada por *P. falciparum*, as PMPs facilitam a adesão de eritrócitos infectados ao endotélio cerebral (Faille *et al.*, 2009). Ademais, MPs podem carrear moléculas de microRNA capazes de modular a expressão de proteínas de *P. falciparum* (Wang, Z. *et al.*, 2017).



Até o momento, os estudos sugerem que o papel das plaquetas frente à infecção malárica é complexo e ainda pouco conhecido. As várias funções desempenhadas pelas mesmas também incluem seu papel protetor em infecções por diferentes patógenos, como *Plasmodium* spp. (Morrell *et al.*, 2014). Na malária, as plaquetas parecem induzir a morte de formas intraeritrocíticas, sendo esse fenômeno, a princípio, independente da espécie de plasmódio (McMorran *et al.*, 2009). Posteriormente, demonstrou-se que a morte de *P. falciparum* mediada por plaquetas requeria contato celular, liberação do fator plaquetário quatro (PF4) e ligação desse fator ao receptor DARC (antígeno *Duffy* receptor para quimiocinas) presente na superfície dos eritrócitos (McMorran *et al.*, 2012). Mais recentemente, foi possível demonstrar que o fenômeno de morte parasitária causado por plaquetas ocorre com outros plasmódios humanos, sendo o efeito mais expressivo em pacientes infectados por *P. vivax* (Kho *et al.*, 2018). Compreender, portanto, o papel dual que as plaquetas exercem na malária humana parece ser essencial para o entendimento dos mecanismos de proteção e susceptibilidade à doença, particularmente, na infecção causada por *P. vivax*.

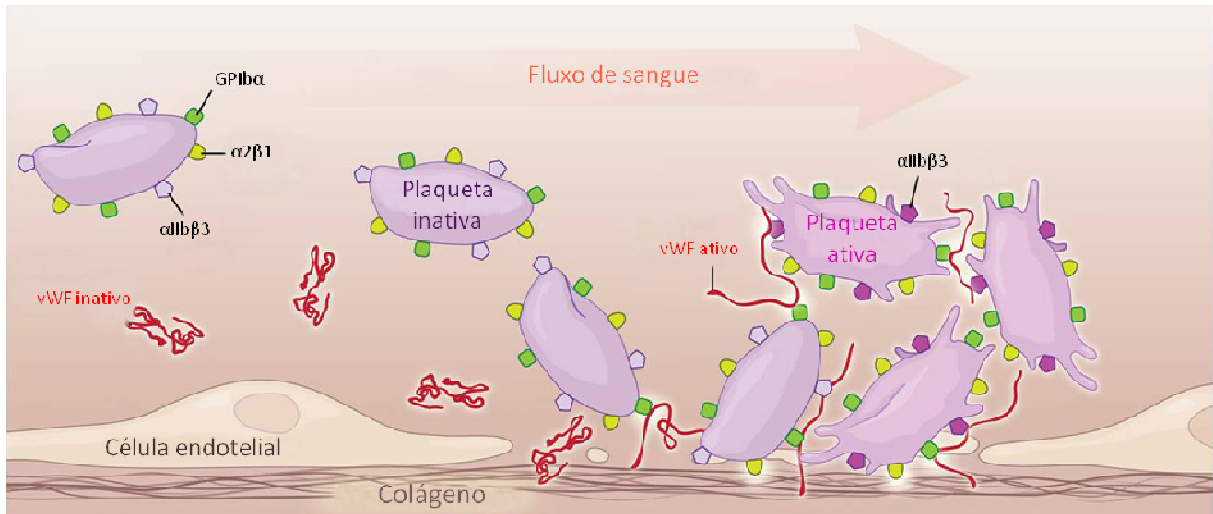
### 1.3.1 Receptores de superfície plaquetária

As plaquetas possuem glicoproteínas de membrana, há muito estudadas, as quais consistem em receptores de superfície responsáveis por importantes funções desses fragmentos celulares, tais como adesão, ativação e agregação (Mancuso e Santagostino, 2017). Sabe-se, portanto, que a variabilidade genética do hospedeiro pode afetar esses receptores de superfície, de forma a modificar o desempenho funcional das plaquetas, bem como sua contribuição para diversas patologias (Jimenez *et al.*, 2008).

As glicoproteínas GPIIb/IIIa, GPIa/IIa e GPIb $\alpha$  são os principais receptores de membrana das plaquetas (Figura 1). De grande importância para a formação do trombo e controle de hemorragias, GPIIb/IIIa, ou  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, se liga ao fibrinogênio, que atua como substrato no recrutamento de novas plaquetas para o local da lesão. Por sua vez, GPIa/IIa, também conhecida como integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, é um receptor plaquetário para colágeno, responsável pela ativação e adesão das plaquetas à parede vascular danificada (Rossaint *et al.*, 2018). Em 2013, nosso grupo de pesquisas demonstrou uma associação entre o polimorfismo C807T (rs1126643) do gene que codifica a subunidade  $\alpha$ 2 da integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 e a trombocitopenia na malária por *P. vivax*. Mais especificamente, verificou-se que pacientes carreadores do alelo T – os quais possuem maiores níveis do receptor e elevado risco

trombótico (Kunicki *et al.*, 1997; Moshfegh *et al.*, 1999) – apresentam dez vezes mais chance de desenvolver trombocitopenia grave (Campos *et al.*, 2013).

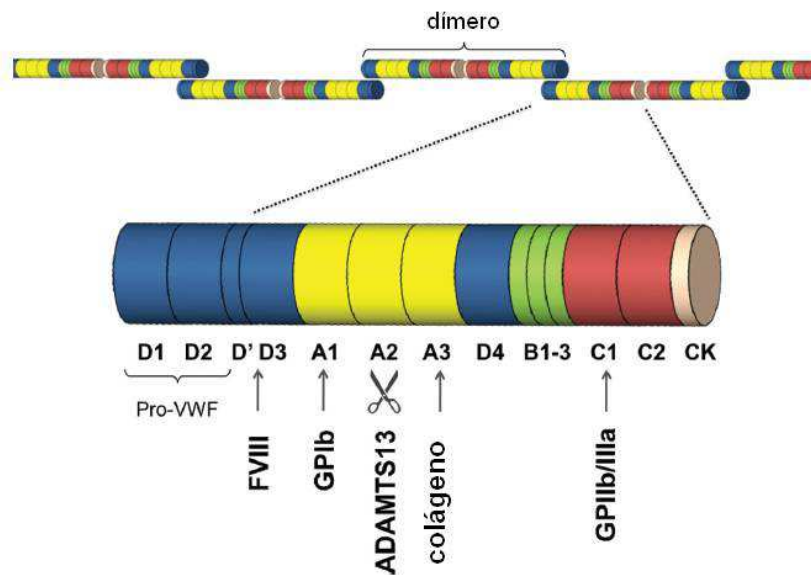
Contudo, a interação inicial entre plaquetas e a parede vascular lesionada é mediada pelo complexo GPIb-IX-V, sendo a glicoproteína GPIb $\alpha$  o maior polipeptídeo entre os que compõem esse complexo (Huizinga *et al.*, 2002). GPIb $\alpha$  é expresso apenas em megacariócitos e plaquetas. Essa glicoproteína apresenta uma região capaz de se ligar a uma proteína encontrada no plasma e na matriz subendotelial, denominada fator de von Willebrand (vWF), sendo essa associação de extrema importância para a ativação plaquetária (Lopez, 1994). Ademais, estudos acerca de desordens hemolíticas demonstraram que, nessas condições, GPIb $\alpha$  se liga à hemoglobina livre no plasma e promove a ativação das plaquetas (Annarapu *et al.*, 2016). Com relação aos níveis desse receptor plaquetário, foi proposto que o polimorfismo na sequência de Kozak T-5C (rs2243093) de GPIb $\alpha$  determina a expressão dessa glicoproteína na superfície das plaquetas. Assim, portadores do alelo C – menos frequente nas populações – apresentam maiores níveis de GPIb $\alpha$  e maior risco no desenvolvimento de doenças coronarianas (Afshar-Kharghan *et al.*, 1999).



Adaptado de Leebeek e Eikenboom, 2016

**Figura 1:** Representação esquemática dos principais receptores de plaquetas e suas respectivas interações. A adesão plaquetária ao endotélio, mediada por GPIb $\alpha$  e  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, leva à ativação plaquetária e a uma mudança conformacional de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. A glicoproteína  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, por sua vez, promove a agregação de plaquetas ativadas

Além de servir como uma ponte entre plaquetas e a matriz subendotelial após dano vascular, o vWF é um conhecido marcador de inflamação em diversas patologias (Schwameis *et al.*, 2015). Trata-se de uma glicoproteína multimérica presente no plasma, na matriz subendotelial, estocada nas células do endotélio e, em menor quantidade, em plaquetas. O vWF possui quatro domínios, cujo A1 é responsável pela ligação a seu principal receptor nas plaquetas, GPIb $\alpha$  (Figura 2) (De Meyer *et al.*, 2012). Em resposta a um estímulo inflamatório, as células do endotélio liberam grandes multímeros de vWF, os quais possuem conformação ideal para ligação às plaquetas via GPIb $\alpha$ . Por conseguinte, a interação entre plaquetas e vWF promove o recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação. Na ausência da metaloprotease ADAMTS-13, capaz de clivar os multímeros de vWF, ocorre o recrutamento excessivo de leucócitos e, portanto, amplificação da resposta inflamatória (Kawecki *et al.*, 2017). Na malária por *P. vivax*, foram observados níveis elevados de vWF, associados a baixas contagens de plaquetas (De Mast *et al.*, 2009). Todavia, o estudo de receptores plaquetários, bem como de seus ligantes, é pouco explorado na malária e, então, não se conhece a real contribuição dessas moléculas para a morbidade da doença.



Adaptado de De Meyer *et al.*, 2012

**Figura 2:** Representação esquemática estrutural do fator de von Willebrand (vWF). Os domínios D1-D2 representam o pró-peptídeo (pro-vWF), enquanto a porção D'-CK representa vWF maduro, que se organiza em multímeros. Os domínios de vWF, seus sítios de ligação e o local de clivagem por ADAMTS-13 estão indicados na figura

#### 1.4 Componentes do inflamassoma e variabilidade genética

Achados recentes têm sugerido que as plaquetas são capazes de processar e secretar a citocina IL-1 $\beta$  em sua forma ativa (Hottz *et al.*, 2013; Murthy *et al.*, 2017). IL-1 $\beta$ , por sua vez, possui propriedades inflamatórias e sua neutralização está relacionada a um melhor prognóstico em doenças autoinflamatórias (Dinarello, 2011). De grande importância para a resposta imune inata, essa citocina é produzida em decorrência da formação de complexos moleculares denominados inflamassomas (Figura 3). Esses complexos consistem em plataformas moleculares que se tornam ativadas em resposta a uma variedade de estímulos provenientes de infecções, dano tecidual ou desequilíbrios metabólicos (Latz *et al.*, 2013).

Inicialmente, a produção de IL-1 $\beta$  via inflamassoma envolve a ativação de receptores intracelulares do tipo NOD (*nucleotide oligomerization domain*), conhecidos como NLRs. O inflamassoma mais bem caracterizado apresenta NLRP3 como sensor de patógeno ou dano e, uma vez sensibilizado, promove a ativação indireta da caspase-1 e posterior clivagem de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas ativas (Schroder e Tschopp, 2010). Em contrapartida, o inflamassoma contendo NLRP1 é capaz de ativar caspase-1 diretamente (Faustin *et al.*, 2007).

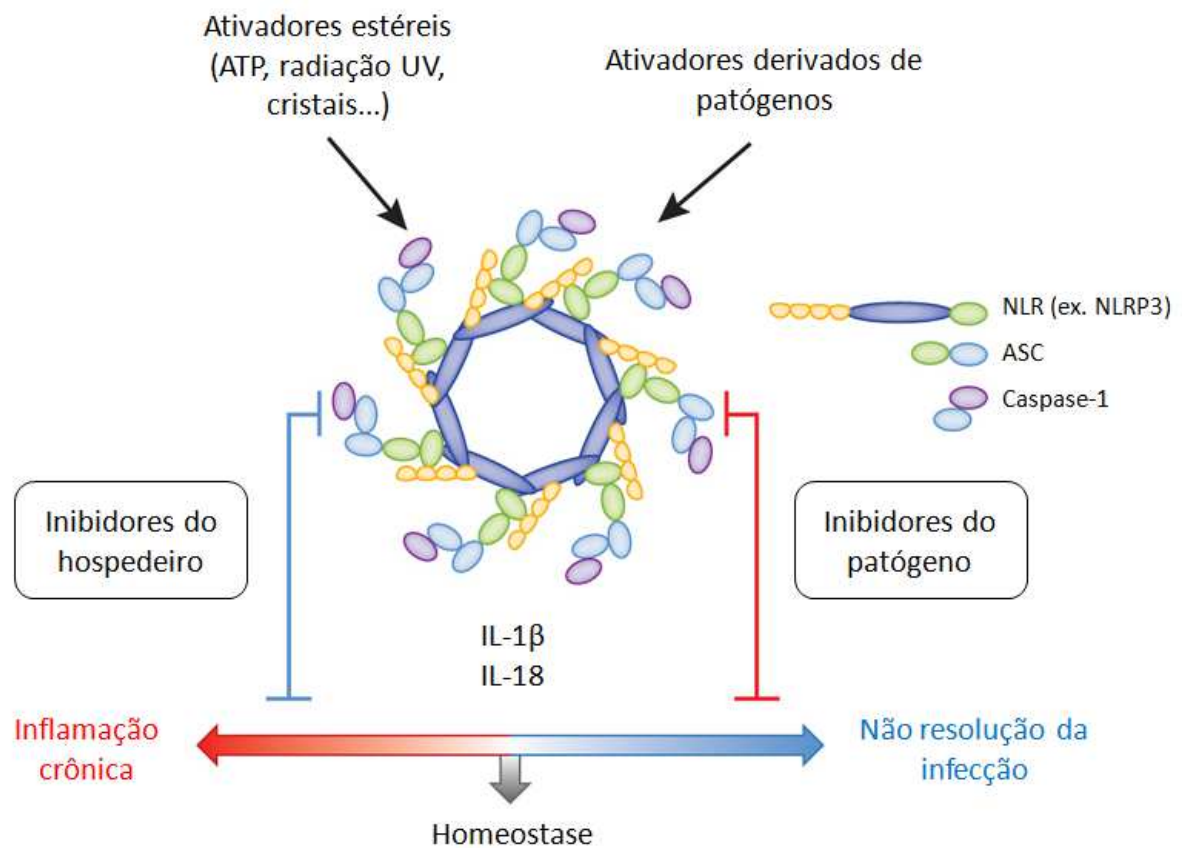
Além dos NLRs, outros receptores também podem ativar a formação de inflamassoma, como é o caso de AIM2 (*absent in melanoma 2*), capaz de reconhecer moléculas de DNA alteradas ou mesmo provenientes de parasitos (Lugrin e Martinon, 2018).

Assim como IL-1 $\beta$ , IL-18 é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias liberadas por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos e células dendríticas, frente a diferentes patógenos. Recentemente, foi mostrado que as plaquetas humanas também contêm transcritos para IL-18 (Allam *et al.*, 2017). Essa citocina induz o aumento da expressão de moléculas de adesão – importantes no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação – além de aumentar a síntese de óxido nítrico e quimiocinas (Kumar, 2018). Tendo em vista que IL-18 também é responsável por induzir a produção de IFN- $\gamma$  e, portanto, apresenta um papel importante na polarização de células T, essa citocina é capaz de influenciar a complexa interação entre parasito e hospedeiro (Arango Duque e Descoteaux, 2014).

A inibição do processo inflamatório pelo próprio hospedeiro ou patógeno é uma estratégia utilizada para limitar o dano ou facilitar o progresso da infecção, respectivamente (Garib *et al.*, 2016). Com relação aos mecanismos do hospedeiro, a autoinibição do inflamassoma é um elemento essencial para impedir que a resposta inflamatória se torne exacerbada (Davis *et al.*, 2011). Em um estudo pioneiro, foi mostrado que uma proteína contendo um domínio de recrutamento de caspase, denominada CARD8, interage por contato com a caspase-1 e regula negativamente sua ativação (Razmara *et al.*, 2002). Por outro lado, Ito e colaboradores sugeriram que CARD8 interage diretamente com NLRP3, promovendo a diminuição de IL-1 $\beta$  (Ito *et al.*, 2014). Outra molécula que parece estar associada ao controle da produção de IL-1 $\beta$  é a pirina, proteína codificada pelo gene da febre Mediterrânea (MEFV) (Hesker *et al.*, 2012).

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

No que diz respeito ao papel dos inflamassomas na malária, foi demonstrado que heme extracelular – indicador de hemólise e dano celular – promove a ativação de NLRP3 e posterior produção de IL-1 $\beta$  (Dutra *et al.*, 2014). Estudos em modelos murinos reportaram que os cristais de hemozoína produzidos durante a infecção ativam NLRP3 e agravam os sintomas da malária cerebral (Dostert *et al.*, 2009). Além disso, a hemozoína sintética foi capaz de ativar o inflamassoma *in vivo*, mesmo na ausência de infecção por *Plasmodium* sp. (Griffith *et al.*, 2009). Em um estudo recente de malária cerebral experimental, o uso de um inibidor seletivo do inflamassoma NLRP3 auxiliou significativamente na recuperação de camundongos, após administração de antimaláricos (Strangward *et al.*, 2018). Todavia, há escassez de trabalhos associando a variabilidade genética dos inflamassomas às manifestações clínicas observadas na malária, ou mesmo à inflamação característica dessa doença. Tendo em vista o caráter inflamatório da infecção por *P. vivax*, bem como a estreita relação existente entre inflamação e coagulação (Francischetti *et al.*, 2012), o presente trabalho vem auxiliar no entendimento do papel de componentes associados à biologia plaquetária e inflamassoma na infecção por *P. vivax*.



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

**Figura 3:** Ativação de inflamassoma na presença de patógeno ou dano celular. Esse evento inicial leva à ativação de caspase-1 – com ou sem a participação de moléculas adaptadoras – e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18. Em condições normais, a ativação dos inflamassomas culmina na resolução da infecção ou inflamação. Em contrapartida, a perpetuação da ativação pode levar a um quadro de inflamação crônica e agravamento da doença. Inibidores derivados de patógenos podem bloquear a ação do inflamassoma em diversos pontos e assim a resolução da infecção, ao passo que inibidores próprios do hospedeiro previnem a exacerbação do processo inflamatório

### 1.5 Ácidos nucleicos circulantes: microRNAs plasmáticos e associação com morbidade

A maior parte do DNA e RNA humano encontra-se localizada dentro das células; no entanto, pequenas porções de ácidos nucleicos podem ser encontradas no plasma sanguíneo, provenientes da liberação ativa por células vivas ou em decorrência de morte celular (Garcia-Casas *et al.*, 2017). A existência dos ácidos nucleicos circulantes (CNAs) ganhou destaque quando da identificação de altos níveis de DNA no sangue de pacientes com diferentes tipos de tumores (Phallen *et al.*, 2017). Desde então, moléculas de DNA e microRNA (miRNA) livres de células têm sido largamente investigadas e detectadas em pacientes com enfermidades agudas (Xu *et al.*, 2018). No que se refere à malária, nosso grupo de pesquisas foi pioneiro na demonstração de que os CNAs estavam aumentados durante a infecção por *P. vivax* e associados a uma maior morbidade da doença (Franklin *et al.*, 2011). Nesse mesmo trabalho, verificou-se que baixos níveis plaquetários estavam correlacionados a elevadas concentrações dessas moléculas, sugerindo o papel dos CNAs como potenciais biomarcadores de trombocitopenia e morbidade associada à malária por *P. vivax*.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que apresentam papel crítico na regulação pós-transcricional (Garavelli *et al.*, 2018). Ao se ligarem a um mRNA alvo, essas moléculas podem promover a sua degradação ou reprimir a tradução e, dessa forma, interferir em diversos processos biológicos, que incluem o desenvolvimento de doenças (Weiss e Ito, 2017). Apesar da sua função intracelular, tem sido demonstrado que os miRNAs podem ser liberados pelas células e circular no sangue de forma estável. Evidências apontam para as microvesículas (MVs) como as principais estruturas de transporte de miRNAs pela corrente sanguínea, protegendo-os da degradação e contribuindo para a sinalização intercelular (Jansen *et al.*, 2014). Nesse contexto, Zhang e colaboradores demonstraram que MVs contendo o miRNA miR-150, que se encontra em níveis elevados no plasma de pacientes com aterosclerose, foram capturadas por células endoteliais receptoras, que tiveram suas funções alteradas (Zhang *et al.*, 2010). Além disso, mostrou-se que vesículas derivadas de células endoteliais promovem proteção vascular e regeneração do endotélio, por um mecanismo em que o miR-126 atua na produção de quimiocinas e consequente reparo de dano tecidual (Zernecke *et al.*, 2009).

Como se trata de um campo ainda em expansão, muitos dos trabalhos que têm contribuído para o entendimento dos miRNAs e sua influência em condições de saúde e doença advêm de estudos em hematopoiese e doenças hematológicas (Weiss e Ito, 2017). Na



malária, a busca por eficientes biomarcadores de infecção e gravidade tem estimulado o estudo de miRNAs. O primeiro trabalho a investigar os níveis dessas moléculas no plasma de pacientes com malária sugere que dois miRNAs (miR-451 e miR-16), os quais são altamente expressos nas células vermelhas do sangue, apresentam-se diminuídos no plasma de pacientes infectados por *P. vivax* (Chamnanchanunt *et al.*, 2015). No entanto, além da busca necessária por possíveis biomarcadores da infecção, é preciso compreender de que maneira os miRNAs, especialmente aqueles presentes no plasma, podem contribuir para a patogenia associada a *P. vivax*.

## 1.6 Justificativa

A despeito dos esforços e avanços direcionados à eliminação da malária em diversos países endêmicos, a doença ainda é motivo de preocupação no cenário de saúde pública global. Nas Américas, 74% dos casos são atribuídos a *P. vivax*, espécie anteriormente considerada benigna e também negligenciada por parte das pesquisas e políticas de controle (Recht *et al.*, 2017). Todavia, registros de complicações e mortes decorrentes da infecção por *P. vivax* reforçam a necessidade de conhecimento acerca dos mecanismos patogênicos da doença (Siqueira *et al.*, 2015).

Entre os pacientes infectados por *P. vivax*, a anemia e a trombocitopenia são as complicações hematológicas mais comumente observadas, acompanhadas por uma intensa resposta pró-inflamatória e desequilíbrio na produção de citocinas (Andrade *et al.*, 2010). No intuito de identificar eficientes biomarcadores de inflamação na malária por *P. vivax*, nosso grupo de pesquisas demonstrou que, durante a infecção, as plaquetas ativadas liberam níveis significativos de pequenas vesículas extracelulares denominadas micropartículas – MPs. Essa foi a primeira evidência de que os níveis de MPs derivadas de plaquetas, as quais possuem alto potencial inflamatório, estavam associados a manifestações clínicas da malária por *P. vivax* (Campos *et al.*, 2010). Tendo em vista que as vesículas podem armazenar um grande número de moléculas bioativas, incluindo ácidos nucleicos (Jansen *et al.*, 2014), investigou-se a presença de ácidos nucleicos circulantes no sangue (CNAs) durante a infecção por *P. vivax*. Os resultados obtidos mostraram que os CNAs estão aumentados na malária por *P. vivax* e demonstram-se relacionados à morbidade. Em especial, o aumento dessas moléculas no plasma está correlacionado a baixos níveis plaquetários, reiterando a importância das plaquetas para a infecção (Franklin *et al.*, 2011).

A fim de esclarecer o papel das plaquetas na patogênese da malária por *P. vivax*, levantou-se a hipótese de que receptores de superfície plaquetária, responsáveis pela ativação e desempenho de suas funções, poderiam estar envolvidos nas complicações clínicas decorrentes da infecção. De forma satisfatória, os resultados iniciais reforçaram a hipótese de trabalho, pois demonstraram que a variabilidade genética do principal receptor plaquetário para colágeno –  $\alpha 2\beta 1$  – estava associada ao desenvolvimento de trombocitopenia grave em indivíduos infectados por *P. vivax* (Campos *et al.*, 2013). Em vista do envolvimento das plaquetas no agravamento da infecção e da importância de seus receptores para o ciclo coagulação-inflamação, o estudo de outros receptores de superfície, bem como de seus ligantes, pode auxiliar no entendimento do papel das plaquetas na malária por *P. vivax*.

Estudos têm apontado para a capacidade das plaquetas em processar e liberar citocinas, como, por exemplo, a IL-1 $\beta$  (Nhek *et al.*, 2017). Em particular, o processamento das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 ocorre a partir da ativação de plataformas moleculares denominadas inflamassomas (Kumar, 2018). Sabe-se que produtos do metabolismo do parasito ou liberados em decorrência da infecção malárica, tais como hemozoína e heme extracelular, podem ativar o inflamassoma *in vivo* (Dostert *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2014). No entanto, poucos são os dados disponíveis que associam inflamassoma à infecção por *P. vivax*.

Com o objetivo de compreender os mecanismos potenciais que levam à morbidade na malária por *P. vivax*, buscou-se aqui aprofundar na investigação dos fatores associados à cascata de coagulação-inflamação que poderiam explicar a trombocitopenia e a anemia na malária por *P. vivax*. Inicialmente, avaliou-se a influência da variabilidade genética do hospedeiro vertebrado, em especial de componentes plaquetários e do inflamassoma, na morbidade da infecção por *P. vivax*. Em um segundo momento, buscou-se uma associação entre a doença clínica e a presença de moléculas inflamatórias, tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Tendo em vista o potencial dos CNAs como biomarcadores de morbidade, além da estabilidade e funcionalidade das moléculas de microRNA plasmáticas, optou-se também por caracterizar o conteúdo de miRNAs no plasma de indivíduos infectados por *P. vivax*.

**2 OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Estudar componentes do hospedeiro vertebrado, em particular os relacionados à cascata de coagulação-inflamação, e seu envolvimento na patogênese da malária causada por *P. vivax*.

## 2.2 Objetivos específicos

1. Verificar uma possível associação entre polimorfismos de genes do inflamassoma, especificamente NLRP1, NLRP3, MEFV, CARD8, IL-1 $\beta$  e IL-18, e complicações clínicas na malária aguda por *P. vivax*;
2. Verificar associação entre um polimorfismo da glicoproteína GPIIb/IIIa, principal receptor plaquetário para o fator de von Willebrand (vWF), e a malária por *P. vivax*;
3. Investigar os níveis de vWF totais e da sua forma ativa, além da atividade de ADAMTS-13, no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*, com o fim de estabelecer uma relação entre os níveis observados, o polimorfismo genético de GPIIb/IIIa estudado e a patogênese associada à malária por *P. vivax*;
4. Investigar fatores solúveis presentes no plasma de indivíduos com malária por *P. vivax*, tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, a fim de relacioná-los às alterações hematológicas decorrentes da infecção;
5. Identificar e quantificar miRNAs diferencialmente expressos no plasma de indivíduos infectados por *P. vivax*, considerando-se pacientes com níveis plaquetários distintos.

### **3 METODOLOGIA**

### 3.1 Indivíduos estudados

A primeira parte deste estudo (Objetivos específicos 1 a 3) foi conduzida a partir de amostras biológicas (n=288), previamente estocadas no Biorrepositório do Grupo de Pesquisas em Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM) do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, conforme estabelecido pela resolução N. CNS441 de 12 de maio de 2011, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. As amostras de sangue para obtenção de DNA e plasma foram coletadas de pacientes infectados por *P. vivax*, cujo diagnóstico foi realizado entre os anos de 2004 e 2016 nos serviços de referência em malária dos estados do Mato Grosso (Cuiabá), Amazonas (Manaus) e Rondônia (Porto Velho). Para a segunda parte do estudo (Objetivos específicos 4 e 5), além do uso de amostras de biorrepositório, foi realizada nova coleta de sangue de pacientes diagnosticados com *P. vivax* (n=20), que buscaram atendimento no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM Rondônia), entre os meses de novembro e dezembro de 2017, bem como de indivíduos não infectados (n=9) na mesma área.

Ao todo, foram incluídos 308 pacientes infectados por *P. vivax*, considerando-se as amostras do Biorrepositório e da nova coleta realizada. Os critérios de inclusão no estudo foram: (i) aceitar participar do estudo por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido obtido dos adultos e, no caso de crianças e adolescentes, dos pais e/ou guardiões; (ii) indivíduos de ambos os sexos com diagnóstico microscópico positivo para *P. vivax* e idade igual ou superior a cinco anos; (iii) em caso de sexo feminino, autorrelato de ausência de gravidez; (iv) ausência de infecção por outra espécie de plasmódio confirmada por PCR (reação em cadeia da polimerase) espécie-específica (item 3.2). Os dados demográficos, epidemiológicos e clínicos foram obtidos utilizando-se protocolos já padronizados pelo grupo de pesquisa (Ceravolo *et al.*, 2008; Franklin *et al.*, 2011). Para todos os pacientes, foram realizados exames laboratoriais que incluíram hemograma completo, dosagem de bilirrubina e creatinina. Os exames clínicos e laboratoriais de rotina (hemograma e dosagens bioquímicas) foram realizados pelos serviços de referência de cada estado, sob a responsabilidade dos especialistas em malária clínica Dr. Cor Fontes (Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT), Dr. Marcus Lacerda (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM) e Dr. Dhelio Pereira (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, RO). Este projeto teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (Parecer 03/2008 – Anexo 1; CAAE: 80235017.4.0000.5091 – Anexo 2).

A tabela 1 resume os dados demográficos, clínico-epidemiológicos e hematológicos dos indivíduos infectados por *P. vivax* envolvidos no estudo. A exposição cumulativa à malária foi avaliada como o número de episódios da doença informado pelo paciente. Foram considerados anêmicos homens com hemoglobina menor que 13 g/dL e mulheres com valores abaixo de 12 g/dL (WHO, 2011). Indivíduos que apresentaram contagem de plaquetas inferior a 150.000/mm<sup>3</sup> foram categorizados como trombocitopênicos. Ademais, níveis de plaquetas inferiores a 50.000/mm<sup>3</sup> configuraram trombocitopenia grave (Lacerda *et al.*, 2011). No que diz respeito aos indivíduos não infectados, foram selecionados em área endêmica de malária (Porto Velho, RO) nove voluntários adultos saudáveis, de ambos os sexos, sem histórico de malária.

**Tabela 1:** Dados demográficos, clínico-epidemiológicos e hematológicos dos 308 indivíduos infectados por *P. vivax* envolvidos no estudo

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Gênero (M:F)	(3,5:1)
Idade, mediana (IIQ)	37,5 (27 - 48,25)
Episódios prévios de malária, mediana (IIQ)	2 (1 - 7)
Parasitas/mm <sup>3</sup> , mediana (IIQ)	3212,5 (1351,08 - 6727,5)
Hematócrito %, mediana (IIQ)	39,3 (36,33 - 43)
Hemoglobina, g/dL, mediana (IIQ)	13 (12 - 14)
Leucócitos por mm <sup>3</sup> (x10 <sup>3</sup> ), mediana (IIQ)	5,4 (4,3 - 6,59)
Plaquetas por mm <sup>3</sup> (x10 <sup>3</sup> ), mediana (IIQ)	97,2 (62 - 137,5)
Tempo de sintomas em dias, mediana (IIQ)	5 (3 - 7)
Anemia, n (%)	120 (40)
Trombocitopenia, n (%)	243 (80,2)
Trombocitopenia grave, n (%)	48 (15,8)

IIQ: intervalo interquartil Q1 – Q3

### 3.2 Diagnóstico de malária

O diagnóstico da infecção malárica foi realizado por meio de exame microscópico de gota espessa corada com Giemsa, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (SVS/MS, 2009). A confecção e o exame das lâminas foram realizados por microscopistas de referência dos serviços de saúde locais. A infecção exclusiva por *P. vivax* foi posteriormente confirmada por ensaios moleculares de PCR, baseados no gene *18S* rRNA, utilizando-se protocolo previamente padronizado no Laboratório de Malária do IRR – Fiocruz Minas (Costa *et al.*, 2014). A condução clínica e o tratamento antimalárico foram realizados sob a supervisão do



Dr. Cor Fontes (MT), do Dr. Marcus Lacerda (AM) ou do Dr. Dhelio Pereira (RO), seguindo as recomendações do Programa Nacional de Controle da Malária (SVS/MS, 2010).

### **3.3 Escore para avaliação de malária aguda por *P. vivax***

Atualmente, os critérios que definem a gravidade da malária por *P. vivax* se baseiam na classificação originalmente definida pela OMS para malária grave por *P. falciparum*, sem levar em consideração os limites de densidade parasitária (WHO, 2015). Dessa forma, com base nesses critérios, apenas um indivíduo infectado por *P. vivax*, proveniente do estado do Amazonas, demonstrou sinal clínico de malária grave. Esse paciente apresentou creatinina elevada (2,3 mg/dL) e hiperbilirrubinemia, com valor de bilirrubina total igual 4,3 mg/dL (valor de referência de até 1,2 mg/dL; critério para malária grave: superior a 3 mg/dL); outras doenças infecciosas comuns foram descartadas durante a sua hospitalização.

Como casos adicionais de malária grave por *P. vivax* não foram detectados no presente estudo, optou-se por categorizar os pacientes por meio de um escore que pudesse definir diferentes graus de morbidade (Tabela 2). Nesse contexto, foram adaptados os critérios previamente utilizados pelo nosso grupo de pesquisas (Franklin *et al.*, 2011). Resumidamente, o escore levou em conta a ocorrência ou não de febre, além de parâmetros hematológicos – hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas. Pontuações de “zero” ou “um” foram atribuídas aos parâmetros quando estes se mostravam ausentes – ou dentro dos valores de referência – ou presentes – fora da faixa de referência, respectivamente. No caso das plaquetas, porém, indivíduos com níveis iguais ou acima de 150.000/mm<sup>3</sup> receberam pontuação igual a “zero”; aqueles com níveis abaixo de 150.000 até 100.000/mm<sup>3</sup>, pontuação igual a “um”; níveis abaixo de 100.000 até 50.000/mm<sup>3</sup>, pontuação igual a “dois”; e aqueles que apresentaram trombocitopenia grave – contagem de plaquetas menor que 50.000/mm<sup>3</sup> – receberam pontuação igual a “três”. Ao final, a soma dos pontos para todos os parâmetros analisados consistiu no escore total, que variou de zero a sete.

**Tabela 2:** Parâmetros e sistema de pontuações utilizados para estratificar indivíduos com malária não grave por *P. vivax*

Parâmetros	Pontuação Atribuída			
<b>Febre</b>	0 se ausente	1 se presente		
<b>Hemoglobina, g/dL</b>	0 se $\geq 12$ (mulher)	1 se $< 12$ (mulher)		
	0 se $\geq 13$ (homem)	1 se $< 13$ (homem)		
<b>Hematócrito, %</b>	0 se $\geq 37$	1 se $< 37$		
<b>Leucócitos/mm<sup>3</sup></b>	0 se $\geq 4.000$	1 se $< 4.000$		
<b>Plaquetas/mm<sup>3</sup></b>	0 se $\geq 150.000$	1 se $< 150.000$	2 se $< 100.000$	3 se $< 50.000$

### 3.4 Coleta de sangue para obtenção de DNA e plasma

Em função dos objetivos propostos, as coletas de sangue foram realizadas utilizando-se como anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) ou citrato de sódio 3,2%. Para o estudo de polimorfismos em componentes de plaquetas e do inflamassoma, o sangue (5 mL) foi coletado em EDTA, com a utilização do sistema de coleta a vácuo (*Vacurette®*, *Greiner Bio-One International GmbH, Austria*). A partir do sangue total ou sangue em papel de filtro, o DNA foi obtido utilizando-se os kits de extração de DNA genômico *Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Netherlands)* e *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Netherlands)*, respectivamente, conforme as recomendações do fabricante, e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. A coleta em EDTA também foi utilizada para a dosagem de citocinas e caracterização de miRNAs, sendo o plasma obtido por centrifugação a  $1.500\text{g}$  por 15 minutos e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. Para a dosagem de fatores plasmáticos, como vWF total (vWF:Ag), vWF ativo (vWF:Collagen Binding - CB) e atividade de ADAMTS-13, o sangue (5 mL) foi coletado em tubos contendo citrato de sódio 3,2% (Soares *et al.*, 2013). Em seguida, o plasma foi obtido por centrifugação a  $1.500\text{g}$  por 15 minutos e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

### 3.5 Genotipagem dos polimorfismos em genes de componentes do inflamassoma utilizando o sistema TaqMan®

As genotipagens dos polimorfismos em genes de componentes do inflamassoma foram realizadas por meio do Sistema TaqMan® (*Applied Biosystems, Life Technologies, USA*), cuja sonda fluorescente é capaz de detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados durante a PCR. Neste estudo, especificamente, foram utilizados os compostos

fluorescentes VIC e FAM. As reações utilizando esse sistema foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante e as amostras lidas através da plataforma StepOne Real-Time (*Applied Biosystems, USA*). A discriminação alélica também foi realizada conforme orientações do fabricante e analisada utilizando-se o software StepOne (*Applied Biosystems, USA*).

Esta parte do estudo foi feita em colaboração com a Dra. Alessandra Pontillo (Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo), especialista em estudos de associação entre polimorfismos genéticos em componentes do inflamassoma e doenças infecciosas. O número de identificação para cada polimorfismo, assim como as sondas utilizadas se encontram descritos na tabela 3.

**Tabela 3:** Sondas utilizadas para a genotipagem de polimorfismos em genes do inflamassoma

Gene - polimorfismo	Sequência da Sonda [VIC/FAM]
NLRP1	rs12150220 GGAGCTTGGAAGAGCTTGGTAGAGG[A/T]GTGAGGCAGAGATTTCTGGGGGGAA
	rs11651270 ATCCCCCTCCTTTAAAGTGGGCCA[C/T]TTGGAACAGGGATGTGTCCACATGG
	rs2670660 ACAAGTGATCTACCAGTCTTTTAAA[A/G]TTCTATTATTA AAAACCCAAACATGC
NLRP3	rs35829419 GGAAGGCCGACACCTTGATATGGTG[A/C]AGTGTGTCCTCCCAAGCTCCTCTCA
	rs10754558 GACAATGACAGCATCGGGTGTGT[C/G]TCATCACAGCGCCTCAGTTAGAGGA
MEFV	rs224204 GGAGTCTGGAATCACAGACCCCGGG[A/G]TTGGGAACATCTCCCTCCAGGTCC
CARD8	rs2043211 AGTTGACACTCAGGAACAGCACGGA[A/T]CAATAATGGCTCTGCCTCTGTCTCA
	rs6509365 TTCATTTTCTACAAATGAGACATAA[A/G]CCTGGTGCTGATGAGGAGCCACTGA
IL-1 $\beta$	rs1143634 CATAAGCCTCGTTATCCCATGTGTC[G/A]AAGAAGATAGGTTCTGAAATGTGGA
IL-18	rs5744256 GACGTTCCACAGACATCTCAGATCC[A/G]AAACGAAATGCGTCATCCATCCTCC

Fonte: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html> (acesso em 12/2018).

### 3.6 Genotipagem de polimorfismo no gene do receptor plaquetário para o fator de von Willebrand (GPIIb) por PCR-RFLP

A fim de verificar a presença do polimorfismo T-5C (rs2243093) na sequência de Kozak do gene de GPIIb (Afshar-Kharghan *et al.*, 1999), foi realizada a amplificação da região de interesse, que gerou um fragmento de 467 pares de bases (pb). Os iniciadores utilizados foram *Forward*: 5'AGAAGAGAGAAGGACGGAGTCGAG3' e *Reverse*:

5'AGGATGGTTGTGTCTTTTCGGC3' (Ishida *et al.*, 2000). A PCR foi realizada em volume final de 20  $\mu$ L, contendo 3  $\mu$ L de DNA; 0,5  $\mu$ M de cada iniciador e 10  $\mu$ L de PCR Master Mix (Promega, USA), que contém a enzima *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampões em concentrações pré-estabelecidas. As amplificações foram conduzidas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, USA) e consistiram em um ciclo inicial de 1 minuto a 95°C, seguido por 40 ciclos, cada um com 30 segundos a 96°C, 1 minuto a 58°C, 1 minuto a 72°C e, finalmente, um ciclo de 1 minuto a 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

Após a confirmação da amplificação, os fragmentos de DNA foram digeridos com 2 unidades da enzima de restrição *AvaII* (New England Biolabs, USA), à temperatura de 37°C por 3 horas. Dessa forma, para cada reação de digestão, foram utilizados 2  $\mu$ L do produto de PCR diluído 1:2; 1  $\mu$ L de tampão fornecido com a enzima; 0,2  $\mu$ L de *AvaII*, em um volume total de 10  $\mu$ L. Os produtos gerados durante a digestão foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata, a fim de melhor distinguir os genótipos. A digestão dos produtos amplificados gerou três bandas para o alelo T (131, 161 e 175 pb) e duas para o alelo C (131 e 336 pb) na posição -5.

### 3.7 Genotipagem do grupo sanguíneo ABO por PCR-RFLP

Tendo em vista que o grupo sanguíneo ABO pode influenciar nos níveis de vWF (Rios *et al.*, 2012), foi feita a identificação do tipo sanguíneo dos pacientes, que foram posteriormente agrupados em “tipo O” e “tipo não O”, sendo que o último pode estar associado a maiores níveis de vWF (Sousa *et al.*, 2007). Para verificar a presença da deleção do nucleotídeo 261 na sequência codificante do gene que determina o grupo ABO, realizou-se a amplificação da região de interesse, que gerou um produto de 248 pb. Os iniciadores utilizados foram *fy46* 5'GAATTCAGCTCGCCACTGCCTGGGTCTC3' e *fy57* 5'GAATTCATGTGGGTGGCACCTGCCA3' (Mattos *et al.*, 2001). Em seguida, os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *KpnI* (Invitrogen, USA), à temperatura de 37°C por 2 horas. Após a digestão, o produto foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

### 3.8 Dosagem plasmática de vWF, vWF ativo e atividade de ADAMTS-13

A determinação dessas proteínas no plasma dos pacientes infectados por *P. vivax* foi realizada utilizando-se kits específicos de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). Para

vWF:Ag (antígeno), foi utilizado o kit TECHNOZYM<sup>®</sup> vWF: Ag ELISA Kit (*Technoclone, Austria*); para vWF:CB (*collagen binding*), o kit TECHNOZYM<sup>®</sup> vWF: CBA ELISA Kit (*Technoclone, Austria*); e para atividade de ADAMTS-13, TECHNOZYM<sup>®</sup> ADAMTS-13 activity (*Technoclone, Austria*), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura dos resultados foi feita com o uso do leitor de ELISA Spectra<sup>®</sup> Paradigma<sup>®</sup> (*Molecular Device, USA*). Os valores obtidos foram expressos em U/dL (vWF:Ag) e porcentagem (vWF:CB; atividade de ADAMTS-13).

Essa parte do estudo foi feita em colaboração com os pesquisadores Dr. Sérgio Bydlowski e Dra. Rosangela Soares (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

### **3.9 Quantificação de citocinas, quimiocinas e outras proteínas plasmáticas por ensaio multiplex**

A fim de identificar e quantificar importantes proteínas secretadas no plasma de indivíduos infectados por *P. vivax*, bem como de indivíduos controle, foram dosadas, ao todo, 45 proteínas, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, a partir do uso do kit ProcartaPlex<sup>®</sup> Cytokine/Chemokine/Growth Factor 45-Plex Human (*eBioscience, USA*). Este kit se baseia na tecnologia Luminex e permite a detecção simultânea de múltiplos alvos em uma única amostra. Ao final, a leitura do ensaio foi realizada em instrumento MAGPIX (*Thermo Fisher Scientific, USA*), conforme recomendações do fabricante.

Essa parte do trabalho – bem como os tópicos seguintes (3.10 e 3.11) – foi conduzida durante o período de doutorado sanduíche (01/04/2018 a 31/10/18) realizado no Instituto de Imunidade Inata da Universidade de Bonn, sob a supervisão do Dr. Bernardo Franklin.

### **3.10 Extração de RNA circulante no plasma e confirmação por PCR em tempo real**

Para o isolamento de RNA do plasma de pacientes e indivíduos saudáveis, as amostras de plasma foram descongeladas momentos antes da extração, centrifugadas a 1000xg, à temperatura ambiente, por 5 minutos e mantidas no gelo (Page *et al.*, 2013). Em seguida, 400 µL foram utilizados para extração, a partir do kit Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification (*Norgen Biotek Corp., Canada*), seguindo recomendações do fabricante. A fim de controlar a eficiência da extração, foram adicionados, após a segunda incubação com tampão de lise, cinco controles *spike ins* sintéticos, na concentração de 200 pM (5 µL) cada: ath-miR-159a; cel-miR-248; cel-miR-254; osa-miR-414; osa-miR-442 (*IDT Technologies,*

USA). Após o isolamento, a porção de RNA obtida foi concentrada com o uso do kit RNA Clean-Up and Concentration (*Norgen Biotek Corp., Canada*) e finalmente eluída em 20  $\mu$ L.

Para validar a presença de pequenos RNAs nas amostras extraídas, as mesmas foram testadas para o alvo *U6* snRNA, por meio de TaqMan® Small RNA Assays (*Applied Biosystems, USA*). Os ensaios consistiram em uma etapa de transcrição reversa, com a utilização do kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription, seguida de amplificação por qPCR, conforme protocolo disponibilizado pelo fabricante. A leitura foi realizada com o uso do aparelho QuantStudio 6 Flex (*Applied Biosystems, USA*).

### **3.11 Caracterização de miRNAs circulantes no plasma**

A detecção, identificação e a quantificação de moléculas de miRNA circulantes no plasma, presentes nas amostras de RNA total extraídas conforme descrito acima, foram realizadas com o uso da plataforma nCounter® (*NanoString Technologies®, USA*). No presente estudo, foi utilizado o painel Human v3 miRNA CodeSet, capaz de detectar até 800 alvos pré-estabelecidos, que apresentam relevância biológica. O ensaio é composto por uma etapa de processamento manual, durante a qual é feita a preparação das amostras de miRNA, seguida pela hibridização com sondas alvo-específicas, conforme recomendações do fabricante. A etapa posterior de processamento automatizado foi realizada nos instrumentos nCounter Prep Station e nCounter Digital Analyzer (*NanoString Technologies®, USA*).

### **3.12 Análise dos dados**

Parte deste trabalho teve como objetivo verificar o efeito de polimorfismos do hospedeiro vertebrado sobre parâmetros clínicos e hematológicos, que possam ser indicativos de maior morbidade na malária por *P. vivax*. Sendo assim, foram feitas análises univariadas para comparação de medianas, utilizando-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, uma vez que os grupos não apresentaram distribuição normal. Quando feita comparação entre três ou mais grupos, foi realizado o teste Dunns (teste *post hoc*). A fim de comparar proporções, realizou-se o teste Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher. As análises univariadas foram feitas com o uso do software GraphPad (InStat 3.0; Prism 7) e o nível de significância considerado foi de 5%. No caso de uma determinada variável de interesse apresentar valor de  $p < 0,20$ , foi realizada uma análise multivariada a fim de verificar o efeito do polimorfismo sobre essa variável, controlando os possíveis fatores de confusão, tais como sexo, idade e número de malárias prévias. Para tanto, foram construídos

modelos lineares generalizados (GLM), que são uma extensão dos modelos lineares normais. Ao final, o modelo selecionado foi o que apresentou menor Critério de Informação de Akaike (AIC) e, portanto, maior adequação. As análises multivariadas foram realizadas com o uso do pacote *R* (versão 3.2.2), e o nível de significância final considerado foi de 5%.

Os dados de miRNA obtidos por meio da plataforma nCounter® foram importados pelo programa nSolver 4.0 (*NanoString Technologies®*, USA). A partir do uso do software, foi possível realizar o controle de qualidade e a normalização dos dados, a qual considerou os controles *spike ins* sintéticos para o cálculo. Conforme a recomendação do fabricante, apenas os alvos que apresentaram contagem média dos valores brutos superior a 100, considerado o *background* desse ensaio, seguiram para as análises de *fold change* e Componentes Principais (ACP). Para tal, utilizou-se o software Partek Genomics Suite 7.0, capaz de identificar alvos diferencialmente expressos pelo método ANOVA (análise de variância). As análises de enriquecimento funcional foram feitas utilizando-se o software Ingenuity Pathway Analysis – IPA (*Qiagen, Netherlands*), em colaboração com o Dr. Roney Coimbra (IRR – Fiocruz Minas). Foram considerados nessas análises os alvos que apresentaram *fold change* igual ou superior a 1,25 e  $p < 0,05$ .

Para as análises de agrupamento hierárquico, utilizou-se o pacote GenePattern (Broad Institute), tomando-se a correlação de Spearman como medida de comparação das entidades e o *average linkage* como método de ligação.

As demais análises de correlação foram feitas com o uso do software GraphPad Prism 7, considerando-se nível de significância igual a 5%.

**4 RESULTADOS**



Os resultados obtidos foram subdivididos em duas partes. A primeira contemplou o estudo de polimorfismos em genes do hospedeiro vertebrado (Objetivos específicos 1 a 3), incluindo os resultados já publicados referentes à investigação de polimorfismos de inflamassoma (Santos *et al.*, 2016). A segunda parte teve como foco o papel de mediadores inflamatórios e miRNAs plasmáticos na malária por *P. vivax* (Objetivos específicos 4 e 5).

## **PARTE I – Estudo de polimorfismos em genes do hospedeiro vertebrado**

### **4.1 Contribuição da variabilidade genética do inflamassoma na malária por *P. vivax***

A análise de polimorfismos de base única em genes associados ao inflamassoma sugeriu a influência de NLRP1, IL-1 $\beta$  e IL-18 na malária clínica por *P. vivax*. Em relação ao receptor NLRP1, foi possível demonstrar que pacientes carreadores do alelo T para o polimorfismo rs12150220 apresentaram níveis significativamente mais baixos de plaquetas circulantes, quando comparados aos carreadores do genótipo AA (item 4.1.1, Tabela 4 do artigo publicado). Adicionalmente, os achados mostraram que carreadores do genótipo GG para o polimorfismo rs5744256 de IL-18 apresentaram redução dos níveis de hemoglobina e hematócrito (item 4.1.1, Tabela 5). No que diz respeito ao polimorfismo rs1143634 de IL-1 $\beta$ , verificou-se que a presença do alelo A foi associada à diminuição da parasitemia nos pacientes (item 4.1.1, Tabela 5). Entretanto, no presente trabalho, nenhuma associação significativa foi encontrada entre a malária por *P. vivax* e os polimorfismos de NLRP3, MEFV e CARD8 estudados.

## 4.1.1 Artigo intitulado “Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria”

Infection, Genetics and Evolution 40 (2016) 162–166



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)



### Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria



Marina L.S. Santos<sup>a</sup>, Edione Cristina Reis<sup>b</sup>, Pamela N. Bricher<sup>b</sup>, Tais N. Sousa<sup>a</sup>, Cristiana F.A. Brito<sup>a</sup>, Marcus V.G. Lacerda<sup>c</sup>, Cor J.F. Fontes<sup>d</sup>, Luzia H. Carvalho<sup>a</sup>, Alessandra Pontillo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Instituto de Pesquisas Leônidas and Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brazil

<sup>d</sup> Hospital Julio Muller, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 1 December 2015

Received in revised form 26 February 2016

Accepted 28 February 2016

Available online 3 March 2016

##### Keywords:

Inflammasome

NLRP1

NLRP3

IL1B

IL18

*P. vivax*

Malaria

#### ABSTRACT

Recent reports showed that, in mice, symptomatic *Plasmodium* infection triggers NLRP3/NLRP12-dependent inflammasome formation and caspase-1 activation in monocytes. In humans, few works demonstrated that inflammasome is activated in malaria. As *Plasmodium vivax* is a potent inducer of inflammatory response we hypothesised that inflammasome genetics might affect *P. vivax* malaria clinical presentation. For this purpose, selected SNPs in inflammasome genes were analysed among patients with symptomatic *P. vivax* malaria.

157 Brazilian Amazon patients with *P. vivax* malaria were genotyped for 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in inflammasome genes *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* and *MEFV*. Effect of SNPs on hematologic and clinical parameters was analysed by multivariate analysis.

Our data suggested an important role of NLRP1 inflammasome receptor in shaping the clinical presentation of *P. vivax* malaria, in term of presence of fever, anaemia and thrombocytopenia. Moreover *IL18* rs1143634 resulted significantly associated to patients' parasitaemia, while *IL18* rs5744256 plays a protective role against the development of anaemia.

Polymorphisms in inflammasome genes could affect one or other aspects of malaria pathogenesis. Moreover, these data reveal novel aspects of *P. vivax*/host interaction that involved NLRP1-inflammasome.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Background

Malaria remains a major public health problem worldwide, with 3.2 billion people at risk of being infected and developing the disease (WHO, 2015). Among the five *Plasmodium* species that cause malaria in humans, *Plasmodium falciparum* has been considered the main cause of severe and fatal disease, while *P. vivax* is a major cause of morbidity outside Africa and has also been associated with clinical severity and systemic inflammation (Barber et al., 2015).

A central mechanism for inflammation induction is the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  e IL-18 from innate immune cells. IL-1 $\beta$  e IL-18 liberation depends on the activation of a cytoplasmic complex, known as inflammasome. Several intracellular Pattern Recognition Receptors (PRRs) belonging to NLR family (i.e.: NLRP1, NLRP3, NLRP12) and to other protein families (i.e.: AIM2 or pyrin/MEFV), are able to induce the inflammasome assembling in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs). Upon recognition of PAMPs and/or DAMPs, the receptor

recruits the adaptor protein ASC and the cysteine-aspartic protease caspase-1, which is responsible for the processing of pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 (Man and Kanneganti, 2015).

Recent reports showed that, in mice, symptomatic *Plasmodium* infection triggers NLRP3/NLRP12-dependent inflammasome formation and caspase-1 activation in monocytes, leading to dramatic IL-1 $\beta$  secretion especially when exposed to a second microbial challenge (Ataide et al., 2014). Furthermore hemozoin and DNA activated inflammasome through NLRP3 and AIM2 receptors respectively, in murine infected erythrocytes (Kalantari et al., 2014).

In humans, few works demonstrated that inflammasome is activated in malaria. In *P. falciparum*, for example, the opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and leads to FcR-mediated phagocytosis in macrophages (Zhou et al., 2012). On the other hand, the presence of inflammasome complexes was demonstrated in monocytes from malaria patients containing either NLRP3 or NLRP12 inflammasomes (Ataide et al., 2014).

Although multiple studies have revealed that malaria has been a major force of evolutionary selection on the human genome (reviewed in (Malaria Genomic Epidemiology, 2014) little is currently known about the effects of malaria on the evolution of the human immune genes, possibly because the phenotypic consequences are more subtle than those of the classic erythrocyte variants (Kwiatkowski, 2005).

\* Corresponding author at: Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: [alepontillo@usp.br](mailto:alepontillo@usp.br) (A. Pontillo).

**Table 1**  
Demographic, clinical and haematological data of Brazilian Amazon patients with *P. vivax* malaria.

CHARACTERISTICS	
Median age, years	34 (25–80)
Male/female, n	122/35
Previous malaria episodes <sup>§</sup> , n	1.5 (1–40)
Days of acute illness, n	5 (3–7)
Presence of fever, yes/no	134/23
Parasitaemia, parasites/ $\mu$ L of blood	1117 (607.5–8238)
Leukocyte counts, $\times 10^3/\mu$ L	5.4 (4.4–14.6)
Haematocrit, %	38.8 (35.6–50.6)
Haemoglobin level, g/dL	Male: 13.2 (12.1–16.9); Female: 12.3 (11.3–15.2)
Anaemia <sup>¶</sup> , yes/no	Male: 52/70; Female: 12/23
Platelet counts, $\times 10^3/\mu$ L	95 (62–260)
Thrombocytopenia <sup>‡</sup> , yes/no	23/134
Total score, high/low	93/64

Data are reported as median (interquartile range) except where otherwise specified.

<sup>§</sup> Self-reported number of lifetime malaria episodes.

<sup>¶</sup> Anaemia: haemoglobin <13 g/dL (Male) and <12 g/dL (Female).

<sup>‡</sup> Thrombocytopenia: platelet counts <50  $\times 10^3/\mu$ L.

Notwithstanding, the last few years have seen a rapid growth in the number of reported genetic associations with susceptibility and resistance to clinical malaria, many of which involve immunity and inflammation. In this context, genetic variants in host innate immune genes (i.e., *CRP*, *MBL2*, *NOS2*, *IFNAR1*) and adhesion molecules (*THBS1* and *ESEL*) have been described as predisposing factors for the outcome of *P. falciparum* malaria (Kanchan et al., 2015a, 2015b), while antioxidant enzymes (i.e.: *GSTT*, *GSTM*, *GSTP*, *SOD*, *CAT*) were evaluated as risk factors for *P. vivax* malaria (Andrade et al., 2010; Fernandes et al., 2015).

As *P. vivax* is a potent inducer of inflammatory response (reviewed in (Anstey et al., 2009) we hypothesised that inflammasome genetics might affect *P. vivax* malaria clinical presentation. To our knowledge, inflammasome genes have not yet been evaluated in malaria. For this purpose, selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in inflammasome genes were analysed among Brazilian Amazon patients with symptomatic *P. vivax* malaria.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

A total of 157 patients with *P. vivax* malaria (122 males/35 females) were recruited for the study after written informed consent, as specified by the Brazilian National Commission for Ethics on Research (Protocol CEPISH/CPqRR/03/2008). Antimalarial and supportive therapies were given according to standard protocols. The study included patients with symptomatic *P. vivax* malaria, and all volunteers were negative for *P. falciparum* and/or *P. malariae* by the means of microscopy and polymerase chain reaction (PCR). Clinical and demographical data were acquired through a standardized questionnaire, and the haematological profiles were assessed by automated complete blood cell counts carried out at local health facilities. Table 1 summarizes demographic, epidemiological, parasitological and haematological data of *P. vivax* infected volunteers. For statistical purposes, we used a previously validated semi-quantitative clinical assessment to enable numerical comparisons (Campos et al., 2013). Briefly, scores of 0 or 1 were assigned to clinical and hematologic parameters reported as absent (or within reference ranges) or present (or outside reference ranges), respectively; the sum of scores provided patient's final clinical score (scores range from 0 to 7). We grouped 0–3 score as “low” and 4–7 as “high” total clinical score.

### 2.2. Single nucleotide polymorphisms selection and genotyping

10 SNPs in inflammasome genes *NLRP1*, *NLRP3*, *MEFV*, *CARD8*, *IL1B*, and *IL18* were selected based on functional effect, minor allele

frequency (MAF) and/or previously reported association with human disorders (Levandowski et al., 2013; Verma et al., 2012) (Frayling et al., 2007; Hitomi et al., 2009; Pontillo et al., 2011, 2012a, 2012b, 2013). SNPs genotyping was performed using commercially available TaqMan assays (Applied Biosystems/AB) using StepOne Real-Time platform (AB). Allelic discrimination was performed using the StepOne software (AB).

### 2.3. Data analysis

Effect of SNPs on hematologic and clinical parameters, including haematocrit, haemoglobin, leukocyte and platelet levels, parasitaemia, fever, presence of severe thrombocytopenia and anaemia as well as the total clinical score was analysed by multivariate association based

**Table 2**  
Frequency of studied polymorphisms in Brazilian Amazon cohort of patients with *P. vivax* malaria.

Gene	SNP ID	Alleles/Genotypes	Frequency	H-W p-value
<i>NLRP1</i>	rs12150220	A	0.41	0.185
		T	0.59	
		A/A	0.38	
		A/T	0.43	
		T/T	0.19	
	rs11651270	C	0.48	0.247
		T	0.52	
		C/C	0.25	
		C/T	0.45	
		T/T	0.30	
rs2670660	A	0.46	0.743	
	G	0.54		
	A/A	0.28		
	A/G	0.52		
	G/G	0.20		
<i>NLRP3</i>	rs35829419	A	0.02	1.0
		C	0.98	
		A/A	0	
		A/C	0.03	
		C/C	0.97	
	rs10754558	C	0.62	0.862
		G	0.38	
		C/C	0.39	
		C/G	0.46	
		G/G	0.15	
<i>MEFV</i>	rs224204	A	0.12	1.0
		G	0.88	
		A/A	0	
		A/G	0.24	
		G/G	0.76	
<i>CARD8</i>	rs2043211	A	0.70	0.556
		T	0.30	
		A/A	0.50	
		A/T	0.40	
		T/T	0.10	
	rs6509365	A	0.63	0.303
		G	0.37	
		A/A	0.37	
		A/G	0.51	
		G/G	0.12	
<i>IL1B</i>	rs1143634	A	0.22	0.218
		G	0.78	
		A/A	0.06	
		A/G	0.30	
		G/G	0.64	
<i>IL18</i>	rs5744256	A	0.83	0.767
		G	0.17	
		A/A	0.69	
		A/G	0.29	
		G/G	0.02	

Gene symbol, Single nucleotide polymorphism (SNP) identification (ID), allele and genotype frequencies and p-value for Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium test are reported.

**Table 3**Association results for polymorphisms in inflammasome genes and clinical presentation in *P. vivax* malaria patients.

Gene	SNP ID	Fever (Yes/No)	PRS (Log)	WBC (Log)	HTC (Log)	HB (Log)	Anaemia (Yes/No)	Platelets (n/μL)	TCP (Yes/No)	Severity (High/Low)
<i>NLRP1</i>	rs12150220	<u>0.019</u>	0.897	0.243	0.081	0.169	0.291	<b>4.5 exp.-4</b>	0.189	<b>0.001</b>
	rs2670660	<u>0.174</u>	0.262	0.172	0.099	0.103	<u>0.027</u>	0.324	0.008	0.024
	rs11651270	<u>0.030</u>	0.402	0.800	0.320	0.590	<u>0.272</u>	0.642	0.672	0.164
<i>NLRP3</i>	rs35829419	<u>0.108</u>	0.468	0.083	0.559	0.730	0.634	0.308	0.369	0.812
	rs10754558	0.708	0.063	0.616	0.842	0.997	0.542	0.620	0.254	0.958
<i>MEFV</i>	rs224204	0.379	0.344	0.900	0.343	0.371	0.059	0.378	0.056	0.935
<i>CARD8</i>	rs2043211	0.092	0.195	0.928	0.149	0.136	0.056	0.291	<u>0.025</u>	0.121
	rs6509365	0.030	0.175	0.202	0.419	0.756	0.594	0.377	0.308	0.522
<i>IL1B</i>	rs1143634	<u>0.295</u>	<b>5.2 exp.-4</b>	0.803	0.387	0.339	0.260	0.519	0.161	0.499
<i>IL18</i>	rs5744256	0.200	0.515	0.348	<b>0.004</b>	<b>2 exp.-4</b>	0.082	0.929	0.249	0.810

p-values (adjusted for sex, age and number of malaria episodes) according to general linear model (GLM) analysis are reported for studied SNPs and clinical variables as well as for malaria severity (based on "total score"). p-values < 0.05 are underlined; p-values < 0.005 are in bold characters.

SNP ID: Single nucleotide polymorphism identification number; PRS: parasitaemia; WBC: white blood cells (leukocytes); HB: haemoglobin level; HTC: haematocrit; TCP: thrombocytopenia.

on general linear model (GLM) adjusted for variables (sex, age, number of malaria episodes) using R-project package "SNP-assoc" version 1.5–2 (Gonzalez et al., 2007). The Haploview software (Barrett, 2009) was used to investigate the association and linkage disequilibrium (LD) pattern and for deriving the haplotypes. A multiple testing correction (Bonferroni) would require a significance threshold of  $p = 0.005$ .

### 3. Results

The frequency of studied polymorphisms in our patients is reported in Table 2. The distribution of genotypes was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium for all SNPs (Table 2). Multivariate analysis results are summarized in Table 3.

Polymorphisms in candidate genes, such as *NLRP3* and *MEFV*, previously shown as important players in malaria (Dutra et al., 2014; Fumagalli et al., 2009; Kalantari et al., 2014), was not associated to malaria presentation in our cohort (Table 3).

Un-expectedly, SNPs in *NLRP1* resulted differently distributed in *P. vivax* malaria patients according to several clinical parameters (fever, anaemia, platelets counts and thrombocytopenia) (Table 3).

It was possible to observe a significant lower level of platelets in patients harbouring the minor allele T of the rs12150220 (A/T + T/T: 4.92 n/μL vs A/A: 5.02 n/μL;  $p_{adj} = 4.5 \text{ exp.-4}$ ) (Table 4).

When total clinical score was taken in account ("high" versus "low"), *NLRP1* rs12150220 appeared to be significantly more frequent in individuals with a high clinical score (0.73) compared to a low one (0.55) ( $p_{adj} = 0.001$ ;  $OR_{adj} = 3.89$ ) (Table 4).

These findings suggest the contribution of missense variation *NLRP1* rs12150220 (L155H) in severity of *P. vivax* malaria.

We would like to briefly mention other association results with  $p < 0.05$ , even if they did not pass Bonferroni correction, maybe due to the limited size of analysed cohort, as in our opinion corroborate fully statistically significant data. *NLRP1* rs1215022 and rs11651270 SNPs are more frequent in patients with fever ( $n = 134$ ) versus individuals reporting no fever episodes ( $n = 23$ ) ( $p_{adj} = 0.019$  and  $OR_{adj} = 4.68$ ; and  $p_{adj} = 0.030$  and  $OR_{adj} = 7.74$ , respectively) (Supplementary File 1). Moreover *NLRP1* promoter variant rs2670660 resulted more frequent in anaemic patients ( $p_{adj} = 0.027$ ;  $OR_{adj} = 2.67$ ) as well as in individuals with thrombocytopenia ( $p_{adj} = 0.008$ ;  $OR_{adj} = 4.54$ ) (Supplementary File 1).

Polymorphisms in inflammasome-related cytokines IL-1β and IL-18 resulted significantly associated to clinical parameters in our cohort.

Malaria patients carrying *IL1B* rs1143634 minor A allele presented a lower parasite load than G/G ones (A/A + A/G: 2.89 log (parasite/μL) versus G/G: 3.2;  $p_{adj} = 5.2 \text{ exp.-4}$ ), emphasizing the contribution of this inflammasome-dependent cytokine in controlling parasitaemia (Table 5).

**Table 4**Detailed results for significantly associated *NLRP1* SNPs.

SNP	Clinical variable	Individuals (frequency)	me ± se	dif	Lower	upper	p	P <sub>adj</sub>
<b>Platelets counts (103/μL)</b>								
rs12150220	A/A	0.38	120.484 ± 7.990	Ref.			3.9 exp-4	4.5 exp-4
	A/T-T/T	0.62	94.629 ± 04.892	-25.855	-43.179	-8.532		
<b>Total clinical score</b>								
rs12150220	A/A	0.27	0.45	Ref			0.022	0.001
	A/T-T/T	0.73	0.55	3.89	1.63	9.30		

Genotypes distribution according to inheritance model (dominant, over-dominant), p-value, p-values adjusted for sex, age and number of malaria episodes, as well as Odds Ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI), or difference (dif) and 95% confidence intervals (lower; upper) are reported for *NLRP1* SNPs associated with malaria clinical variables. me ± se: mean and standard error. Ref.: reference genotype.

**Table 5**  
Detailed results for significantly associated *IL1B* and *IL18* SNPs

Gene/SNP	Clinical variable		me ± se	dif	Lower	Upper	p	P <sub>adj</sub>
<i>IL1B</i>								
rs1143634	Parasitaemia (log)			Ref.				
	G/G	0.73	3.20 ± 0.07				0.009	5.2 exp.-4
	A/G-A/A	0.27	2.89 ± 0.09	-0.51	-0.78	-0.24		
<i>IL18</i>								
rs5744256	Haemoglobin level (log)			Ref.				
	A/A	0.69	2.53 ± 0.01				0.003	1.9 exp.-4
	A/G	0.29	2.58 ± 0.02	0.06	0.01	0.12		
	G/G	0.02	2.31 ± 0.34	-0.37	-0.58	-0.16		
rs5744256	Haematocrit (log)			Ref.				
	A/A-A/G	0.98	3.64 ± 0.01				0.005	0.004
	G/G	0.02	3.39 ± 0.35	-0.26	-0.43	-0.08		

Genotypes distribution according to inheritance model (co-dominant, dominant or recessive), p-value, p-values adjusted for sex, age and number of malaria episodes, as well as difference (dif) and 95% confidence intervals (lower; upper) are reported for inflammasome SNPs associated with discrete/continue variables. me ± se: mean and standard error; Ref.: reference genotype.

Lower haemoglobin levels were found in *IL18* rs5744256 G/G individuals (log(Hb) = 2.305) compared to A/A (log(Hb) = 2.526) and A/G individuals (log(Hb) = 2.578) (p<sub>adj</sub> = 1.9 exp.-4) (Table 4). The same *IL18* SNP was significantly associated with low haematocrit values according to a recessive inheritance model (p<sub>adj</sub> = 0.004) (Table 4), suggesting that this 3'UTR variant, which lead to a reduced serum level of IL-18 (Frayling et al., 2007), could contribute to the development of anaemia in malaria patients. Accordingly, *IL18* rs5744256\_A > G resulted less frequent in the anaemic patients (male: Hb < 13.00 g/dL; female: Hb < 12.00 g/dL) as compared to non-anaemic ones (0.21 versus 0.37; OR = 0.46), however once again this association could not be considered statistically significant after Bonferroni correction (p<sub>adj</sub> = 0.037) (Supplementary File 1).

Finally, linkage disequilibrium was tested in the studied population and the 2 *CARD8* SNPs (rs2043211, rs6509365) resulted in LD (D' = 0.94; r<sup>2</sup> = 0.64) (Supplementary File 2), however the derived 4 haplotypes (A-A, T-G, A-G, T-A) did not result significantly associated with malaria clinical presentation (p > 0.05).

#### 4. Discussion

In murine models of malaria infection NLRP3-inflammasome has been pointed out as the complex responsible for inflammation in response to *Plasmodium* spp. hemozoin (Kalantari et al., 2014) moreover haemolysis in term of increasing extracellular heme also activates NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  secretion (Dutra et al., 2014). However, unexpectedly, *NLRP3* variants did not associate with any analysed characteristics of clinical malaria.

Similarly, the other strong candidate gene, *MEFV*, which has been previously pointed out as a protector factor against *P. falciparum* malaria (Fumagalli et al., 2009) did not result significantly associated to *P. vivax* malaria in our cohort.

However our data suggested an important role of another inflammasome receptor, the NLRP1, in shaping the clinical presentation of *P. vivax* malaria, in term of presence of thrombocytopenia, a relevant complication in *P. vivax* malaria (Lacerda et al., 2011) and severity of the disease. Up to date, NLRP1 has not been associated to disease characterized by episodes of fever as other inflammasome-related NLRs, nor with platelet disorder. Moreover information about PAMPs and/or DAMPs able to activate NLRP1 is still lacking, suggesting that during *P. vivax* infection still unknown molecular patterns could appear and induce inflammasome activation through this receptor. Recent reports indicate that NLRP1 could play a key role in endothelium, and especially in endothelial disorders (Bleda et al., 2014, 2015). As *P. vivax* targets endothelium and induces vascular damage (Barber et al., 2015), we can hypothesise that individual carrying *NLRP1* gain-of-function SNPs could be more

susceptible to develop *P. vivax*-related vascular disorder. On the other hand, the association of *NLRP1* SNPs with cytopenia (platelets and, even if not fully significant, red blood cells) recalls the work by (Masters et al., 2012) where NLRP1-inflammasome activation has been associated to pyroptosis cell death in haematopoietic progenitor cells in mice. Deeper investigations are needed to elucidate the role of NLRP1 in *P. vivax* malaria.

Cyclic inflammation is a common hallmark of malaria and it is related to high levels of pro-inflammatory cytokines (Anstey et al., 2009), however it is still unclear whether the production of cytokine is a benefit for immune response against *Plasmodium*. Our results suggested that IL-1 $\beta$  seemed to be important in controlling parasitaemia. For what concerns IL-18, it was recently shown in a murine model of malaria that augmented levels of IL-18 positively correlated with *Plasmodium* parasitaemia and with the severity of the infection (Basir et al., 2012). In our cohort, the *IL18* loss-of-function variation rs5744256 (Frayling et al., 2007) was associated to reduced haemoglobin level and haematocrit. These results partially confirmed previously published data about the association between *IL18* promoter variants and severe malarial anaemia in children (Anyona et al., 2011).

#### 5. Conclusions

Despite the limited size of studied cohort, our results showed a significant association between inflammasome genetics and clinical presentation of *P. vivax* malaria, suggesting that polymorphisms in inflammasome genes could affect one or another aspect of malaria pathogenesis. Moreover, these data confirm previously reported results about the key role of NLRP3-inflammasome in mouse model of malaria, and reveal novel aspects of *P. vivax*/host interaction that might be deeper investigated in term of *NLRP1*/platelets and/or endothelium interplay.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.038>.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MLSS and TNS participated to the statistical analysis and to the manuscript draught; ECR and PB carried out the genotyping experiments; CFAB and LHC participated in the design of the study and drafted the manuscript; MVL and CJF recruited malaria patients; AP conceived

and coordinated the study, analyses the data and wrote the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo Research foundation (FAPESP) (2013/06142-1).

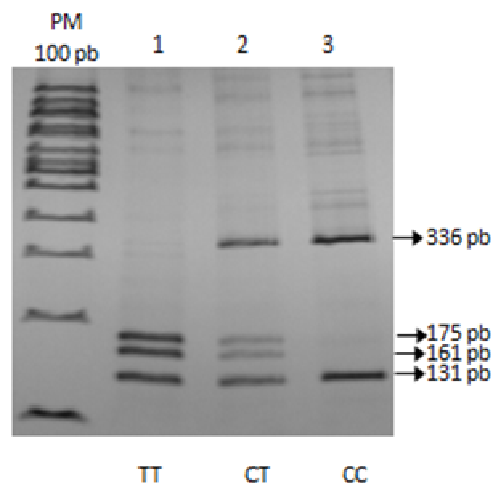
A.P. is recipient of a Fellowship from CNPq. ECR is a recipient of a Fellowship from CAPES. PB is a recipient of a Fellowship from FAPESP (TT3). MLSS is a recipient of a Fiocruz Fellowship.

### References

- Andrade, B.B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S.M., Raffaele-Netto, I., Camargo, L.M.A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2010. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e650.
- Anstey, N.M., Russell, B., Yeo, T.W., Price, R.N., 2009. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 25, 220–227.
- Anyona, S.B., Kempaiah, P., Raballah, E., Ouma, C., Were, T., Davenport, G.C., Konah, S.N., Vulule, J.M., Hittner, J.B., Gichuki, C.W., Ong'echa, J.M., Perkins, D.J., 2011. Functional promoter haplotypes of interleukin-18 condition susceptibility to severe malarial anemia and childhood mortality. *Infect. Immun.* 79, 4923–4932.
- Ataide, M.A., Andrade, W.A., Zamboni, D.S., Wang, D., Souza Mdo, C., Franklin, B.S., Elian, S., Martins, F.S., Pereira, D., Reed, G., Fitzgerald, K.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., 2014. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog.* 10, e1003885.
- Barber, B.E., William, T., Grigg, M.J., Parameswaran, U., Piers, K.A., Price, R.N., Yeo, T.W., Anstey, N.M., 2015. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog.* 11, e1004558.
- Barrett, J.C., 2009. Haploview: visualization and analysis of SNP genotype data. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, (pdb ip71).
- Basir, R., Hasballah, K., Jabbarzare, M., Gam, L.H., Abdul Majid, A.M., Yam, M.F., Mokdas, M.A., Othman, F., Che Norma, M.T., Zalinah, A., Mahmud, R., Abdullah, W.O., 2012. Modulation of interleukin-18 release produced positive outcomes on parasitaemia development and cytokines production during malaria in mice. *Trop. Biomed.* 29, 405–421.
- Bleda, S., de Haro, J., Varela, C., Esparza, L., Ferruelo, A., Acin, F., 2014. NLRP1 inflammasome, and not NLRP3, is the key in the shift to proinflammatory state on endothelial cells in peripheral arterial disease. *Int. J. Cardiol.* 172, e282–e284.
- Bleda, S., de Haro, J., Varela, C., Ferruelo, A., Acin, F., 2015. Aspirin therapy inhibits NLRP1 (nucleotide-binding domain-like receptor protein 1) inflammasome gene expression in patients with peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* 61, 1103–1104.
- Campos, F.M.F., Santos, M.L.S., Kano, F.S., Fontes, C.J.F., Lacerda, M.V.G., Brito, C.F.A., Carvalho, L.H., 2013. Genetic variability in platelet integrin  $\alpha 2\beta 1$  density: possible contributor to plasmodium vivax-induced severe thrombocytopenia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 325–328.
- Dutra, F.F., Alves, L.S., Rodrigues, D., Fernandez, P.L., de Oliveira, R.B., Golenbock, D.T., Zamboni, D.S., Bozza, M.T., 2014. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4110–E4118.
- Fernandes, R.C., Hasan, M., Gupta, H., Geetha, K., Rai, P.S., Hande, M.H., D'Souza, S.C., Adhikari, P., Brand, A., Satyamoorthy, K., 2015. Host genetic variations in glutathione-S-transferases, superoxide dismutases and catalase genes influence susceptibility to malaria infection in an Indian population. *Mol. Gen. Genet.* 290, 1155–1168.
- Frayling, T.M., Rafiq, S., Murray, A., Hurst, A.J., Weedon, M.N., Henley, W., Bandinelli, S., Corsi, A.M., Ferrucci, L., Guralnik, J.M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2007. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Med. Sci.* 62, 73–78.
- Fumagalli, M., Cagliani, R., Pozzoli, U., Riva, S., Comi, G.P., Menozzi, G., Bresolin, N., Sironi, M., 2009. A population genetics study of the familial Mediterranean fever gene: evidence of balancing selection under an overdominance regime. *Genes Immun.* 10, 678–686.
- Gonzalez, J.R., Armengol, L., Sole, X., Guino, E., Mercader, J.M., Estivill, X., Moreno, V., 2007. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23, 644–645.
- Hitomi, Y., Ebisawa, M., Tomikawa, M., Imai, T., Komata, T., Hirota, T., Harada, M., Sakashita, M., Suzuki, Y., Shimojo, N., Kohno, Y., Fujita, K., Miyatake, A., Doi, S., Enomoto, T., Taniguchi, M., Higashi, N., Nakamura, Y., Tamari, M., 2009. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (779–785), e776.
- Kalantari, P., DeOliveira, R.B., Chan, J., Corbett, Y., Rathinam, V., Stutz, A., Latz, E., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., Fitzgerald, K.A., 2014. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep.* 6, 196–210.
- Kanchan, K., Jha, P., Pati, S.S., Mohanty, S., Mishra, S.K., Sharma, S.K., Awasthi, S., Venkatesh, V., Habib, S., 2015a. Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) microsatellite repeat and single nucleotide polymorphism haplotypes of IFN- $\alpha$  receptor (IFNAR1) associated with enhanced malaria susceptibility in Indian populations. *Infect. Genet. Evol.* 29, 6–14.
- Kanchan, K., Pati, S.S., Mohanty, S., Mishra, S.K., Shama, S.K., Awasthi, S., Venkatesh, V., Habib, S., 2015b. Polymorphisms in host genes encoding NOS1L, C-reactive protein, and adhesion molecules thrombospondin and E-selectin are risk factors for *Plasmodium falciparum* malaria in India. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 2029–2039.
- Kwiatkowski, D.P., 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 171–192.
- Lacerda, M.V., Mourao, M.P., Coelho, H.C., Santos, J.B., 2011. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 (Suppl. 1), 52–63.
- Levandowski, C.B., Mailloux, C.M., Ferrara, T.M., Gowan, K., Ben, S., Jin, Y., McFann, K.K., Holland, P.J., Fain, P.R., Dinarello, C.A., Spritz, R.A., 2013. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 $\beta$  processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2952–2956.
- Malaria Genomic Epidemiology, N., 2014. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nat. Genet.* 46, 1197–1204.
- Man, S.M., Kanneganti, T.D., 2015. Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* 265, 6–21.
- Masters, S.L., Gerlic, M., Metcalf, D., Preston, S., Pellegrini, M., O'Donnell, J.A., McArthur, K., Baldwin, T.M., Chevrier, S., Nowell, C.J., Cengia, L.H., Henley, K.J., Collinge, J.E., Kastner, D.L., Feigenbaum, L., Hilton, D.J., Alexander, W.S., Kile, B.T., Croker, B.A., 2012. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity* 37, 1009–1023.
- Pontillo, A., Vendramin, A., Catamo, E., Fabris, A., Crovella, S., 2011. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 539–544.
- Pontillo, A., Girardelli, M., Kamada, A.J., Pancotto, J.A., Donadi, E.A., Crovella, S., Sandrin-Garcia, P., 2012a. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 45, 271–278.
- Pontillo, A., Oshiro, T.M., Girardelli, M., Kamada, A.J., Crovella, S., Duarte, A.J., 2012b. Polymorphisms in inflammasome genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59, 121–125.
- Pontillo, A., Carvalho, M.S., Kamada, A.J., Moura, R., Schindler, H.C., Duarte, A.J., Crovella, S., 2013. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 63, 147–151.
- Verma, D., Samdahl, E., Andersson, H., Eriksson, P., Fredrikson, M., Jonsson, J.I., Lerm, M., Soderkvist, P., 2012. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 $\beta$  and IL-18 production. *PLoS One* 7, e34977.
- WHO, 2015. World Malaria Report 2015. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Zhou, J., Ludlow, L.E., Hasang, W., Rogerson, S.J., Jaworowski, A., 2012. Opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages. *Malar. J.* 11, 1–13.

#### 4.2 Influência da variabilidade genética da glicoproteína GPIIb/IIIa, receptor plaquetário para fator de von Willebrand (vWF), na malária por *P. vivax*

Para avaliar o polimorfismo T-5C (rs2243093) da glicoproteína GPIIb/IIIa, fez-se necessário padronizar a reação de PCR-RFLP, conforme detalhado na Metodologia. O ensaio foi padronizado com sucesso e a figura 4 ilustra o perfil eletroforético do polimorfismo T-5C para amostras de pacientes carreadores do genótipo selvagem (TT), heterozigoto (CT) ou homozigoto mutado (CC).



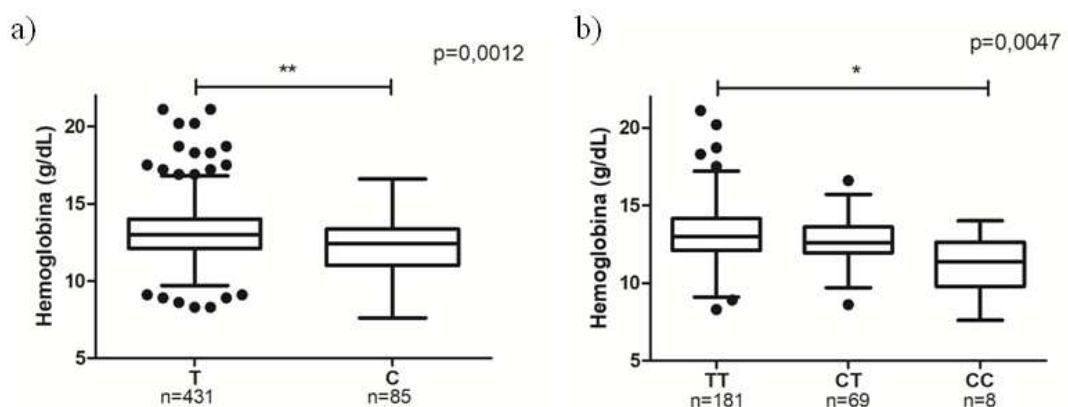
**Figura 4:** Perfil eletroforético do polimorfismo T-5C (rs2243093) de GPIIb/IIIa, para amostras de três indivíduos infectados por *P. vivax*. O indivíduo 1 possui genótipo TT (131, 161, 175 pb); indivíduo 2, genótipo CT (131, 161, 175, 336 pb) e o indivíduo 3 apresenta o genótipo mutado CC (131, 336 pb). Gel de poliácridamida 8% corado com nitrato de prata. PM= padrão de peso molecular

Ao todo, 262 dos 308 (85%) voluntários infectados por *P. vivax* (Tabela 1, ambos os sexos, com mediana de idade de 37 anos) foram genotipados para o polimorfismo de GPIIb/IIIa. O alelo selvagem T foi o mais frequente (83,4%), bem como o genótipo TT, presente em 70% dos indivíduos estudados. O alelo C mutado apresentou frequência relativa igual a 16,6% e os genótipos CT e CC tiveram frequências iguais a 27% e 3%, respectivamente.

A fim de verificar uma associação entre o polimorfismo de GPIIb/IIIa e a morbidade ocasionada por *P. vivax*, analisou-se o efeito da mutação sobre os níveis de hemoglobina (Hb), hematócrito (HTC), leucócitos, plaquetas, bem como ocorrência de trombocitopenia

grave ( $<50.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$ ), anemia ( $\text{Hb}<12$  g/dL para mulheres e  $\text{Hb}<13$  g/dL para homens) e perfil clínico (escore de morbidade, item 3.3).

Os resultados permitiram demonstrar que não houve associação entre o polimorfismo de GPIb $\alpha$  e níveis leucocitários, plaquetários, ou valores do escore (dados não mostrados). Entretanto, esse mesmo polimorfismo influenciou outros parâmetros hematológicos. Mais especificamente, a partir das análises univariadas, verificou-se uma associação significativa entre níveis de Hb e os alelos de GPIb $\alpha$  (Figura 5a), sendo os níveis mais baixos associados ao alelo mutado (média de 12,3 g/dL), quando comparado ao alelo selvagem (média de 13,1 g/dL) (Teste de Mann-Whitney;  $p=0,0012$ ). De forma semelhante, verificou-se uma tendência à diminuição dos níveis de Hb em função do número de alelos mutados. Assim, portadores do genótipo TT apresentaram o maior valor médio (13,2 g/dL), ao passo que carreadores do genótipo CC apresentaram a menor média (11,2 g/dL), sendo a diferença entre os grupos de genótipos estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis;  $p=0,0047$ ). Após o teste *post hoc*, verificou-se que a diferença encontrada se referia aos grupos TT e CC ( $p<0,05$ ) (Figura 5b). Na análise multivariada, quando foram controladas as possíveis variáveis de confusão (sexo, idade e exposição prévia à malária), observou-se que a associação entre a presença do alelo mutado de GPIb $\alpha$  e baixos níveis de Hb se manteve significativa ( $p=0,004$  para CC e  $p=0,047$  para CT, quando comparados a TT; AIC=997,7).



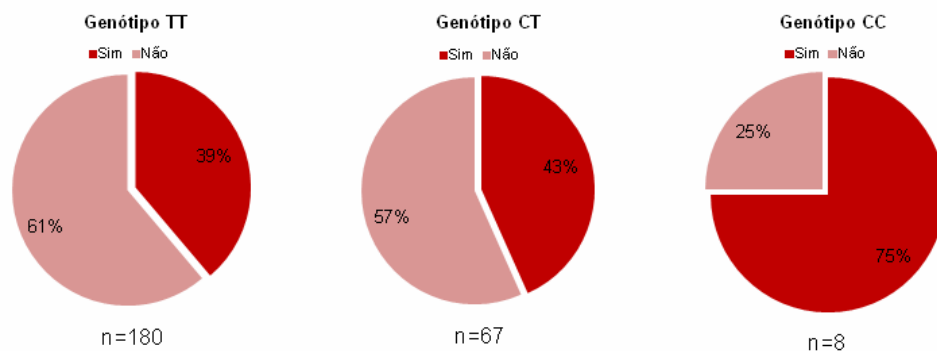
**Figura 5:** Associação entre níveis de hemoglobina e o polimorfismo T-5C de GPIb $\alpha$ . a) Efeito dos alelos de GPIb $\alpha$  sobre níveis de hemoglobina, sendo T o alelo selvagem e C o alelo mutado. b) Efeito dos genótipos de GPIb $\alpha$  sobre níveis de hemoglobina, sendo TT o genótipo homocigoto selvagem, CT o heterocigoto e CC o genótipo homocigoto mutado. \* $p<0,05$ ;



\*\* $p < 0,01$ . Os dados foram apresentados em gráficos do tipo *boxplot*, onde as extremidades das caixas representam os quartis Q1 e Q3 e a linha interna horizontal, a mediana; os traços indicam os limites inferior e superior; cada ponto representa a dosagem de um paciente, cuja concentração de hemoglobina ficou fora dos valores estabelecidos pelos limites superior ou inferior

O polimorfismo do gene de GPIIb $\alpha$  também influenciou nos valores de hematócrito (HTC) dos pacientes, tendo em vista que portadores do alelo T apresentaram média de HTC igual a 39,8%, enquanto a média para portadores do alelo C foi de 37,9%, sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa (Teste de Mann-Whitney;  $p = 0,0474$ ). A partir da análise multivariada, observou-se o efeito significativo do genótipo mutado CC de GPIIb $\alpha$  sobre HTC ( $p = 0,022$  para CC e  $p = 0,162$  para CT, quando comparados a TT; AIC=1580,8).

Quando avaliada a presença de anemia entre os pacientes com diferentes genótipos, verificou-se que 39% dos indivíduos carreadores do genótipo TT apresentaram anemia, 43% dos carreadores do genótipo CT eram anêmicos, seguido por 75% dos indivíduos com genótipo CC (Figura 6).



**Figura 6:** Associação entre anemia e o polimorfismo T-5C de GPIIb $\alpha$ . TT representa o genótipo selvagem, CT heterozigoto e CC homozigoto para a mutação estudada. Os critérios para anemia foram definidos como descrito no item 3.1 da Metodologia, sendo a presença (sim) e ausência (não) representadas em vermelho e rosa, respectivamente

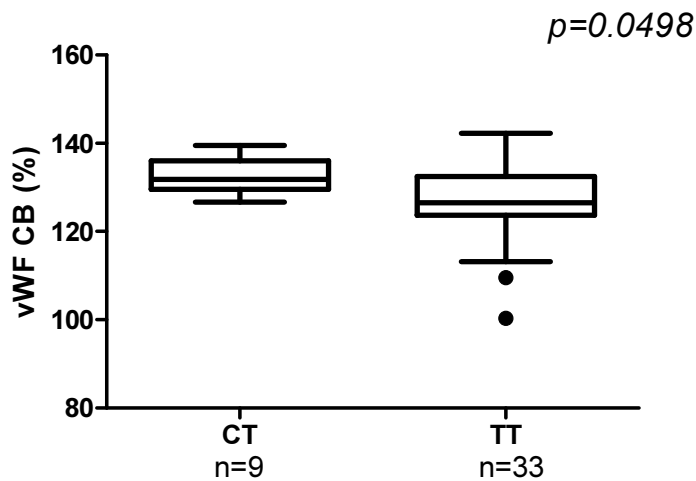
A partir da análise de regressão logística, foi possível demonstrar, ainda, que portadores do genótipo CT apresentaram cerca de duas vezes mais chance de desenvolver anemia, quando comparados aos pacientes com genótipo TT (*Odds Ratio* = 2,038; Intervalo de Confiança 95% = 1,039 – 3,996;  $p=0,038$ ).

Em conjunto, os resultados sugerem uma associação entre o polimorfismo T-5C no gene de GPIb $\alpha$  e alterações nos níveis de Hb, HTC e ocorrência de anemia em indivíduos infectados por *P. vivax*. Tendo em vista que o polimorfismo estudado implica em uma maior expressão do receptor GPIb $\alpha$  na superfície das plaquetas, fez-se necessário investigar se os níveis do seu principal ligante, o fator de von Willebrand (vWF), também estariam aumentados nos pacientes com a mutação T-5C.

#### **4.2.1 Níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (vWF) e da enzima ADAMTS-13**

No intuito de verificar se indivíduos infectados por *P. vivax* carreadores da mutação em GPIb $\alpha$  também apresentariam níveis alterados de vWF, foram dosados o vWF total plasmático, o vWF em sua forma ativa, bem como a atividade da enzima que cliva essa proteína, denominada ADAMTS-13. Tendo em vista que o grupo sanguíneo ABO poderia influenciar nos níveis de vWF, foram comparados os níveis dessa proteína em indivíduos categorizados como “O” e “não O”. Como no grupo de pacientes avaliados o tipo sanguíneo, o sexo e a idade não influenciaram nos níveis de vWF ( $p>0,05$  para todas as comparações realizadas), essas variáveis não foram consideradas nas análises posteriores.

A limitação de amostras e reagentes fez com que as dosagens pudessem ser realizadas em apenas um grupo representativo da população de estudo. Assim, foram incluídos 42 pacientes pareados por idade (mediana de 38 anos) com a população estudada. Os resultados das dosagens demonstraram que carreadores da mutação (CT,  $n=9$ ) apresentam níveis ligeiramente mais elevados de vWF em sua forma ativa, quando comparados aos indivíduos do grupo TT ( $n=33$ ) (Figura 7). No entanto, não foi detectada diferença nos níveis totais de vWF, ou mesmo na atividade de ADAMTS-13, entre os grupos estudados (dados não mostrados).



**Figura 7:** Associação entre vWF ativo e polimorfismo de GPIIb $\alpha$ . Os níveis de vWF em sua forma ativa refletem a capacidade da proteína de se ligar a colágeno (CB, *collagen binding*), relativa ao controle fornecido pelo ensaio de ELISA vWF:CB. Nos gráficos, as extremidades das caixas representam os quartis Q1 e Q3 e a linha interna horizontal, a mediana; os traços indicam os limites inferior e superior; cada ponto representa um paciente, cuja dosagem ficou fora dos valores estabelecidos pelos limites superior ou inferior

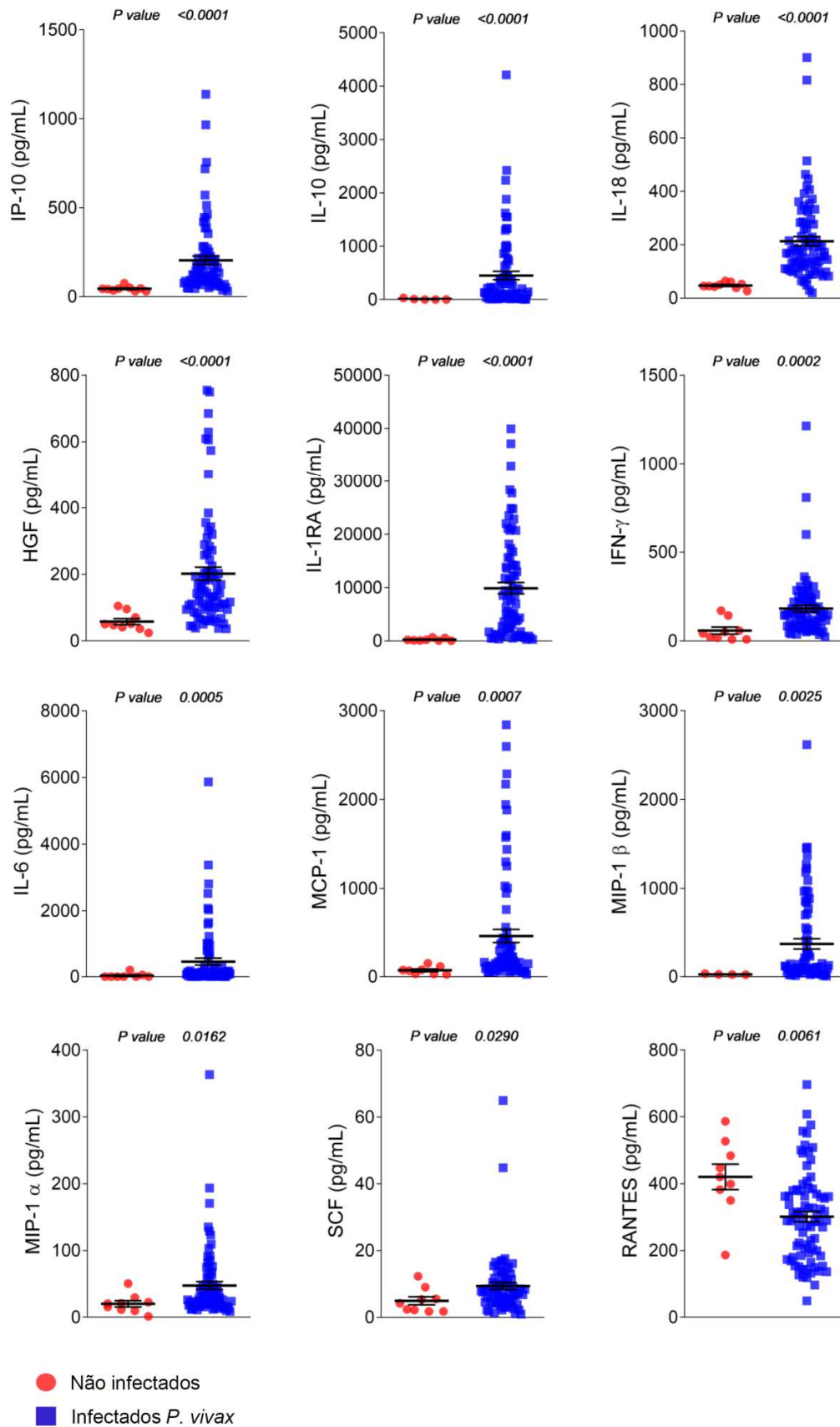
## PARTE II – Papel de mediadores inflamatórios e miRNAs plasmáticos na malária por *P. vivax*

### 4.3 Influência de mediadores inflamatórios nos parâmetros hematológicos associados à malária por *P. vivax*

A avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi realizada em uma amostra representativa da população estudada, constituída por 78 pacientes com malária aguda por *P. vivax*, pareados por idade com a população de estudo. Das 45 proteínas avaliadas, 11 (Tabela 4) apresentaram-se significativamente aumentadas nos indivíduos infectados, quando comparados aos indivíduos saudáveis e sem histórico de malária. Por outro lado, a quimiocina RANTES/CCL5 apresentou valores plasmáticos significativamente menores nos pacientes infectados por *P. vivax*, quando comparados aos indivíduos saudáveis. A Figura 8 ilustra a concentração plasmática de cada mediador nos grupos de pacientes e controles.

**Tabela 4:** Mediadores inflamatórios aumentados (↑) ou diminuídos (↓) nos pacientes infectados por *P. vivax*, quando comparados aos controles não expostos à malária

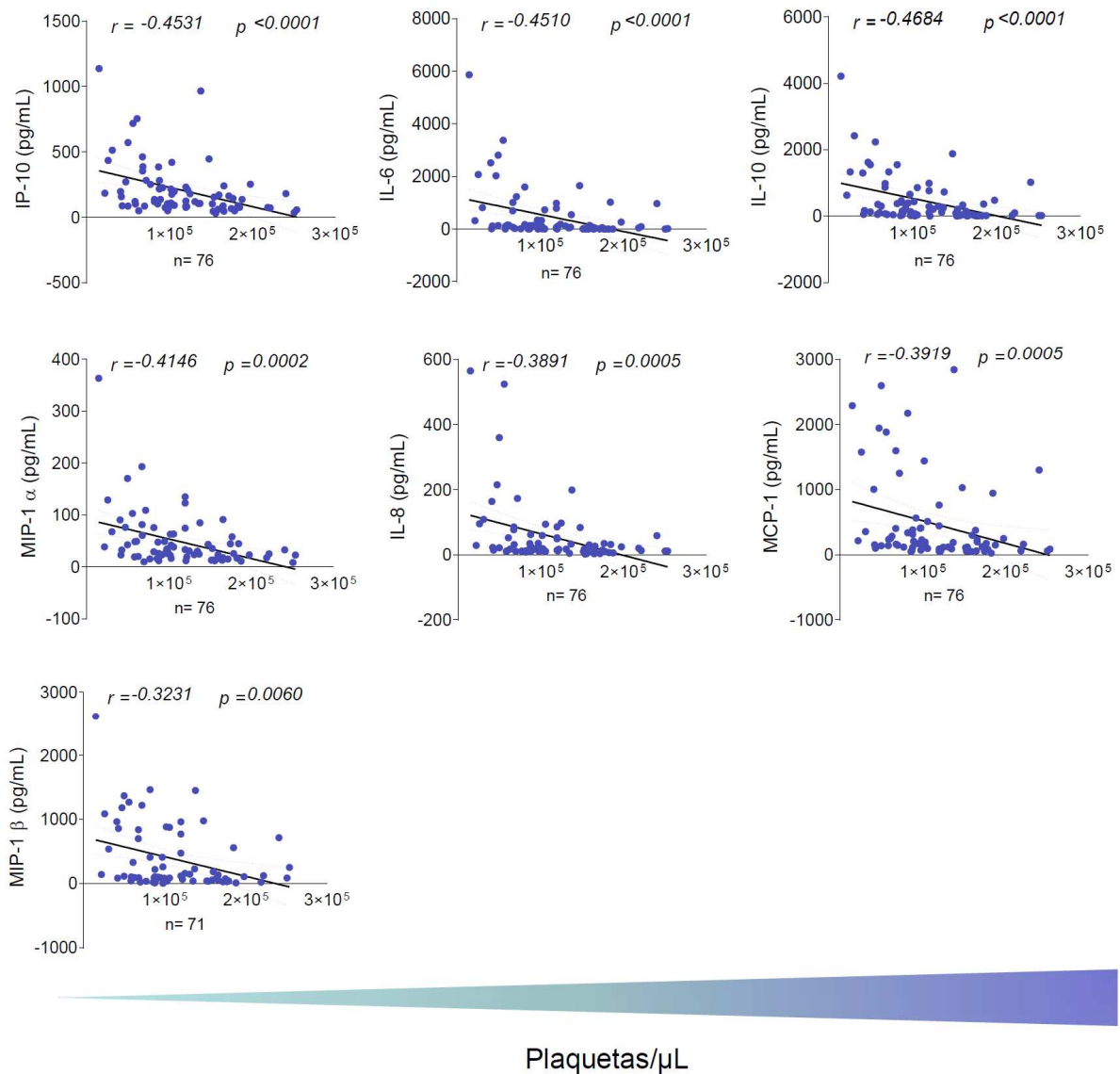
Classificação	Nome	Sinônimo
Quimiocinas	↑ IP-10 ( <i>Interferon gamma-induced protein 10</i> )	CXCL10
	↑ MCP-1 ( <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> )	CCL2
	↑ MIP-1 $\alpha$ ( <i>Macrophage inflammatory protein-1 <math>\alpha</math></i> )	CCL3
	↑ MIP-1 $\beta$ ( <i>Macrophage inflammatory protein-1 <math>\beta</math></i> )	CCL4
	↓ RANTES ( <i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> )	CCL5
Citocinas	↑ IL-10 ( <i>Interleukin 10</i> )	
	↑ IL-1RA ( <i>Interleukin-1 receptor antagonist</i> )	
	↑ IL-18 ( <i>Interleukin 18</i> )	
	↑ IFN- $\gamma$ ( <i>Interferon-gamma</i> )	
	↑ IL-6 ( <i>Interleukin 6</i> )	
	↑ SCF ( <i>Stem cell factor</i> )	
Fator de crescimento	↑ HGF ( <i>Hepatocyte growth factor</i> )	



**Figura 8:** Níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em pacientes com malária por *P. vivax* (n=78) e indivíduos saudáveis sem histórico de malária, provenientes de área

endêmica (n=9). Nos gráficos estão representados a média e o erro padrão. Dosagem realizada com o uso da plataforma Luminex

Em seguida, investigou-se a relação entre os níveis das proteínas avaliadas e parâmetros hematológicos frequentemente associados à malária por *P. vivax*, tais como trombocitopenia, leucopenia e baixos níveis de hemoglobina (Hb). Dessa forma, foi possível demonstrar que nos pacientes infectados por *P. vivax* o aumento progressivo na concentração plasmática de 14 mediadores inflamatórios foi acompanhado pela redução do número de plaquetas circulantes. A figura 9 ilustra os níveis de 7 desses mediadores – citocinas IL-6 e IL-10 e quimiocinas das subfamílias CXC (IP-10/CXCL10 e IL-8/CXCL8) e CC (MIP-1  $\alpha$ /CCL3, MIP-1  $\beta$ /CCL4 e MCP-1/CCL2) – que foram associados à redução da contagem plaquetária, mas não a outro parâmetro hematológico.

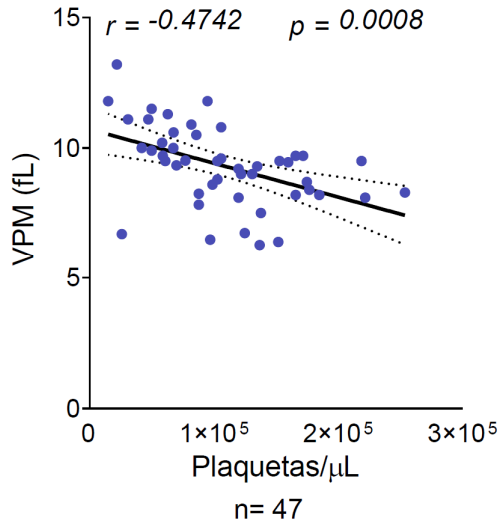


**Figura 9:** As concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 e de quimiocinas da subfamília CXC (IP-10/CXCL10 e IL-8/CXCL8) e CC (MIP-1  $\alpha$ /CCL3, MIP-1  $\beta$ /CCL4 e MCP-1/CCL2) se correlacionam inversamente com os níveis plaquetários em pacientes com malária por *P. vivax*

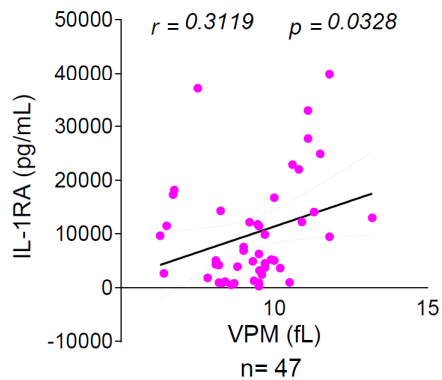
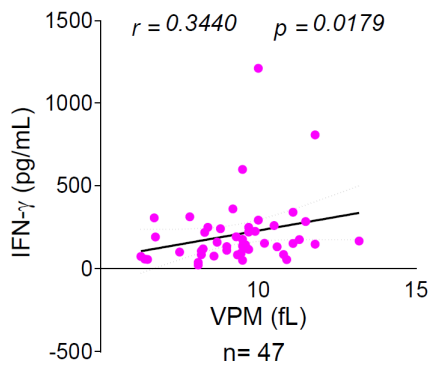
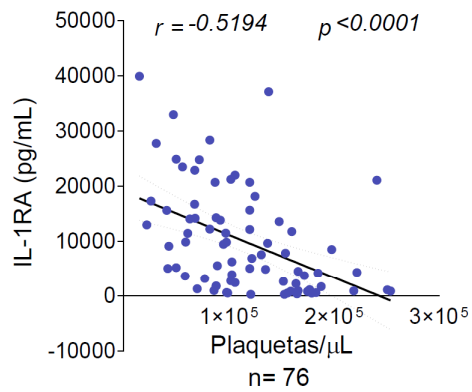
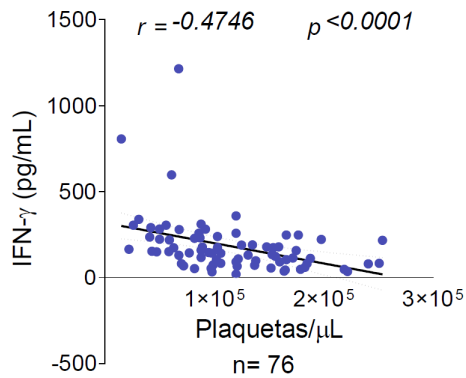
Tendo em vista que o volume plaquetário médio (VPM) pode ser indicativo da ativação de plaquetas, buscou-se, ainda, identificar a relação entre esse parâmetro, a contagem plaquetária e os níveis de moléculas inflamatórias nos indivíduos infectados. De fato, quanto maior o VPM, menor a quantidade de plaquetas circulantes nos pacientes (Figura 10a). Considerando-se as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento investigados, apenas os

níveis de IFN- $\gamma$  e IL-1RA (Figura 10b) aumentam em função da elevação do VPM ( $r = 0,344$ ,  $p = 0,02$  e  $r = 0,312$ ,  $p = 0,03$ , respectivamente).

a)



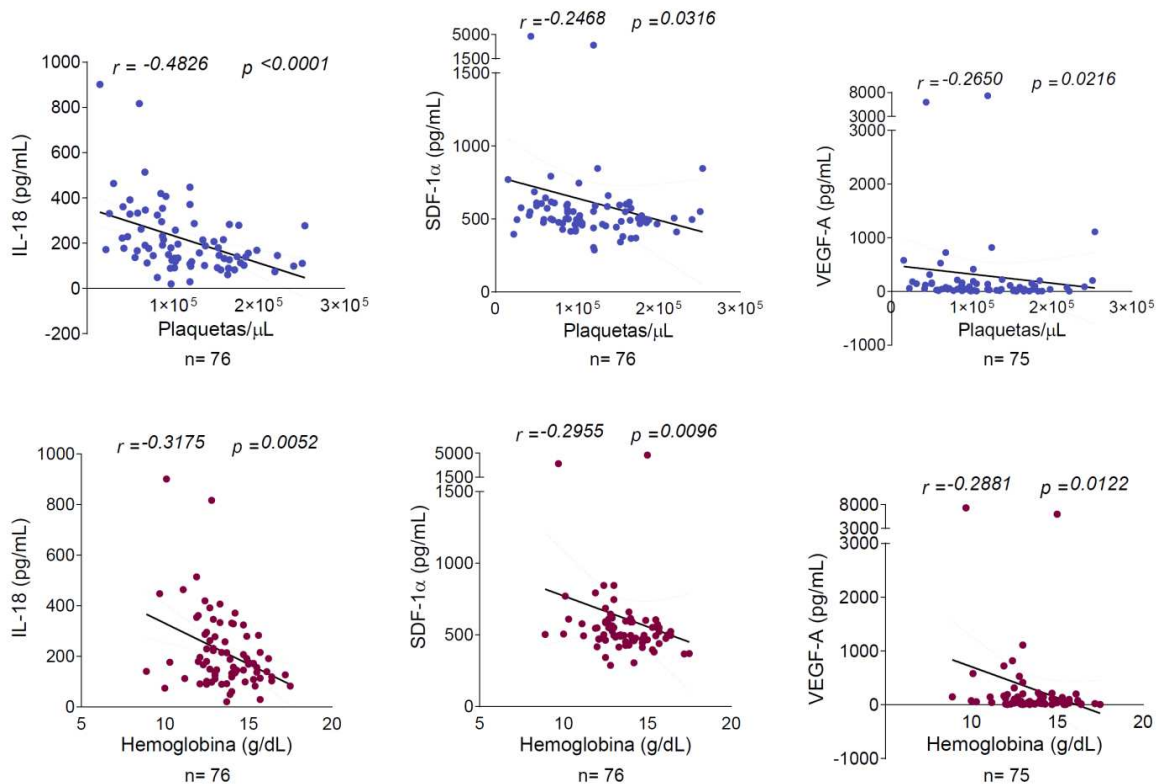
b)





**Figura 10:** Correlação entre plaquetas, VPM e citocinas. a) Nos pacientes infectados por *P. vivax*, o aumento do VPM está relacionado à redução da contagem de plaquetas. b) IFN- $\gamma$  e IL-1RA estão associados à diminuição do número de plaquetas e aumento do VPM

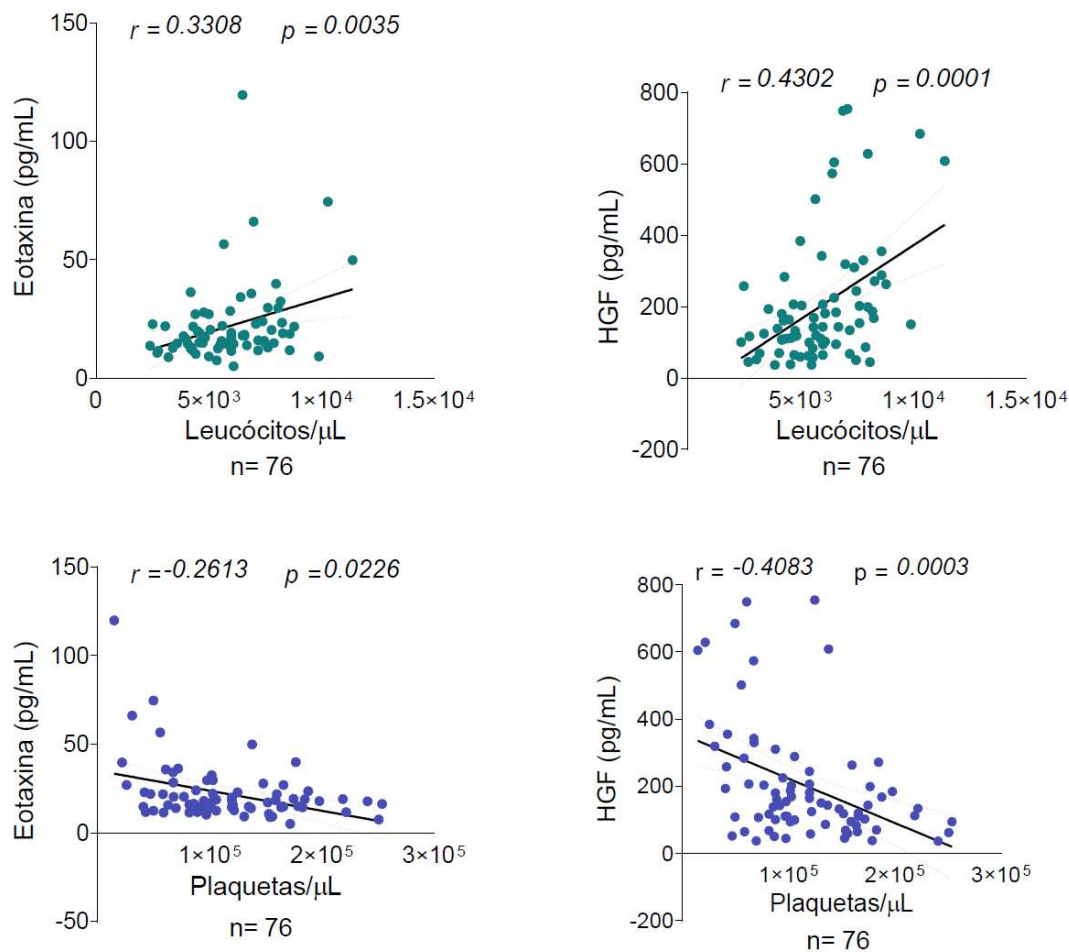
Além da associação com plaquetas e VPM, as concentrações plasmáticas de algumas proteínas também foram correlacionadas com outros parâmetros hematológicos. Nesse contexto, foi possível identificar 3 fatores associados a níveis plaquetários e Hb (Figura 11). Mais especificamente, observou-se que o aumento das concentrações plasmáticas de IL-18 ( $r = -0,483$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = -0,318$ ,  $p = 0,0052$ ), SDF-1 $\alpha$ /CXCL12a ( $r = -0,247$ ,  $p = 0,0316$ ;  $r = -0,3$ ,  $p = 0,0096$ ) e VEGF-A ( $r = -0,265$ ,  $p = 0,0216$ ;  $r = -0,288$ ,  $p = 0,0122$ ) está correlacionado com a diminuição da contagem de plaquetas e dos níveis de Hb.



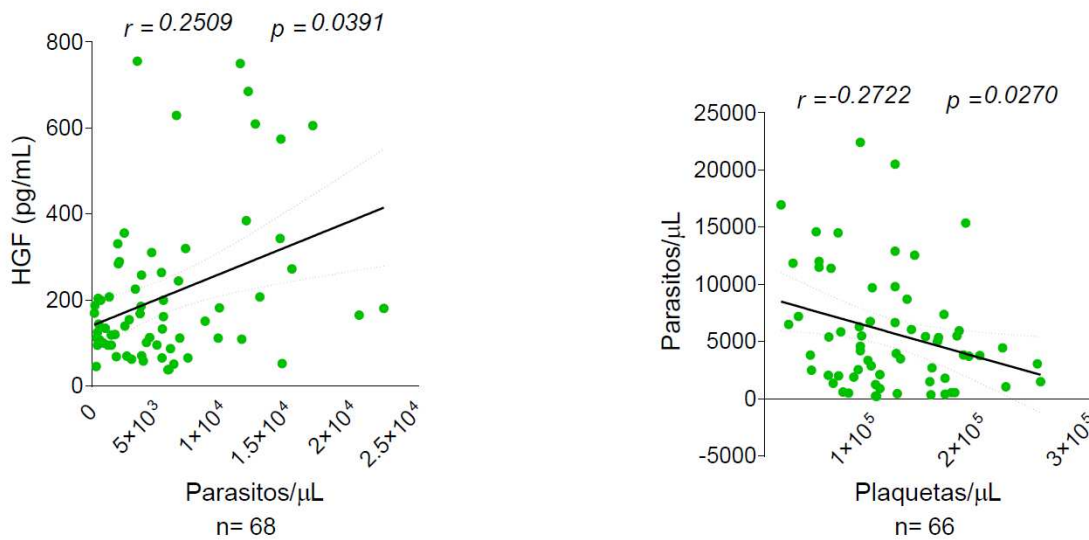
**Figura 11:** As concentrações plasmáticas de IL-18, SDF-1 $\alpha$  e VEGF-A se correlacionam inversamente com os níveis plaquetários e de Hb em pacientes infectados por *P. vivax*

No que diz respeito à contagem de leucócitos, verificou-se que os níveis da quimiocina eotaxina e de HGF estavam positivamente associados ao número dessas células no sangue ( $r=0,33$ ,  $p=0,0035$  e  $r=0,43$ ,  $p=0,0001$ , respectivamente), embora inversamente correlacionados com níveis plaquetários (eotaxina:  $r=-0,26$ ,  $p=0,0226$ ; HGF:  $r=-0,408$ ,  $p=0,0003$ ) (Figura 12).

Ainda sobre HGF, este fator de crescimento também se mostrou associado à parasitemia dos indivíduos infectados ( $r=0,25$ ,  $p=0,039$ ) que, por sua vez, se correlaciona com a diminuição dos níveis plaquetários ( $r=-0,272$ ,  $p=0,027$ ) (Figura 13).



**Figura 12:** As concentrações plasmáticas de eotaxina e HGF se correlacionam positivamente com o número de leucócitos e negativamente com a contagem de plaquetas no sangue periférico de pacientes infectados por *P. vivax*



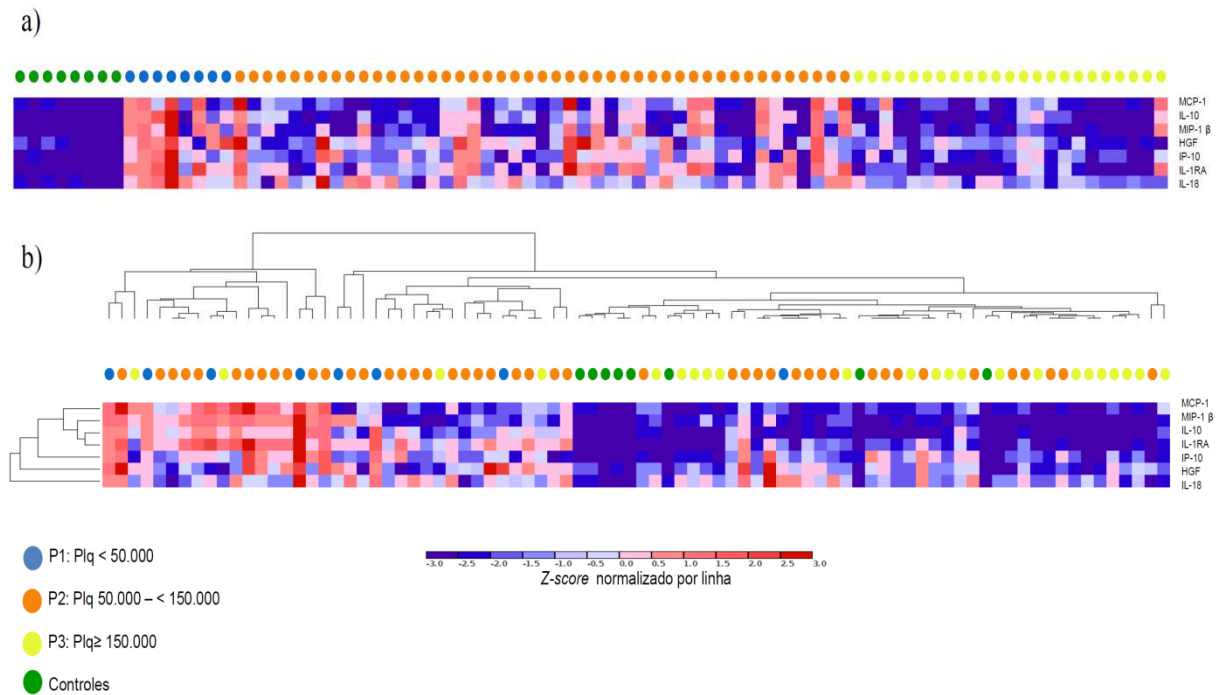
**Figura 13:** A concentração plasmática de HGF também está relacionada ao aumento da parasitemia que, por sua vez, está associada à diminuição da contagem plaquetária

#### 4.4 Concentração plasmática dos mediadores inflamatórios em pacientes categorizados de acordo com a presença ou ausência de trombocitopenia

Considerando-se o papel multifacetário das plaquetas na imunidade/inflamação e a forte correlação observada entre esses fragmentos celulares e as proteínas estudadas, buscou-se identificar mediadores inflamatórios capazes de diferenciar grupos de pacientes categorizados segundo seus níveis plaquetários. Para isso, os indivíduos infectados por *P. vivax* foram classificados em três categorias, sendo P1 os pacientes com trombocitopenia grave ( $< 50.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ); P2 os pacientes com trombocitopenia (de  $50.000$  a  $< 150.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ); e P3 os que apresentaram valor maior ou igual a  $150.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ . As comparações realizadas também incluíram indivíduos saudáveis (com contagem de plaquetas considerada dentro dos valores de referência). Para cada comparação realizada – como, por exemplo, controles versus pacientes; controles vs. P1; P1 vs. P3 – foram selecionados aqueles marcadores com *fold change* (FC) maior ou igual a 1,5 e valor de p corrigido menor que 0,05. Em seguida, foi realizado o agrupamento hierárquico com as proteínas selecionadas (Figuras 14 a 16).

Na comparação controles vs. pacientes, foram selecionados MCP-1, MIP-1  $\beta$ , IP-10, HGF, IL-10, IL-1RA e IL-18 (Figura 14a). O agrupamento hierárquico feito a partir desses

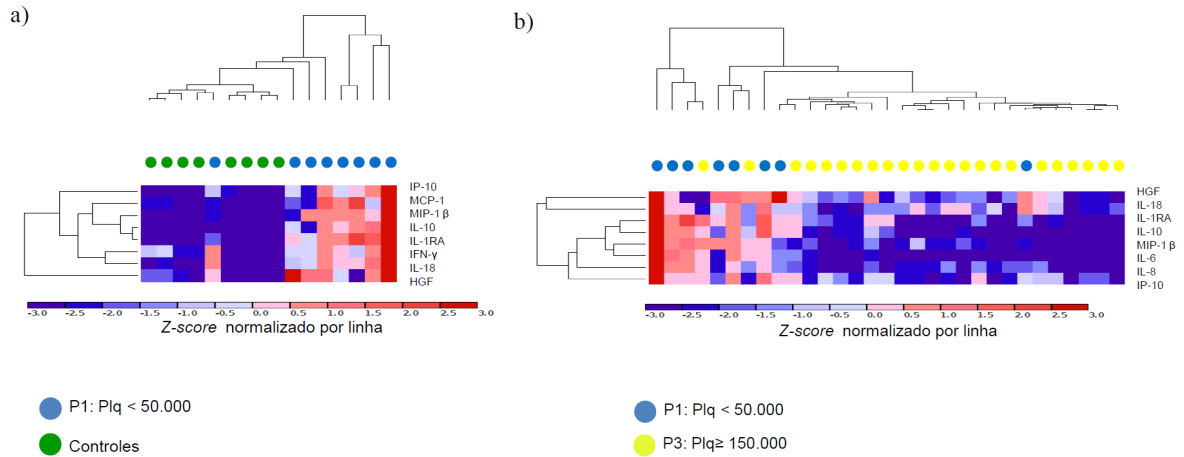
marcadores sugeriu proximidade entre os pacientes com trombocitopenia (P1 e P2) – os quais apresentaram modulação positiva (*upregulation*) das proteínas selecionadas – e maior distanciamento dos pacientes sem trombocitopenia (P3); estes, por sua vez, se agruparam mais próximos aos controles, que apresentaram modulação negativa (*downregulation*) dos níveis das proteínas estudadas (Figura 14b).



**Figura 14:** Proteínas diferencialmente detectadas nos plasmas de controles e pacientes infectados por *P. vivax*, com (P1 e P2) ou sem trombocitopenia (P3). a) Seleção de marcadores com *fold change* maior ou igual a 1,5 e valor de p corrigido menor que 0,05. b) Agrupamento hierárquico com as proteínas selecionadas, a partir do uso da plataforma de análise GenePattern (Broad Institute)

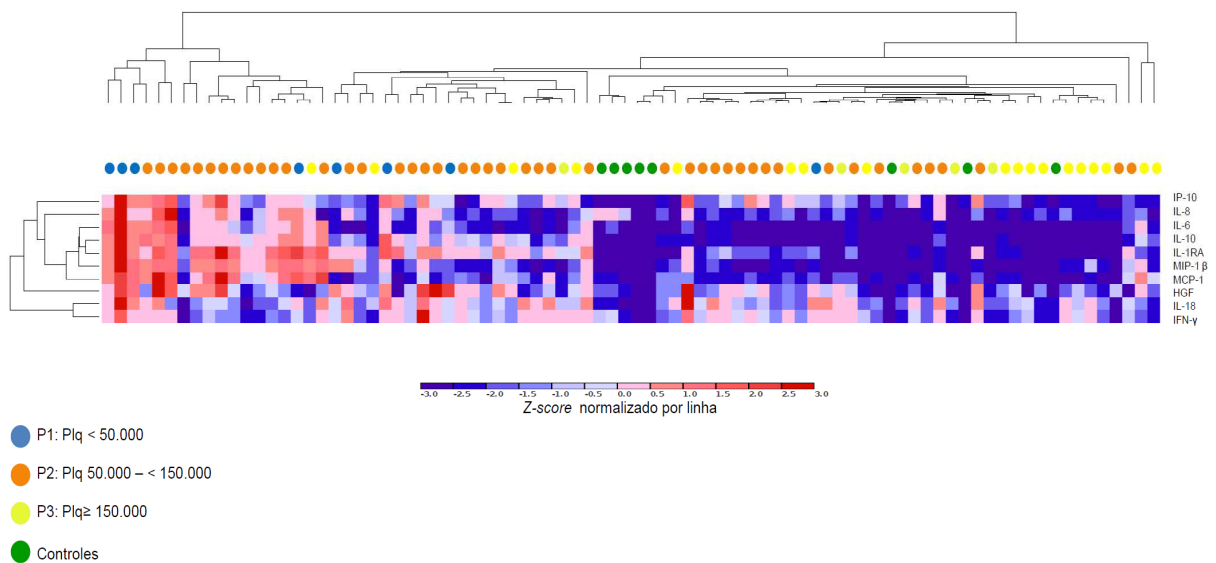
Na comparação entre os grupos controle vs. P1 (< 50.000 plaquetas/ $\mu$ L), foram selecionados MCP-1, MIP-1  $\beta$ , IP-10, HGF, IL-10, IL-1RA, IL-18 e IFN- $\gamma$  (dados não mostrados). A partir do agrupamento hierárquico, verificou-se que esses marcadores foram capazes de diferenciar, de maneira satisfatória, o grupo controle do grupo de pacientes com trombocitopenia grave, os quais apresentaram elevados níveis de proteínas (Figura 15a). Da mesma forma, os marcadores HGF, IL-18, IL-1RA, IL-10, IP-10, MIP-1  $\beta$ , IL-8 e IL-6

apresentaram-se aumentados em pacientes com trombocitopenia grave, e demonstraram-se úteis na separação de P1 ( $< 50.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) e P3 ( $\geq 150.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) (Figura 15b).



**Figura 15:** Proteínas diferencialmente detectadas em grupos de pacientes e controles. a) Agrupamento hierárquico para os grupos P1 e Controle. b) Agrupamento hierárquico para os grupos P1 e P3. O agrupamento hierárquico foi realizado como descrito na legenda da Figura 14

Finalmente, foi realizado o agrupamento hierárquico a partir das proteínas que se demonstraram diferencialmente detectadas em pelo menos uma das comparações realizadas (Figura 16). Observou-se que indivíduos com trombocitopenia grave (P1) foram caracterizados, em sua maioria, pela regulação positiva dos marcadores selecionados. Por outro lado, os controles se agruparam na parte central da figura, apresentando proximidade à maioria dos pacientes não trombocitopênicos (P3), cujos níveis de proteínas, de forma geral, encontram-se reduzidos. Os pacientes com trombocitopenia em grau variado (P2) se distribuíram ao longo da figura, mas muitos se agruparam próximo a pacientes com trombocitopenia grave (regulação positiva).



**Figura 16:** Proteínas diferencialmente detectadas em pelo menos uma das comparações realizadas entre pacientes (P1 a P3) e controles. O agrupamento hierárquico foi realizado como descrito na legenda da Figura 14

Considerando que a razão IFN- $\gamma$ /IL-10 parece ser um marcador de malária grave, podendo estar relacionada ao óbito de pacientes, buscou-se avaliar a razão entre essas duas citocinas nos pacientes categorizados de acordo com o nível plaquetário (Tabela 5). Na população de estudo, os indivíduos com trombocitopenia grave (P1) apresentaram a menor razão IFN- $\gamma$ /IL-10 (mediana: 0,2; IIQ: 0,15 – 0,76), bem como os maiores níveis de IFN- $\gamma$  (mediana: 265,5 pg/mL; IIQ: 158 – 333 pg/mL) e IL-10 (mediana: 1315 pg/mL; IIQ: 283 – 2222 pg/mL).

**Tabela 5:** Razão IFN- $\gamma$ /IL-10 em pacientes categorizados de acordo com o nível plaquetário

Parâmetro	P1 (n=8)	P2 (n=45)	P3 (n=23)	Controles (n=4)	p-value
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	265,5 (158 - 333)	153,6 (96 - 238)	107,3 (59 - 177)	101,1 (53 - 164)	0,0029§
IL-10 (pg/mL)	1315 (283 - 2222)	232 (71 - 694)	22 (14 - 147)	6 (2 - 26)	<0,0001□
IFN- $\gamma$ /IL-10	0,2 (0,15 - 0,76)	0,75 (0,19 - 1,96)	3,54 (0,47 - 7,22)	17,87 (5,68 - 59,12)	0,0004¥

Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil (IIQ)

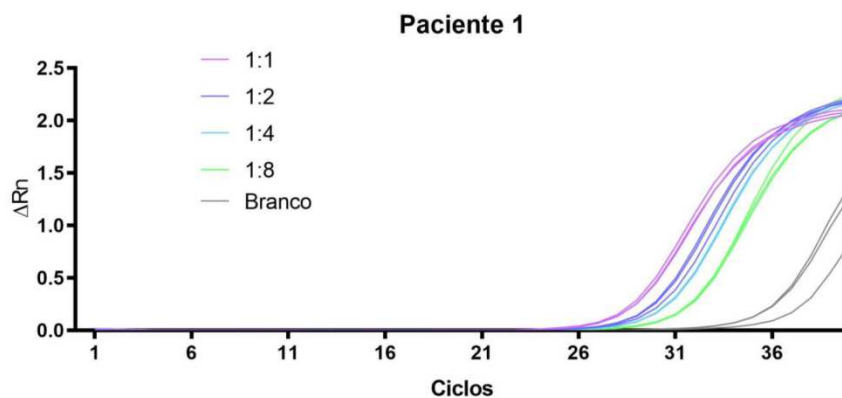
§ Apenas a comparação P1 x P3 foi significativa ( $p < 0,05$ )

□ As comparações P1 x P3; P1 x Controles; P2 x P3; P2 x Controles foram significativas

¥ As comparações P1 x P3; P1 x Controles; P2 x Controles foram significativas

#### 4.5 Caracterização de miRNAs plasmáticos em função dos níveis plaquetários de pacientes infectados por *P. vivax*

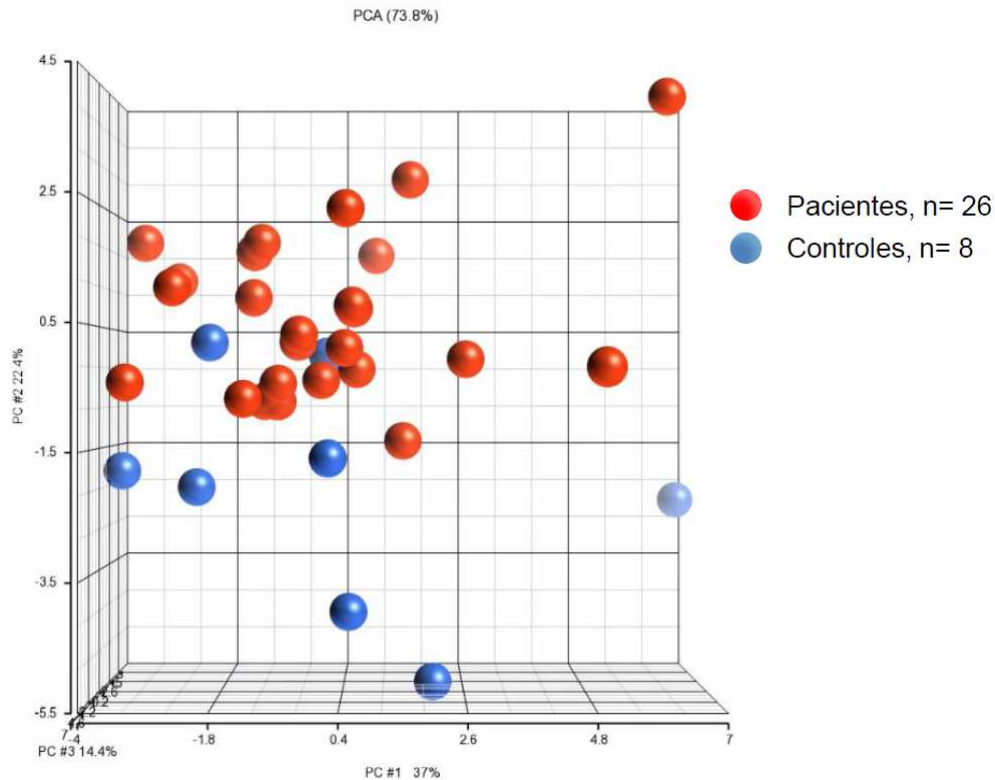
Em vista da importância dos miRNAs para a regulação de processos biológicos, incluindo a resposta inflamatória, foram avaliados os níveis de miRNAs encontrados no plasma de indivíduos infectados por *P. vivax*, categorizados como trombocitopênicos (P1 e P2) ou não (P3), conforme descrito anteriormente (item 4.4). A limitação de plasmas e reagentes disponíveis fez com que uma amostra representativa da população estudada fosse avaliada, constituída por 26 pacientes e 8 indivíduos saudáveis. No intuito de confirmar a presença de pequenos RNAs nas amostras, foi realizada, inicialmente, a amplificação de um alvo controle – pequeno RNA nuclear envolvido no processo de *splicing*, U6 (*U6* snRNA) – em amostras de pacientes e controles. A Figura 17 ilustra o resultado obtido para um paciente, confirmando a amplificação satisfatória de *U6* snRNA.



**Figura 17:** Amplificação do alvo *U6* snRNA, realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), em amostra de um paciente infectado por *P. vivax* (Paciente 1). O gráfico ilustra a magnitude do sinal de fluorescência ( $\Delta R_n$ , eixo y) versus o número de ciclos de amplificação (eixo x). O RNA foi utilizado em diluições sucessivas (1:1 a 1:8), a fim de se verificar a especificidade da amplificação do alvo

Na sequência, realizou-se a identificação e quantificação dos miRNAs plasmáticos, com o uso da plataforma multiplex de contagem digital baseada na tecnologia de *barcode* molecular de cores (nCounter®). Dos 800 miRNAs alvos avaliados, 17 foram identificados nas amostras estudadas (Apêndice 2). A análise de componentes principais (ACP) ilustra o

resultado das 34 amostras analisadas (Figura 18). Observa-se um agrupamento das amostras de pacientes, que aparentam estar mais relacionadas entre si, do que com as amostras de indivíduos não infectados.



**Figura 18:** Análise de Componentes Principais a partir dos dados obtidos por meio da plataforma multiplex nCounter® para 34 amostras plasmáticas, incluindo 26 pacientes infectados por *P. vivax* e 8 controles sem histórico de malária

Entre os miRNAs identificados, 6 encontram-se diferencialmente expressos em pelo menos uma das comparações realizadas entre pacientes (P1 a P3) e controles (Figura 19). O miR-520f-3p (pertencente ao *cluster* de miR-302c-3p) teve a expressão diminuída nos pacientes, quando comparados aos controles (pacientes vs. controles, FC= -1,6) (Figura 19). Considerando-se as comparações entre os grupos de pacientes com diferentes níveis plaquetários, observou-se um efeito inverso, sendo a maior expressão detectada nos pacientes com trombocitopenia grave (P1), quando comparados aos indivíduos infectados trombocitopênicos (P2, FC= 1,5) ou sem trombocitopenia (P3, FC= 2,1). De modo

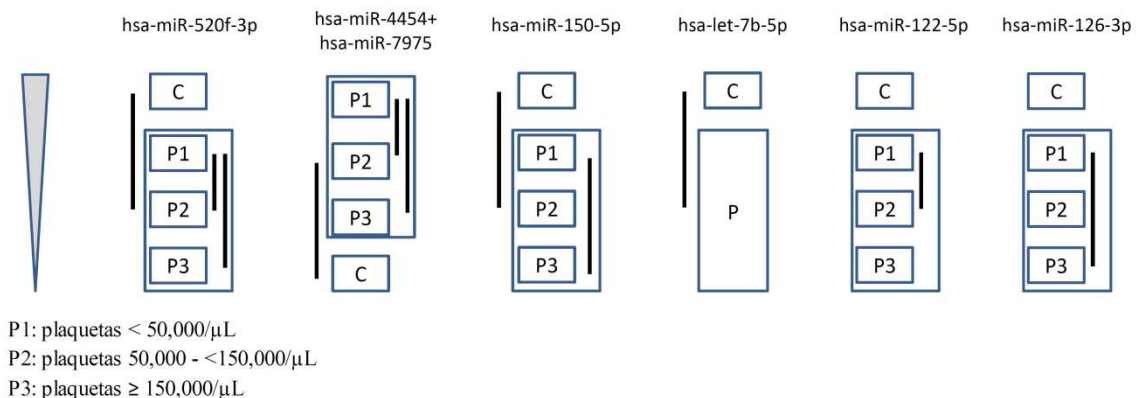


semelhante, o miR-150-5p também se apresentou com expressão diminuída nos pacientes (pacientes vs. controles, FC= -1,5); no entanto, pacientes com trombocitopenia grave apresentam maiores níveis de miR-150-5p que pacientes sem trombocitopenia (FC= 1,96).

Os miRNAs miR-4454 e miR-7975 – aqui denominados miR-4454+7975, por serem detectados pela mesma sonda – apresentaram maior expressão nos indivíduos infectados (pacientes vs. controles, FC= 1,96) e também em pacientes com trombocitopenia grave, quando comparados aos que tiveram apenas trombocitopenia (FC= 1,86) e aos não trombocitopênicos (FC= 2,56).

O miRNA let-7b-5p foi diferencialmente expresso apenas na comparação entre pacientes e controles, sendo que os pacientes apresentaram nível de expressão reduzido (FC= -2,05). Observou-se, ainda, que os níveis de miR-122-5p estão significativamente mais elevados em pacientes com trombocitopenia grave (P1 vs. P2, FC= 5,45), bem como miR-126-3p (P1 vs. P3, FC= 2,04).

miRNAs	Símbolos (IPA)	Pacientes x Controles		P1 X P2		P1 X P3	
		p-value	Fold Change	p-value	Fold Change	p-value	Fold Change
hsa-miR-520f-3p	miR-302c-3p	3,39E-03	-1,614	4,66E-02	1,497	4,03E-03	2,105
hsa-miR-4454+hsa-miR-7975	miR-4454; miR-7975	4,34E-02	1,957	6,06E-03	1,862	8,81E-04	2,563
hsa-miR-150-5p	miR-150-5p	2,90E-02	-1,536	1,26E-01	1,496	3,48E-02	1,961
hsa-let-7b-5p	let-7a-5p	3,04E-04	-2,055	2,16E-01	1,475	1,43E-01	1,676
hsa-miR-122-5p	miR-122-5p	2,40E-01	4,575	2,76E-02	5,449	1,44E-01	2,245
hsa-miR-126-3p	miR-126a-3p	7,01E-01	-1,09	1,68E-01	1,421	2,81E-02	2,041



**Figura 19:** Representação gráfica dos miRNAs diferencialmente expressos em grupos de pacientes (P1, P2 e P3) e indivíduos não infectados. Os valores de *fold change* (FC) positivos estão destacados em vermelho; os valores negativos, em verde; os valores em cinza não foram significativos ( $p > 0,05$ ). No esquema, as caixas representam os grupos comparados no estudo e os traços indicam diferença na expressão de miRNAs entre eles. A posição das caixas reflete

os níveis de determinado miRNA, em caso de diferença na sua expressão entre os grupos; dessa forma, caixas localizadas na parte superior da figura representam maiores níveis

A partir de dados disponíveis na literatura, buscou-se associar os miRNAs diferencialmente expressos a funções biológicas e/ou morbidades específicas (Tabela 6). Em especial, miR-150-5p destacou-se pelo grande número de funções biológicas às quais está associado no conjunto de dados. Dessa forma, verificou-se, por exemplo, que a ativação de linfócitos T, a resposta imune inata e também a adaptativa se encontram afetadas por miR-150-5p, especialmente quando são considerados os grupos pacientes versus controles e P1 versus P3. Ainda de acordo com a análise funcional realizada, os miRNAs miR-150-5p e miR-126-3p podem afetar os processos de inflamação e desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, o desenvolvimento de linhagens celulares eritroides pode estar mais elevado nos indivíduos infectados em relação aos controles, uma vez que let-7b-5p se encontra diminuído nos pacientes.

**Tabela 6:** Biofunções e doenças associadas aos miRNAs cuja expressão diferiu entre pacientes (P1, P2 e P3) e controles não infectados

Biofunções ou Doenças	miRNA	Pacientes grupo 1 x Referências		
		Pacientes grupo 2	Pacientes grupo 3	Referências
Ativação de linfócitos T	miR-150-5p	AFETADO	-	Tufekci et al., 2010 A autoimmune Dis
Resposta imune adaptativa	miR-150-5p	AFETADO	-	Tufekci et al., 2010 A autoimmune Dis
Apoptose de linhagens de céls. endoteliais	miR-150-5p	DIMINUÍDO	-	Yan et al., 2015 Circ Res
Viabilidade celular de linhagens de céls. endoteliais	miR-150-5p	AUMENTADO	-	Yan et al., 2015 Circ Res
Viabilidade celular de céls. endoteliais da microvasculatura	miR-150-5p	AUMENTADO	-	Fang et al., 2016 FASEB J
Resposta imune inata	miR-150-5p	AFETADO	-	Tufekci et al., 2010 A autoimmune Dis
Permeabilidade da barreira hematoencefálica	miR-150-5p	DIMINUÍDO	-	Fang et al., 2016 FASEB J
Permeabilidade de céls. endoteliais da microvasculatura	miR-150-5p	DIMINUÍDO	-	Fang et al., 2016 FASEB J
Produção de linfócitos B	miR-150-5p	-	-	Tufekci et al., 2010 A autoimmune Dis
Proliferação de linhagens de céls. endoteliais	miR-150-5p	AUMENTADO	-	Yan et al., 2015 Circ Res
Sepse	miR-150-5p	AFETADO	-	Vasilescu et al., 2009 PLoS One
Transição de pró-B linfócitos	miR-150-5p	-	-	Tufekci et al., 2010 A autoimmune Dis
Diferenciação de linfócitos B	miR-150-5p	-	-	Tufekci et al., 2010 A autoimmune Dis
Aterosclerose	miR-150-5p; miR-126-3p	-	-	Jamalhuddin et al., 2011 Expert Rev Mol Diagn
Inflamação de órgão	miR-150-5p; miR-126-3p	-	-	Zhang et al., 2010 Mol Cell
Câncer hematológico	miR-150-5p; miR-126-3p	-	-	Pandit et al., 2010 Am J Respir Crit Care Med
Angiogênese e de tumor	miR-122-5p	DIMINUÍDO	-	Dai et al., 2009 Rheumatol Int
Apoptose de linhagens de céls. de hepatoma	miR-122-5p	AUMENTADO	-	Votavova et al., 2011 J Hematol Oncol
Proliferação celular de linhagens de céls. de hepatoma	miR-122-5p	DIMINUÍDO	-	Ng et al., 2011 Blood
Concentração de colesterol	miR-122-5p	AUMENTADO	-	Tsai et al., 2009 Hepatology
Hiperlipidemia	miR-122-5p	AFETADO	-	Fornari et al., 2009 Cancer Res
Linfoma de Burkitt	let-7b-5p	AUMENTADO	-	Diao et al., 2010 Proteomics
Desenvolvimento de linhagens de céls. eritróides	let-7b-5p	DIMINUÍDO	-	Tsai et al., 2009 Hepatology
Desenvolvimento de céls. progenitoras mielóides	let-7b-5p	AUMENTADO	-	Diao et al., 2010 Proteomics
Dano de DNA	let-7b-5p	AFETADO	-	Guay et al., 2011 Transl Res
				Li et al., 2009 J Lipid Res
				Bueno et al., 2011 Blood
				Rowe et al., 2016 J Exp Med
				Rowe et al., 2016 J Exp Med
				Bueno et al., 2010 Mol Cell Biol

Pacientes grupo 1: plaquetas < 50,000/ $\mu$ L

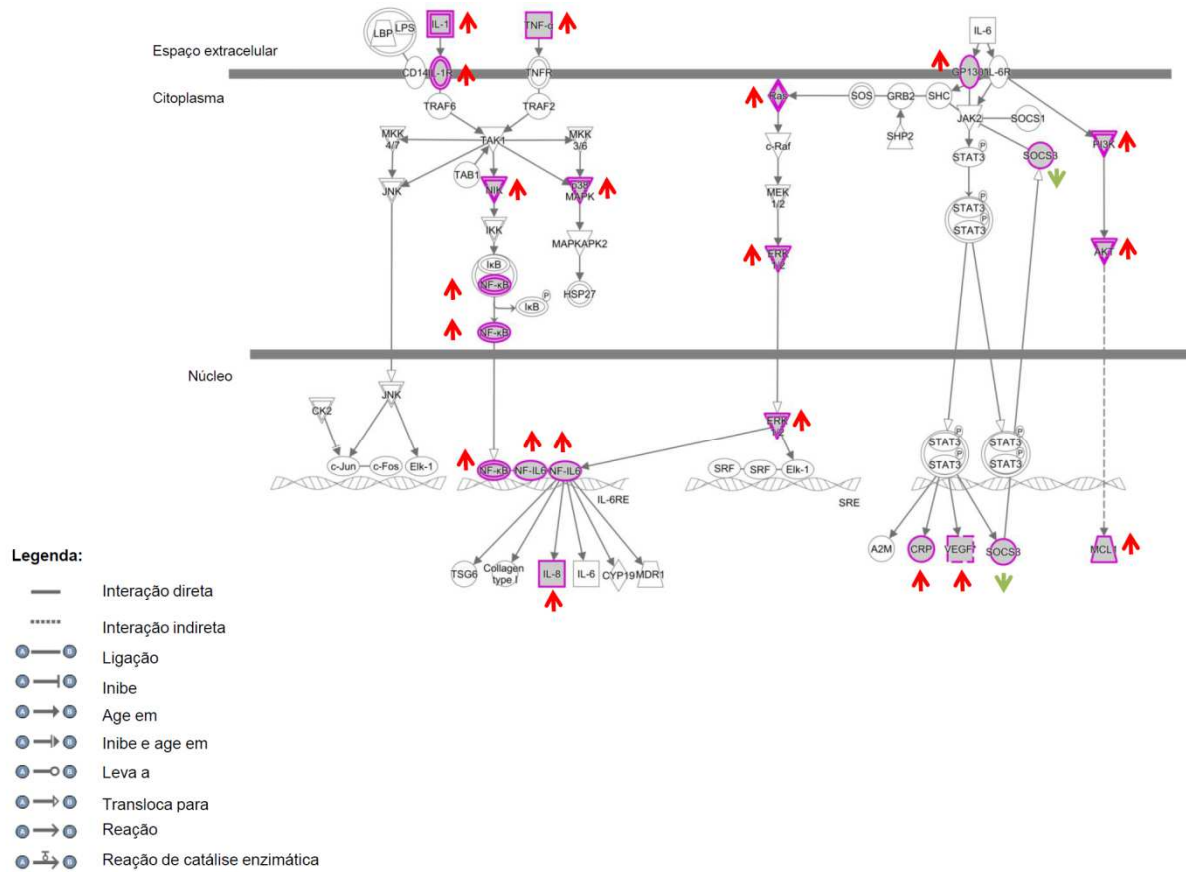
Pacientes grupo 2: plaquetas 50,000 - <150,000/ $\mu$ L

Pacientes grupo 3: plaquetas  $\geq$  150,000/ $\mu$ L

A análise funcional foi realizada com o uso do software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

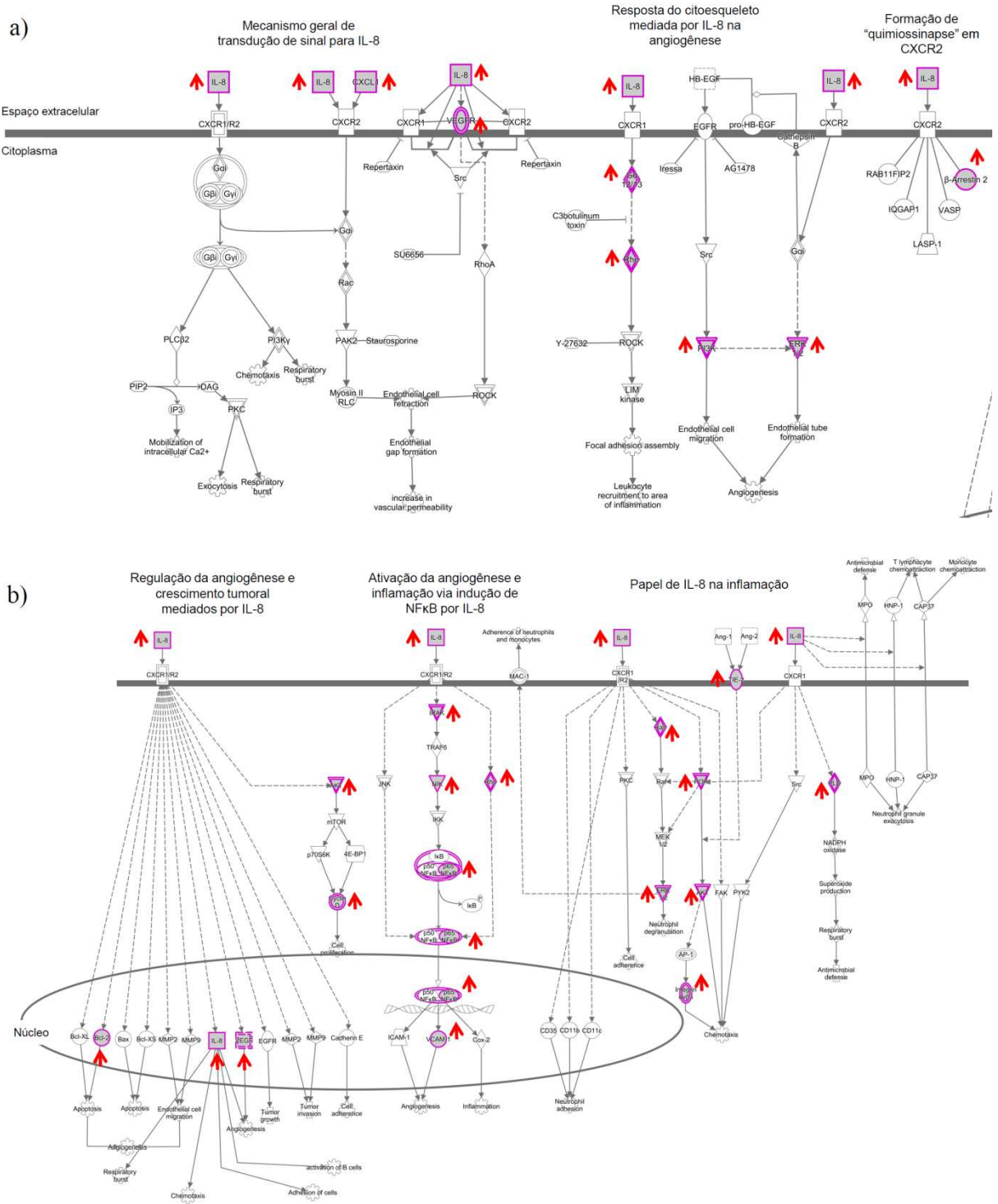
#### **4.6 Identificação de vias de sinalização associadas aos miRNAs diferencialmente expressos nos indivíduos estudados**

Os dados de miRNAs diferencialmente expressos permitiram identificar diversas vias canônicas com relevância para a resposta imune-inflamatória, muitas das quais envolvendo os mediadores inflamatórios aqui investigados (item 4.4). Para cada comparação entre grupos realizada, foram identificadas vias específicas (Apêndice 3). Como o objetivo do presente trabalho envolveu o estudo de proteínas inflamatórias e sua influência na coagulação e inflamação, ênfase foi dada a vias de sinalização que pudessem contribuir mais diretamente para esses processos (Figuras 20 a 22). Na comparação entre indivíduos com trombocitopenia grave (P1) e indivíduos não trombocitopênicos (P3), por exemplo, foi possível demonstrar que o conjunto de miRNAs caracterizados possivelmente influencia nas vias de sinalização de pelo menos três mediadores inflamatórios aqui estudados, sendo esses IL-6 (Figura 20), IL-8 (Figura 21) e IFN. Além disso, os microRNAs investigados também podem influenciar na sinalização de IL-10, citocina moduladora cujos níveis encontraram-se elevados nos pacientes (Figura 22).



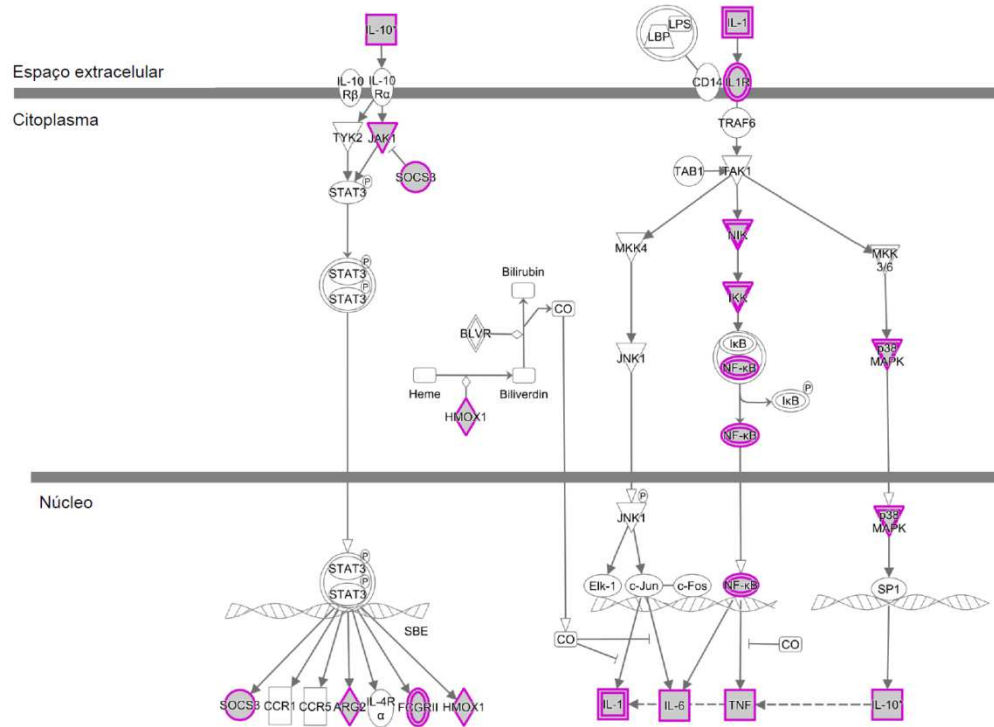
Retirado de Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

**Figura 20:** Via de sinalização de IL-6. A figura ilustra o papel central de IL-6 na resposta de fase aguda e inflamação. Todos os componentes da via em rosa são diretamente influenciados pelo conjunto de miRNAs estudados. Os componentes acompanhados de seta vermelha estão positivamente regulados, enquanto aqueles com seta verde estão negativamente regulados



Retirado de IPA

**Figura 21:** Via de sinalização de IL-8. a) Representação dos efeitos de IL-8 nos processos de aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação e angiogênese. b) Efeitos da sinalização de IL-8, com destaque para o seu papel na inflamação. Todos os componentes da via em rosa são diretamente influenciados pelo conjunto de miRNAs estudados. Os componentes em verde estão positivamente regulados



Retirado de IPA

**Figura 22:** Via de sinalização de IL-10. Tendo em vista o papel de IL-10 em limitar a resposta inflamatória, sua via de sinalização culmina na inibição de genes pró-inflamatórios, tais como *IL-1* e *TNF*. Todos os componentes da via em rosa são diretamente influenciados pelo conjunto de miRNAs estudados. Para essa via, não foi possível definir a regulação (positiva ou negativa) dos componentes

## **5 DISCUSSÃO**



Os resultados deste trabalho reforçam e complementam o complexo papel das plaquetas e sua relação com a inflamação frente à malária por *P. vivax*. De forma pioneira, foi demonstrado que a variabilidade genética de componentes associados ao inflamassoma pode contribuir para a patogênese da infecção por essa espécie de *Plasmodium*, com destaque para a associação de NLRP1 à queda dos níveis plaquetários. Mutações que levam a um ganho de função em NLRP1 estão associadas ao aumento da ativação do inflamassoma e, por consequência, à exacerbação da resposta inflamatória (Zhong *et al.*, 2016). Até o momento, os estudos em malária e inflamassoma têm auxiliado no entendimento do papel de NLRP3 durante a infecção (Strangward *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2018). No entanto, sabe-se que a ativação de NLRP1 é importante para o controle da densidade parasitária e para a resistência a outros protozoários como, por exemplo, *Toxoplasma gondii* (Zamboni e Lima-Junior, 2015), parasito intracelular obrigatório que também pertence ao filo Apicomplexa. Além disso, achados recentes sugerem associação entre polimorfismos de NLRP1 e manifestações graves da doença de Chagas (Clipman *et al.*, 2018), o que ressalta o potencial desse receptor como importante componente da inflamação em doenças infectoparasitárias.

Apesar de ter sido o primeiro membro da família NLRP a ser descrito, dados a respeito de padrões moleculares capazes de ativar NLRP1 ainda são limitados. De fato, a maior parte dos trabalhos em inflamassoma se dedica ao estudo de NLRP3 e, portanto, esse receptor tem papel mais bem estabelecido no contexto da inflamação (Cypryk *et al.*, 2018). Conseqüentemente, até o momento, é possível apenas especular os mecanismos pelos quais a ativação de NLRP1 pode contribuir para a trombocitopenia na malária causada por *P. vivax*. Tendo em vista que NLRP1 pode ser ativado por proteases que induzem a clivagem do seu domínio N-terminal, acredita-se que espécies de *Plasmodium* possam apresentar proteases capazes de ativar NLRP1 (Hayward *et al.*, 2018). Sendo assim, o presente trabalho abre novas possibilidades de investigação, sobretudo a respeito da relação entre NLRP1, inflamação e plaquetas na malária por *P. vivax*.

Ainda sobre o papel da variabilidade genética do hospedeiro frente à infecção por *P. vivax*, foi possível demonstrar que um polimorfismo do receptor plaquetário para vWF, a glicoproteína GPIIb/IIIa, parece estar associado à anemia induzida por *P. vivax*. A glicoproteína de superfície GPIIb/IIIa é responsável pela adesão inicial das plaquetas à parede vascular lesionada, mediada por sua interação com vWF, que leva à ativação plaquetária (Annarapu *et al.*, 2016). Estudos *in vivo* demonstram que o recrutamento de leucócitos para o sítio de lesão endotelial é favorecido pela interação de GPIIb/IIIa e a integrina leucocitária Mac-1, processo

capaz de amplificar a formação de trombo e a resposta pró-inflamatória (Wang, Y. *et al.*, 2017). Em decorrência disso, o polimorfismo de ganho de função do receptor plaquetário GPIIb/IIIa estudado poderia estar relacionado a um aumento da inflamação e a manifestações clínicas da malária por *P. vivax*.

De fato, na malária por *P. falciparum*, o endotélio ativado libera longos multímeros de vWF, os quais podem permanecer aderidos e se ligar rapidamente às plaquetas. Assim, eritrócitos infectados por *P. falciparum* se aderem às plaquetas, que formam uma ponte entre as células infectadas e o endotélio, podendo dificultar o fluxo sanguíneo e levar à anemia característica da infecção (Bridges *et al.*, 2010). Adicionalmente, o vWF em sua forma ativa, apresentando alta afinidade por plaquetas, está relacionado à ativação da cascata do complemento (Feng *et al.*, 2015). Na malária por *P. falciparum*, demonstrou-se que a ativação do complemento está associada à hemofagocitose, podendo levar à anemia nos pacientes infectados (Dasari *et al.*, 2014). Os resultados aqui encontrados reforçam esses achados anteriores, pois sugerem que a maior atividade de vWF nos portadores do alelo C para o polimorfismo de GPIIb/IIIa (T-5C) poderia contribuir para a anemia, em um mecanismo dependente do complemento. Sendo assim, o polimorfismo no gene de GPIIb/IIIa aparenta ser, de fato, um componente que pode promover o aumento da inflamação e morbidade na malária por *P. vivax*. No entanto, estudos envolvendo um maior número de indivíduos – incluindo pacientes com anemia grave – são necessários, a fim de confirmar se maiores níveis de vWF, que é um biomarcador de lesão endotelial e inflamação, poderiam explicar parte da anemia induzida pela infecção por *P. vivax*.

Em conjunto, os resultados apresentados vêm complementar o trabalho pioneiro que mostrou – em indivíduos infectados por *P. vivax* – a associação de um polimorfismo da integrina  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas a um aumento substancial na chance do desenvolvimento de trombocitopenia grave (Campos *et al.*, 2013).

A despeito dos vários estudos que investigaram os níveis de fatores solúveis – como citocinas e quimiocinas – durante a infecção malárica, ainda não há um consenso sobre o perfil desses mediadores e sua relação com as manifestações clínicas na malária por *P. vivax* (Hojo-Souza *et al.*, 2017). No presente trabalho, além de ampliar o número de mediadores investigados, buscou-se utilizar ferramentas de bioinformática que permitissem analisar com mais detalhes a relação entre as proteínas inflamatórias e a morbidade na infecção por *P. vivax*, particularmente no que se refere à trombocitopenia, manifestação frequente da doença.

Nesse sentido, realizou-se a dosagem de 45 proteínas, das quais 11 apresentaram-se significativamente aumentadas nos indivíduos infectados. Entre essas, encontram-se tanto mediadores pró-inflamatórios, como IP-10, IFN- $\gamma$ , IL-6, MCP-1, MIP-1  $\beta$  e MIP-1  $\alpha$ , quanto anti-inflamatórios, como é o caso de IL-10 e IL-1RA. Um perfil similar de mediadores – incluindo a coexistência de proteínas pró e anti-inflamatórias – foi recentemente descrito para uma doença viral caracterizada por trombocitopenia (*Severe fever with thrombocytopenia syndrome* – SFTS) (Hu *et al.*, 2018). De maneira geral, os resultados reforçam a importância do equilíbrio desses mediadores para a manutenção da homeostase, uma vez que a presença de elevados níveis de proteínas pró e anti-inflamatórias pode resultar na chamada “síndrome da paralisia imune”, possivelmente associada aos casos mais graves e óbitos por SFTS (Hu *et al.*, 2018). Embora o estudo aqui apresentado não tenha envolvido pacientes com malária grave, é possível que fenômeno semelhante à “síndrome da paralisia imune” também seja relevante na malária por *P. vivax*, contribuindo para a maior frequência de infecções secundárias que podem estar associadas aos quadros de pior prognóstico (Anstey *et al.*, 2009). Devido à importância dos resultados, estudos futuros que incluam pacientes com malária grave por *P. vivax* são necessários.

O único mediador inflamatório que se mostrou diminuído nos pacientes em relação aos controles foi RANTES. De interesse, essa quimiocina é abundante nas plaquetas e liberada em decorrência da ativação desses fragmentos celulares (Kameyoshi *et al.*, 1992). Nesse contexto, um estudo mais recente demonstrou que RANTES liberada por plaquetas ativadas se liga ao seu receptor em megacariócitos e induz a formação de novas plaquetas, em um processo de retroalimentação positiva (Machlus *et al.*, 2016). Tendo em vista que a trombocitopenia é comumente observada na malária e que a maior parte dos pacientes estudados possui baixos níveis plaquetários, é de se esperar que esse mediador inflamatório esteja mais elevado nos controles que nos indivíduos infectados por *P. vivax*. No entanto, na população estudada, não foi verificada correlação estatisticamente significativa entre os níveis de RANTES e a contagem de plaquetas (dados não mostrados).

Ao todo, 14 mediadores inflamatórios se mostraram associados aos níveis plaquetários dos pacientes. Observou-se que o aumento dessas proteínas foi acompanhado pela diminuição do número de plaquetas circulantes, reiterando a relação existente entre plaquetas e a resposta inflamatória decorrente da infecção. Entre os mediadores observados, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12a, VEGF-A e IL-18 mostraram-se associados a duas das principais alterações hematológicas da malária por *P. vivax*: redução dos níveis de hemoglobina (anemia) e da contagem de plaquetas

(trombocitopenia). As plaquetas ativadas são a maior fonte de SDF-1 $\alpha$  que, por sua vez, é liberada em decorrência da adesão de plaquetas à matriz subendotelial, em locais de dano vascular (Chatterjee e Gawaz, 2013). Ademais, essa quimiocina induz a agregação de plaquetas ativadas, capazes de liberar ainda mais SDF-1 $\alpha$ , podendo intensificar o quadro inflamatório e o desenvolvimento de complicações de ordem hematológica. VEGF, cuja função de aumentar a permeabilidade vascular foi previamente descrita, também é liberado por plaquetas, sendo que na malária por *P. falciparum* a ativação plaquetária parece associada aos níveis desse mediador (Brouwers *et al.*, 2014). Recentemente, foi mostrado que as plaquetas humanas também contêm transcritos para IL-18. Além disso, a ativação plaquetária pode contribuir para as concentrações dessa citocina no plasma (Allam *et al.*, 2017). Em resumo, os resultados sugerem que a atividade das plaquetas é capaz de modular determinados mediadores inflamatórios e, por consequência, auxiliar no desenvolvimento de complicações hematológicas durante a infecção.

Na malária, a trombocitopenia comumente observada parece ser compensada por um maior volume médio das plaquetas circulantes, como forma de preservar a homeostase e prevenir o sangramento (Coelho *et al.*, 2013). Esse fenômeno também foi visto na população estudada e refletiu, ainda, nos valores das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-1RA. IFN- $\gamma$ , que possui papel determinante no desenvolvimento da malária cerebral experimental (Villegas-Mendez *et al.*, 2017), e IL-1RA, que apresenta caráter modulador, tiveram seus níveis elevados em indivíduos com baixos níveis plaquetários. De forma oposta, esses mediadores foram positivamente correlacionados com o aumento do volume médio das plaquetas, parâmetro indicativo de ativação desses fragmentos celulares, em pacientes infectados por *P. vivax*.

A interação de plaquetas ativadas e leucócitos tem papel importante em processos inflamatórios, inclusive na malária (Boeltz *et al.*, 2017). Nesse contexto, os resultados aqui apresentados reforçam esses achados ao demonstrar que a quimiocina eotaxina/CCL11 e o fator de crescimento HGF se correlacionaram positivamente ao número de leucócitos dos pacientes. A eotaxina, cujo papel no recrutamento e ativação de eosinófilos é bem caracterizado, tem sido cada vez mais relacionada a outros aspectos da inflamação, podendo inclusive afetar células da vasculatura (Raghuraman *et al.*, 2017). No que diz respeito ao fator de crescimento de hepatócito, um estudo clássico de invasão de hepatócitos por *Plasmodium berghei* demonstrou que HGF é liberado durante a migração de esporozoítos no fígado e é essencial para o estabelecimento da infecção nesse órgão (Carrolo *et al.*, 2003). Considerando-se os pacientes envolvidos no presente trabalho, o aumento de HGF se mostrou

associado à elevação da parasitemia, sugerindo que esse fator também poderia auxiliar o desenvolvimento do parasito nas fases seguintes de seu ciclo. Além disso, o aumento da parasitemia se correlacionou com a diminuição das plaquetas. Essa observação está de acordo com achados recentes da literatura, de que plaquetas são capazes de controlar a parasitemia na infecção malárica, sendo o fenômeno mais pronunciado durante a infecção por *P. vivax* (Kho *et al.*, 2018).

Em vista do complexo papel desempenhado pelas plaquetas na infecção, evidenciado pelas diversas associações com proteínas inflamatórias, foram realizadas análises de agrupamento hierárquico que permitiram identificar mediadores capazes de diferenciar subgrupos de pacientes, classificados de acordo com seus níveis plaquetários. Os resultados obtidos sugerem que, de maneira geral, pacientes trombocitopênicos apresentam um perfil caracterizado tanto pelo aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como de anti-inflamatórios. Em contrapartida, pacientes não trombocitopênicos e indivíduos não infectados tendem a se agrupar e apresentar níveis reduzidos dessas proteínas. Dessa forma, esses achados estão de acordo com a hipótese de que elevadas concentrações plasmáticas de determinados mediadores pró e anti-inflamatórios podem comprometer a homeostase e levar a complicações clínicas na malária por *P. vivax*. Adicionalmente, o presente trabalho identificou um grupo de mediadores que estão possivelmente mais associados a esse fenômeno.

Estudos recentes têm sugerido que a razão IFN- $\gamma$ /IL-10 poderia ser utilizada como um biomarcador de malária grave por *P. vivax*, com um prognóstico de evolução para óbito (Cruz *et al.*, 2018). No presente estudo, essa relação com maior morbidade da malária por *P. vivax* não pode ser comprovada. Pelo menos dois fatores, não mutuamente exclusivos, podem ter contribuído para a discrepância de resultados. Primeiro, a população aqui estudada não envolveu pacientes com malária grave, os quais foram avaliados por Cruz e colaboradores (2018). A segunda possibilidade seria a de que as diferentes metodologias empregadas para dosagem das citocinas em cada um dos estudos podem ter influenciado nos resultados, visto que o desempenho dos ensaios não é equivalente (Moncunill *et al.*, 2013).

Os dados aqui encontrados, demonstrando a presença concomitante de altas concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  e IL-10 na infecção por *P. vivax*, estão de acordo com achados em malária por *P. falciparum* (Mooney *et al.*, 2018), que também foram obtidos a partir de ensaio baseado na tecnologia Luminex. Os autores sugeriram, ainda, que a hemólise

persistente observada na malária, mesmo em infecções subclínicas, pode ser parcialmente explicada pelas elevadas concentrações de IL-10, que levam à liberação da enzima heme oxigenase-1, tornando o paciente mais susceptível a infecções secundárias (Mooney *et al.*, 2018). No grupo de pacientes aqui estudados, a ausência de indivíduos com anemia grave pode ter mascarado uma possível associação entre níveis de IL-10 e anemia. Não obstante, elevados níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 foram associados a um fenótipo de trombocitopenia grave. Além disso, a redução nos níveis de IL-10 foi mais acentuada que a diminuição de IFN- $\gamma$ , à medida que se observou o aumento do número de plaquetas; o que explicaria a maior razão IFN- $\gamma$ /IL-10 em pacientes não trombocitopênicos.

Diversos processos biológicos, incluindo a produção de citocinas e regulação da resposta imune-inflamatória, podem sofrer influência de miRNAs (Garavelli *et al.*, 2018). As plaquetas e as microvesículas liberadas pelas mesmas são importantes fontes de miRNAs, os quais podem circular pela corrente sanguínea de forma estável. Além de carregadas por microvesículas, as moléculas de miRNA plasmáticas podem estar ligadas a proteínas, ou mesmo associadas a HDL (*high density lipoprotein*) (Pordzik *et al.*, 2018). Em especial, Arroyo e colaboradores demonstraram a presença, no plasma, de miRNAs livres de vesículas e ligados a Ago2 (*Argonaute2*), proteína efetora chave no silenciamento mediado por miRNA (Arroyo *et al.*, 2011). Devido ao amplo potencial biológico das moléculas de miRNA circulantes, aliado ao crescente uso das mesmas como poderosos biomarcadores de várias doenças (Huang, 2017; Vishnoi e Rani, 2017), buscou-se caracterizar o perfil de miRNAs plasmáticos na malária por *P. vivax*. Ao todo, seis miRNAs (miR-520f-3p; miR-4454+7975; miR-150-5p; let-7b-5p; miR-122-5p e miR-126-3p) foram diferencialmente expressos em pelo menos um dos subgrupos estudados, incluindo pacientes com diferentes níveis plaquetários e controles saudáveis. De grande importância, os miRNAs identificados estão relacionados a diferentes processos biológicos, incluindo a diferenciação de células sanguíneas. Assim, miRNAs da família let-7, como let-7b-5p, estão envolvidos na regulação da hematopoiese (Lee *et al.*, 2016; Rowe *et al.*, 2016). Por outro lado, os miRNAs investigados também têm sido associados a processos patológicos relevantes, que incluem doenças autoinflamatórias (Amarilyo *et al.*, 2018) e mecanismos de morte celular (Nakamura *et al.*, 2016). Em pacientes com osteoartrite, por exemplo, o aumento da expressão de miR-4454 foi indicativo de gravidade, promovendo inflamação e destruição de células da cartilagem (Nakamura *et al.*, 2016).

Entre os miRNAs diferencialmente expressos, destaca-se o miR-150-5p, cuja função em tipos diversos de câncer, bem como na hematopoiese normal e patológica, tem sido bastante explorada (He *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2019). Essa dualidade de atuação dos miRNAs, como é o caso de miR-150-5p que atua tanto em processos fisiológicos como patológicos, pode explicar, em parte, os resultados aqui observados. De fato, os níveis plasmáticos de miR-150-5p se encontraram diminuídos nos pacientes infectados por *P. vivax* – quando comparados aos controles – porém se mostraram aumentados nos pacientes com trombocitopenia grave. Em vista da complexidade de ação desse miRNA, que aparenta estar regulado de formas distintas em processos relevantes para a malária, como a cascata de coagulação e resposta imune, não é possível, neste momento, estabelecer relações de causa e efeito. O diversificado papel de miR-150-5p pode ser ilustrado pela sua capacidade de influenciar múltiplos tipos celulares, que incluem células endoteliais (Fang *et al.*, 2016), células T CD8 de memória (Chen *et al.*, 2017), linfócitos B (Tufekci *et al.*, 2010) e megacariócitos (Lu *et al.*, 2008).

Um trabalho recente envolvendo camundongos com sepse demonstrou que miRNAs, incluindo alguns aqui identificados (miR-150-5p, miR-126-3p e miR-122-5p), estavam altamente expressos em microvesículas circulantes (Xu *et al.*, 2018). Os autores reportaram ainda que células do sistema imune, quando estimuladas com essas microvesículas, apresentaram aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6. Dessa forma, esses achados reforçam o trabalho previamente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisas, onde foi possível demonstrar que elevados níveis plasmáticos de micropartículas circulantes, de origem plaquetária ou leucocitária, estavam associados às manifestações clínicas da malária por *P. vivax* (Campos *et al.*, 2010). Portanto, não se pode descartar a hipótese de que os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com trombocitopenia grave sejam transportados por vesículas e, conseqüentemente, contribuam para a amplificação da inflamação associada à malária por *P. vivax*. Em particular, miR-126-3p representa um dos mais abundantes miRNAs em plaquetas e em suas microvesículas, além de estar associado à ativação plaquetária (Pordzik *et al.*, 2018).

Diante da complexidade de interações existentes entre os miRNAs investigados e processos associados ao desenvolvimento da infecção, buscou-se identificar vias de sinalização diretamente influenciadas por essas moléculas. Entre as muitas vias identificadas, corroborando os resultados obtidos para citocinas, os processos de sinalização de IL-6 e IL-8 se mostraram ativos na comparação entre pacientes com trombocitopenia grave e sem

trombocitopenia. IL-6 é produzida em resposta a infecções e lesões teciduais, contribuindo para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de resposta de fase aguda. Apesar de sua expressão ser rigorosamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a síntese contínua de IL-6 pode levar a efeitos patológicos relacionados à inflamação. Sendo assim, o processo de sinalização de IL-6 induz a produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa (CRP), além do aumento de VEGF capaz de promover angiogênese e permeabilidade vascular (Tanaka *et al.*, 2015). De forma complementar, IL-8 representa um importante mediador pró-inflamatório, responsável pelo recrutamento de linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Chen *et al.*, 2018). A sinalização de IL-8 e seus efeitos sobre a angiogênese, permeabilidade vascular e inflamação são mediados pela interação dessa quimiocina com seus receptores CXCR1 e CXCR2 (Ha *et al.*, 2017).

Além das vias de IL-6 e IL-8, a sinalização de IL-10, que apresenta função reguladora nos processos inflamatórios, foi importante na comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis. Dessa forma, sabendo-se que o conjunto de miRNAs do hospedeiro é capaz de modular vias de sinalização importantes para a malária por *P. vivax*, este trabalho apresenta novas possibilidades de estudo no campo da patogenia, inclusive com a identificação de possíveis alvos terapêuticos para o controle da morbidade associada à infecção.



## **6 CONCLUSÕES**

Na população de estudo, os resultados alcançados permitiram concluir que:

1. A variabilidade genética de componentes associados ao inflamassoma, particularmente NLRP1, contribui para alterações hematológicas comumente observadas na infecção e, portanto, para a patogênese da malária por *P. vivax*;
2. O polimorfismo genético do receptor plaquetário para o fator de von Willebrand (GPIb $\alpha$ ) tem influência na anemia causada por *P. vivax*, possivelmente por mecanismo envolvendo a forma ativa de vWF no plasma de pacientes;
3. A malária não complicada por *P. vivax* é caracterizada pelo aumento significativo na concentração plasmática de mediadores pró e anti-inflamatórios, indicando comprometimento da homeostase;
4. MicroRNAs de importância clínica, tais como miR-520f-3p, miR-4454+7975, miR-150-5p, let-7b-5p, miR-122-5p e miR-126-3p, encontram-se diferencialmente expressos no plasma de pacientes com malária por *P. vivax*, podendo ser indicativos de comprometimento da cascata de coagulação-inflamação;
5. Os níveis dos microRNAs diferencialmente expressos podem influenciar importantes vias de sinalização relacionadas à resposta imune-inflamatória na malária por *P. vivax* e, portanto, contribuir para a patogênese da infecção.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 7, n. 9, Sep 1 2017. ISSN 2157-1422 (Electronic)

ADAPA, S. R. et al. *Plasmodium vivax* readiness to transmit: implication for malaria eradication. **BMC Syst Biol**, v. 13, n. 1, p. 5, Jan 11 2019. ISSN 1752-0509 (Electronic)

AFSHAR-KHARGHAN, V. et al. Kozak Sequence Polymorphism of the Glycoprotein (GP) Iba Gene Is a Major Determinant of the Plasma Membrane Levels of the Platelet GP Ib-IX-V Complex. **Blood**, v. 94, n. 1, 1999

AGGREY, A. A. et al. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. **J Immunol**, v. 190, n. 9, p. 4685-91, May 01 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)

ALEXANDRE, M. A. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1611-4, Oct 2010. ISSN 1080-6059 (Electronic)

ALLAM, O. et al. Differential synthesis and release of IL-18 and IL-18 Binding Protein from human platelets and their implications for HIV infection. **Cytokine**, v. 90, p. 144-154, Feb 2017. ISSN 1096-0023 (Electronic)

AMARILYO, G. et al. Analysis of microRNAs in familial Mediterranean fever. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197829, 2018. ISSN 1932-6203

ANDRADE, B. B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malar J**, v. 9, p. 13, Jan 13 2010. ISSN 1475-2875 (Electronic)

ANNARAPU, G. K. et al. Inhibition of Hb Binding to GP1balph Abrogates Hb-Mediated Thrombus Formation on Immobilized VWF and Collagen under Physiological Shear Stress. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0154276, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)

ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 5, p. 220-7, May 2009. ISSN 1471-5007

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Front Immunol**, v. 5, p. 491, 2014. ISSN 1664-3224 (Print)

ARROYO, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 12, p. 5003-8, Mar 2011. ISSN 1091-6490

BARBER, B. E. et al. Parasite Biomass-Related Inflammation, Endothelial Activation, Microvascular Dysfunction and Disease Severity in Vivax Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004558, 2015. ISSN 1553-7374

BELLO, R. J. et al. Venezuela's health-care crisis. **Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 551, Aug 5 2017. ISSN 1474-547X (Electronic)

BOELTZ, S. et al. Neutrophil Extracellular Traps Open the Pandora's Box in Severe Malaria. **Front Immunol**, v. 8, p. 874, 2017. ISSN 1664-3224

BOILARD, E. Platelet-Derived Interleukin-1beta Fuels the Fire in Blood Vessels in Systemic Lupus Erythematosus. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 37, n. 4, p. 607-608, Apr 2017. ISSN 1524-4636 (Electronic)

BOURGARD, C. et al. Plasmodium vivax Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, p. 34, 2018. ISSN 2235-2988 (Electronic)

BRIDGES, D. J. et al. Rapid activation of endothelial cells enables Plasmodium falciparum adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings. **Blood**, v. 115, n. 7, p. 1472-4, Feb 2010. ISSN 1528-0020

BROUWERS, J. et al. Platelet activation determines angiopoietin-1 and VEGF levels in malaria: implications for their use as biomarkers. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64850, 2014. ISSN 1932-6203

CAMPOS, F. M. et al. Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. **Malar J**, v. 9, p. 327, Nov 16 2010. ISSN 1475-2875 (Electronic)

CAMPOS, F. M. et al. Genetic variability in platelet integrin alpha2beta1 density: possible contributor to Plasmodium vivax-induced severe thrombocytopenia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 2, p. 325-8, Feb 2013. ISSN 1476-1645 (Electronic)

CARROLO, M. et al. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. **Nat Med**, v. 9, n. 11, p. 1363-9, Nov 2003. ISSN 1078-8956

CARVALHO, B. O. et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **J Infect Dis**, v. 202, n. 4, p. 638-47, Aug 15 2010. ISSN 1537-6613 (Electronic)

CERAVOLO, I. P. et al. Inhibitory properties of the antibody response to Plasmodium vivax Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 3, p. 270-8, Mar 2008. ISSN 1365-3083 (Electronic)

CHAMNANCHANUNT, S. et al. Downregulation of plasma miR-451 and miR-16 in *Plasmodium vivax* infection. **Exp Parasitol**, v. 155, p. 19-25, Aug 2015. ISSN 1090-2449 (Electronic)

CHATTERJEE, M.; GAWAZ, M. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ): basic mechanisms and clinical implications. **J Thromb Haemost**, v. 11, n. 11, p. 1954-67, Nov 2013. ISSN 1538-7836

CHAVES, Y. O. et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. **Malar J**, v. 15, n. 1, p. 445, Aug 31 2016. ISSN 1475-2875 (Electronic)

CHEN, L. et al. The role of IL-8/CXCR2 signaling in microcystin-LR triggered endothelial cell activation and increased vascular permeability. **Chemosphere**, v. 194, p. 43-48, Mar 2018. ISSN 1879-1298

CHEN, Z. et al. miR-150 Regulates Memory CD8 T Cell Differentiation via c-Myb. **Cell Rep**, v. 20, n. 11, p. 2584-2597, Sep 2017. ISSN 2211-1247

CLEMETSON, K. J. The role of platelets in defence against pathogens. **Hamostaseologie**, v. 31, n. 4, p. 264-8, Nov 2011. ISSN 0720-9355 (Print)

CLIPMAN, S. J. et al. Genetic association study of NLRP1, CARD, and CASP1 inflammasome genes with chronic Chagas cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi* seropositive patients in Bolivia. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0192378, 2018. ISSN 1932-6203

COELHO, H. C. et al. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63410, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

COSTA, D. C. et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 21-8, Feb 2014. ISSN 1678-8060 (Electronic)

COSTA, F. T. et al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 12, p. 1099-105, Nov 2012. ISSN 1879-0135 (Electronic)

CRUZ, L. A. B.; BARRAL-NETTO, M.; ANDRADE, B. B. Distinct inflammatory profile underlies pathological increases in creatinine levels associated with *Plasmodium vivax* malaria clinical severity. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 3, p. e0006306, 03 2018. ISSN 1935-2735

CYPRYK, W.; NYMAN, T. A.; MATIKAINEN, S. From Inflammasome to Exosome-Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response? **Front Immunol**, v. 9, p. 2188, 2018. ISSN 1664-3224

DASARI, P. et al. Malarial anemia: digestive vacuole of Plasmodium falciparum mediates complement deposition on bystander cells to provoke hemophagocytosis. **Med Microbiol Immunol**, v. 203, n. 6, p. 383-93, Dec 2014. ISSN 1432-1831 (Electronic)

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 707-35, 2011. ISSN 1545-3278 (Electronic)

DAYANANDA, K. K.; ACHUR, R. N.; GOWDA, D. C. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of Plasmodium vivax malaria. **J Vector Borne Dis**, v. 55, n. 1, p. 1-8, Jan-Mar 2018. ISSN 0972-9062 (Print)

DE MAST, Q. et al. ADAMTS13 Deficiency with Elevated Levels of Ultra-Large and Active von Willebrand Factor in P. falciparum and P. vivax Malaria. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 3, 2009

DE MEYER, S. F. et al. von Willebrand factor: an emerging target in stroke therapy. **Stroke**, v. 43, n. 2, p. 599-606, Feb 2012. ISSN 1524-4628 (Electronic)

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-32, Apr 7 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)

DOSTERT, C. et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6510, Aug 04 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)

DOUGLAS, N. M. et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. **Malar J**, v. 11, p. 135, Apr 27 2012. ISSN 1475-2875 (Electronic)

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 39, p. E4110-8, Sep 30 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic)

FAILLE, D. et al. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. **FASEB J**, v. 23, n. 10, p. 3449-58, Oct 2009. ISSN 1530-6860 (Electronic)

FANG, Z. et al. MicroRNA-150 regulates blood-brain barrier permeability via Tie-2 after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **FASEB J**, v. 30, n. 6, p. 2097-107, 06 2016. ISSN 1530-6860

FAUSTIN, B. et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. **Mol Cell**, v. 25, n. 5, p. 713-24, Mar 09 2007. ISSN 1097-2765 (Print)

FENG, S. et al. von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. **Blood**, v. 125, n. 6, p. 1034-7, Feb 05 2015. ISSN 1528-0020 (Electronic)

FRANCISCHETTI, I. M. et al. Defibrotide interferes with several steps of the coagulation-inflammation cycle and exhibits therapeutic potential to treat severe malaria. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 3, p. 786-98, Mar 2012. ISSN 1524-4636 (Electronic)

FRANKLIN, B. S. et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of Plasmodium vivax malaria. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19842, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

GARAVELLI, S.; DE ROSA, V.; DE CANDIA, P. The Multifaceted Interface Between Cytokines and microRNAs: An Ancient Mechanism to Regulate the Good and the Bad of Inflammation. **Front Immunol**, v. 9, p. 3012, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic)

GARCIA-CASAS, A.; GARCIA-OLMO, D. C.; GARCIA-OLMO, D. Further the liquid biopsy: Gathering pieces of the puzzle of genomestasis theory. **World J Clin Oncol**, v. 8, n. 5, p. 378-388, Oct 10 2017. ISSN 2218-4333 (Print)

GARIB, F. Y. et al. Inactivation of Inflammasomes by Pathogens Regulates Inflammation. **Biochemistry (Mosc)**, v. 81, n. 11, p. 1326-1339, Nov 2016. ISSN 1608-3040 (Electronic)

GELDHOFF, M. et al. Genetic variation in inflammasome genes is associated with outcome in bacterial meningitis. **Immunogenetics**, v. 65, n. 1, p. 9-16, Jan 2013. ISSN 1432-1211 (Electronic)

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**, v. 5, n. 6, 2008

GRIFFING, S. M. et al. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 701-18, Sep 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)



GRIFFITH, J. W. et al. Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. **J Immunol**, v. 183, n. 8, p. 5208-20, Oct 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)

HA, H.; DEBNATH, B.; NEAMATI, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. **Theranostics**, v. 7, n. 6, p. 1543-1588, 2017. ISSN 1838-7640

HAYWARD, J. A. et al. Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 82, n. 4, 12 2018. ISSN 1098-5557

HE, Y.; JIANG, X.; CHEN, J. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. **Oncogene**, v. 33, n. 30, p. 3887-93, Jul 2014. ISSN 1476-5594

HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasomes: far beyond inflammation. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 321-4, Mar 19 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)

HESKER, P. R. et al. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, increases interleukin-1beta levels. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e51105, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

HOJO-SOUZA, N. S. et al. On the cytokine/chemokine network during Plasmodium vivax malaria: new insights to understand the disease. **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 42, 01 2017. ISSN 1475-2875

HOTTZ, E. D. et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405-14, Nov 14 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic)

HOWES, R. E. et al. Global Epidemiology of Plasmodium vivax. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 15-34, Dec 28 2016. ISSN 1476-1645 (Electronic)

HU, L. F. et al. The Regulation of Seventeen Inflammatory Mediators are Associated with Patient Outcomes in Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 159, 01 2018. ISSN 2045-2322

HUANG, W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. **Methods Mol Biol**, v. 1617, p. 57-67, 2017. ISSN 1940-6029

HUIZINGA, E. G. et al. Structures of glycoprotein Iba1 and its complex with von Willebrand factor A1 domain. **Science**, v. 297, n. 5584, p. 1176-9, Aug 16 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic)

ISHIDA, F. et al. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib alpha with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease. **Br J Haematol**, v. 111, n. 4, p. 1247-9, Dec 2000. ISSN 0007-1048 (Print)

ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 1, p. R52, Feb 12 2014. ISSN 1478-6362 (Electronic)

JANSEN, F. et al. Vascular endothelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus. **Cardiovasc Diabetol**, v. 15, p. 49, Mar 22 2016. ISSN 1475-2840 (Electronic)

JANSEN, F. et al. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 6, p. e001249, Oct 27 2014. ISSN 2047-9980 (Electronic)

JIMENEZ, S. et al. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 6, p. 835-40, Jun 2008. ISSN 1468-2060 (Electronic)

JIN, H. et al. Long non-coding RNA MIAT competitively binds miR-150-5p to regulate ZEB1 expression in osteosarcoma. **Oncol Lett**, v. 17, n. 1, p. 1229-1236, Jan 2019. ISSN 1792-1074

KAMEYOSHI, Y. et al. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. **J Exp Med**, v. 176, n. 2, p. 587-92, Aug 1992. ISSN 0022-1007

KAWECKI, C.; LENTING, P. J.; DENIS, C. V. von Willebrand factor and inflammation. **J Thromb Haemost**, v. 15, n. 7, p. 1285-1294, Jul 2017. ISSN 1538-7836 (Electronic)

KHO, S. et al. Platelets kill circulating parasites of all major Plasmodium species in human malaria. **Blood**, v. 132, n. 12, p. 1332-1344, Sep 20 2018. ISSN 1528-0020 (Electronic)

KOCHAR, D. K. et al. Thrombocytopenia in Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). **Platelets**, v. 21, n. 8, p. 623-7, 2010. ISSN 1369-1635 (Electronic)

KUMAR, R.; SARAVU, K. Severe vivax malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. **Pathog Glob Health**, v. 111, n. 3, p. 148-160, May 2017. ISSN 2047-7732 (Electronic)

KUMAR, V. Inflammasomes: Pandora's box for sepsis. **J Inflamm Res**, v. 11, p. 477-502, 2018. ISSN 1178-7031 (Print)

KUNICKI, T. J. et al. Hereditary Variation in Platelet Integrin  $\alpha 2\beta 1$  Density Is Associated With Two Silent Polymorphisms in the  $\alpha 2$  Gene Coding Sequence. **Blood**, v. 89, n. 6, March 15 1997

LACERDA, M. V. et al. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl 1, p. 52-63, Aug 2011. ISSN 1678-8060 (Electronic)

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

LEE, H. et al. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. **Protein Cell**, v. 7, n. 2, p. 100-13, Feb 2016. ISSN 1674-8018

LEE, W. C. et al. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. **Blood**, v. 123, n. 18, p. e100-9, May 01 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic)

LEEBEEK, F. W.; EIKENBOOM, J. C. Von Willebrand's Disease. **N Engl J Med**, v. 375, n. 21, p. 2067-2080, Nov 24 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

LI, J. L.; ZARBOCK, A.; HIDALGO, A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. **J Exp Med**, Jul 18 2017. ISSN 1540-9538 (Electronic)

LOPES, S. C. et al. Paucity of Plasmodium vivax mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. **J Infect Dis**, v. 209, n. 9, p. 1403-7, May 01 2014. ISSN 1537-6613 (Electronic)

LOPEZ, J. A. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 5, n. 1, p. 97-119, Feb 1994. ISSN 0957-5235 (Print)

LU, J. et al. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. **Dev Cell**, v. 14, n. 6, p. 843-53, Jun 2008. ISSN 1878-1551

LUGRIN, J.; MARTINON, F. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 99-114, Jan 2018. ISSN 1600-065X (Electronic)

MACHADO SIQUEIRA, A. et al. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1934, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

MACHLUS, K. R.; ITALIANO, J. E., JR. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. **J Cell Biol**, v. 201, n. 6, p. 785-96, Jun 10 2013. ISSN 1540-8140 (Electronic)

MACHLUS, K. R. et al. CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 921-6, Feb 2016. ISSN 1528-0020

MACPHERSON, G. G. et al. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. **Am J Pathol**, v. 119, n. 3, p. 385-401, Jun 1985. ISSN 0002-9440 (Print)

MALLERET, B. et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1314-24, Feb 19 2015. ISSN 1528-0020 (Electronic)

MANCUSO, M. E.; SANTAGOSTINO, E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. **Br J Haematol**, v. 178, n. 2, p. 209-219, Jul 2017. ISSN 1365-2141 (Electronic)

MARIN-MENENDEZ, A. et al. Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2155, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)

MATTOS, L. C.; SANCHEZ, F. E.; MOREIRA, H. W. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. **Rev bras hematol hemoter**, v. 23, n. 1, p. 8, 2001

MCMORRAN, B. J. et al. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 797-800, Feb 06 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic)

MCMORRAN, B. J. et al. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 338, n. 6112, p. 1348-51, Dec 07 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)

MENDONCA, V. R. et al. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. **Malar J**, v. 12, p. 69, Feb 21 2013. ISSN 1475-2875 (Electronic)

MENDONCA, V. R. et al. Associations between hepcidin and immune response in individuals with hyperbilirubinaemia and severe malaria due to *Plasmodium vivax* infection. **Malar J**, v. 14, p. 407, Oct 14 2015. ISSN 1475-2875 (Electronic)

MONCUNILL, G. et al. Performance of multiplex commercial kits to quantify cytokine and chemokine responses in culture supernatants from *Plasmodium falciparum* stimulations. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e52587, 2013. ISSN 1932-6203

MOONEY, J. P. et al. Haemolysis and haem oxygenase-1 induction during persistent "asymptomatic" malaria infection in Burkinabé children. **Malar J**, v. 17, n. 1, p. 253, Jul 2018. ISSN 1475-2875

MORRELL, C. N. et al. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. **Blood**, v. 123, n. 18, p. 2759-67, May 01 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic)

MOSHFEGH, K. et al. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. **Lancet**, v. 353, n. 9150, p. 351-4, Jan 30 1999. ISSN 0140-6736 (Print)

MOURAO, L. C. et al. Anti-band 3 and anti-spectrin antibodies are increased in *Plasmodium vivax* infection and are associated with anemia. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8762, Jun 8 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic)

MURTHY, P. et al. The NLRP3 inflammasome and bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and in vitro thrombus formation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 483, n. 1, p. 230-236, Jan 29 2017. ISSN 1090-2104 (Electronic)

NAING, C.; WHITTAKER, M. A. Severe thrombocytopenia in patients with vivax malaria compared to falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. **Infect Dis Poverty**, v. 7, n. 1, p. 10, Feb 9 2018. ISSN 2049-9957 (Electronic)

NAKAMURA, A. et al. Identification of microRNA-181a-5p and microRNA-4454 as mediators of facet cartilage degeneration. **JCI Insight**, v. 1, n. 12, p. e86820, 08 2016. ISSN 2379-3708

NHEK, S. et al. Activated Platelets Induce Endothelial Cell Activation via an Interleukin-1beta Pathway in Systemic Lupus Erythematosus. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 37, n. 4, p. 707-716, Apr 2017. ISSN 1524-4636 (Electronic)

O'DONNELL, J. et al. Donor-derived *Plasmodium vivax* infection following volunteer unrelated bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 21, n. 3, p. 313-4, Feb 1998. ISSN 0268-3369 (Print)

O'SULLIVAN, J. M. et al. Emerging roles for hemostatic dysfunction in malaria pathogenesis. **Blood**, v. 127, n. 19, p. 2281-8, May 12 2016. ISSN 1528-0020 (Electronic)

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, v. 9, p. 115, Apr 30 2010. ISSN 1475-2875 (Electronic)

PAGE, K. et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77963, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

PHALLEN, J. et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 403, Aug 16 2017. ISSN 1946-6242 (Electronic)

PONOMAREVA, A. A. et al. Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles. **J Thromb Haemost**, v. 15, n. 8, p. 1655-1667, Aug 2017. ISSN 1538-7836 (Electronic)

PONTILLO, A. et al. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 45, n. 4, p. 271-8, Jun 2012. ISSN 1607-842X (Electronic)

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 59, n. 2, p. 121-5, Feb 01 2012. ISSN 1944-7884 (Electronic)

PORDZIK, J. et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 74, 2018. ISSN 1664-2392

PRICE, R. N. et al. Vivax Malaria: Neglected and Not Benign. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. Suppl 6, 2007

RAGHURAMAN, G. et al. Eotaxin Augments Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. **J Cell Biochem**, v. 118, n. 3, p. 647-654, 03 2017. ISSN 1097-4644

RAZMARA, M. et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 16, p. 13952-8, Apr 19 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 273, Jul 04 2017. ISSN 1475-2875 (Electronic)

RIOS, D. R. et al. Relationship between ABO blood groups and von Willebrand factor, ADAMTS13 and factor VIII in patients undergoing hemodialysis. **J Thromb Thrombolysis**, v. 33, n. 4, p. 416-21, May 2012. ISSN 1573-742X (Electronic)

ROSSAINT, J.; MARGRAF, A.; ZARBOCK, A. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. **Front Immunol**, v. 9, p. 2712, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic)

ROWE, R. G. et al. Developmental regulation of myeloerythroid progenitor function by the Lin28b-let-7-Hmga2 axis. **J Exp Med**, v. 213, n. 8, p. 1497-512, 07 2016. ISSN 1540-9538

RU, Y. X. et al. Invasion of erythroblasts by *Plasmodium vivax*: A new mechanism contributing to malarial anemia. **Ultrastruct Pathol**, v. 33, n. 5, p. 236-42, Oct 2009. ISSN 1521-0758 (Electronic)

SAMPAIO, N. G.; CHENG, L.; ERIKSSON, E. M. The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 245, Jun 09 2017. ISSN 1475-2875 (Electronic)

SANTOS, M. L. et al. Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria. **Infect Genet Evol**, v. 40, p. 162-6, Jun 2016. ISSN 1567-7257 (Electronic)

SAÚDE, S. D. V. E. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**: Ministério da Saúde 2009

SAÚDE, S. D. V. E. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**: Ministério da Saúde 2010

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-32, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

SCHWAMEIS, M. et al. VWF excess and ADAMTS13 deficiency: a unifying pathomechanism linking inflammation to thrombosis in DIC, malaria, and TTP. **Thromb Haemost**, v. 113, n. 4, p. 708-18, Apr 2015. ISSN 0340-6245 (Print)

SIQUEIRA, A. M. et al. Characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. **BMC Med**, v. 13, p. 57, Mar 20 2015. ISSN 1741-7015 (Electronic)

SIQUEIRA, A. M. et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87-96, Dec 28 2016. ISSN 1476-1645 (Electronic)

SMYTH, S. S. et al. Platelet functions beyond hemostasis. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. 11, p. 1759-66, Nov 2009. ISSN 1538-7836 (Electronic)

SOARES, R. P. et al. Decreased plasma ADAMTS-13 activity as a predictor of postoperative bleeding in cyanotic congenital heart disease. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 531-536, 2013. ISSN 18075932

SOUSA, N. C. et al. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. **Haematologica**, v. 92, n. 2, p. 236-9, Feb 2007. ISSN 1592-8721 (Electronic)

SRIVASTAVA, K. et al. Platelet factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 2, p. 179-87, Aug 14 2008. ISSN 1934-6069 (Electronic)

STRANGWARD, P. et al. Targeting the IL33-NLRP3 axis improves therapy for experimental cerebral malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 28, p. 7404-7409, 07 2018. ISSN 1091-6490

TANAKA, K. A. et al. Cystine improves survival rates in a LPS-induced sepsis mouse model. **Clin Nutr**, v. 34, n. 6, p. 1159-65, Dec 2015. ISSN 1532-1983

TJITRA, E. et al. Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med**, v. 5, n. 6, p. e128, Jun 17 2008. ISSN 1549-1676 (Electronic)

TUFEKCI, K. U. et al. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. **Autoimmune Dis**, v. 2011, p. 807426, Nov 2010. ISSN 2090-0430

VILLEGAS-MENDEZ, A. et al. Gamma Interferon Mediates Experimental Cerebral Malaria by Signaling within Both the Hematopoietic and Nonhematopoietic Compartments. **Infect Immun**, v. 85, n. 11, 11 2017. ISSN 1098-5522

VISHNOI, A.; RANI, S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. **Methods Mol Biol**, v. 1509, p. 1-10, 2017. ISSN 1940-6029

WAHLGREN, M.; GOEL, S.; AKHOURI, R. R. Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 8, p. 479-491, Aug 2017. ISSN 1740-1534 (Electronic)

WANG, Y. et al. Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIIb $\alpha$ . **Nat Commun**, v. 8, p. 15559, 05 2017. ISSN 2041-1723



WANG, Z. et al. Red blood cells release microparticles containing human argonaute 2 and miRNAs to target genes of *Plasmodium falciparum*. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, n. 8, p. e75, Aug 23 2017. ISSN 2222-1751 (Electronic)

WASSMER, S. C. et al. Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. **Am J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 3 Suppl, p. 42-56, Sep 2015. ISSN 1476-1645 (Electronic)

WEISS, C. N.; ITO, K. A Macro View of MicroRNAs: The Discovery of MicroRNAs and Their Role in Hematopoiesis and Hematologic Disease. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 334, p. 99-175, 2017. ISSN 1937-6448 (Print)

WHO. **Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity**. Geneva: World Health Organization 2011

WHO. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneva: World Health Organization 2015

WHO. **World Malaria Report 2018**. Geneva: World Health Organization 2018

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H. Blood and bone marrow changes in malaria. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, v. 13, n. 2, p. 277-99, Jun 2000

XU, J. et al. Circulating Plasma Extracellular Vesicles from Septic Mice Induce Inflammation via MicroRNA- and TLR7-Dependent Mechanisms. **J Immunol**, v. 201, n. 11, p. 3392-3400, Dec 2018. ISSN 1550-6606

YU, X. et al. Inflammasome activation negatively regulates MyD88-IRF7 type I IFN signaling and anti-malaria immunity. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 4964, 11 2018. ISSN 2041-1723

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 156-71, May 2015. ISSN 1600-065X

ZERNECKE, A. et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. **Sci Signal**, v. 2, n. 100, p. ra81, Dec 8 2009. ISSN 1937-9145 (Electronic)

ZHANG, Y. et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. **Mol Cell**, v. 39, n. 1, p. 133-44, Jul 9 2010. ISSN 1097-4164 (Electronic)

ZHONG, F. L. et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. **Cell**, v. 167, n. 1, p. 187-202.e17, Sep 2016. ISSN 1097-4172



## Apêndice 1 – Artigo científico publicado

Infection, Genetics and Evolution 40 (2016) 162–166



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)



### Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria



Marina L.S. Santos<sup>a</sup>, Edione Cristina Reis<sup>b</sup>, Pamela N. Bricher<sup>b</sup>, Tais N. Sousa<sup>a</sup>, Cristiana F.A. Brito<sup>a</sup>, Marcus V.G. Lacerda<sup>c</sup>, Cor J.F. Fontes<sup>d</sup>, Luzia H. Carvalho<sup>a</sup>, Alessandra Pontillo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Instituto de Pesquisas Leônidas and Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brazil

<sup>d</sup> Hospital Julio Muller, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 1 December 2015

Received in revised form 26 February 2016

Accepted 28 February 2016

Available online 3 March 2016

##### Keywords:

Inflammasome

NLRP1

NLRP3

IL1B

IL18

*P. vivax*

Malaria

#### ABSTRACT

Recent reports showed that, in mice, symptomatic *Plasmodium* infection triggers NLRP3/NLRP12-dependent inflammasome formation and caspase-1 activation in monocytes. In humans, few works demonstrated that inflammasome is activated in malaria. As *Plasmodium vivax* is a potent inducer of inflammatory response we hypothesised that inflammasome genetics might affect *P. vivax* malaria clinical presentation. For this purpose, selected SNPs in inflammasome genes were analysed among patients with symptomatic *P. vivax* malaria.

157 Brazilian Amazon patients with *P. vivax* malaria were genotyped for 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in inflammasome genes *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* and *MEFV*. Effect of SNPs on hematologic and clinical parameters was analysed by multivariate analysis.

Our data suggested an important role of NLRP1 inflammasome receptor in shaping the clinical presentation of *P. vivax* malaria, in term of presence of fever, anaemia and thrombocytopenia. Moreover *IL1B* rs1143634 resulted significantly associated to patients' parasitaemia, while *IL18* rs5744256 plays a protective role against the development of anaemia.

Polymorphisms in inflammasome genes could affect one or other aspects of malaria pathogenesis. Moreover, these data reveal novel aspects of *P. vivax*/host interaction that involved NLRP1-inflammasome.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Background

Malaria remains a major public health problem worldwide, with 3.2 billion people at risk of being infected and developing the disease (WHO, 2015). Among the five *Plasmodium* species that cause malaria in humans, *Plasmodium falciparum* has been considered the main cause of severe and fatal disease, while *P. vivax* is a major cause of morbidity outside Africa and has also been associated with clinical severity and systemic inflammation (Barber et al., 2015).

A central mechanism for inflammation induction is the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 from innate immune cells. IL-1 $\beta$  and IL-18 liberation depends on the activation of a cytoplasmic complex, known as inflammasome. Several intracellular Pattern Recognition Receptors (PRRs) belonging to NLR family (i.e.: NLRP1, NLRP3, NLRP12) and to other protein families (i.e.: AIM2 or pyrin/MEFV), are able to induce the inflammasome assembling in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs). Upon recognition of PAMPs and/or DAMPs, the receptor

recruits the adaptor protein ASC and the cysteine-aspartic protease caspase-1, which is responsible for the processing of pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 (Man and Kanneganti, 2015).

Recent reports showed that, in mice, symptomatic *Plasmodium* infection triggers NLRP3/NLRP12-dependent inflammasome formation and caspase-1 activation in monocytes, leading to dramatic IL-1 $\beta$  secretion especially when exposed to a second microbial challenge (Ataide et al., 2014). Furthermore hemozoin and DNA activated inflammasome through NLRP3 and AIM2 receptors respectively, in murine infected erythrocytes (Kalantari et al., 2014).

In humans, few works demonstrated that inflammasome is activated in malaria. In *P. falciparum*, for example, the opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and leads to FcR-mediated phagocytosis in macrophages (Zhou et al., 2012). On the other hand, the presence of inflammasome complexes was demonstrated in monocytes from malaria patients containing either NLRP3 or NLRP12 inflammasomes (Ataide et al., 2014).

Although multiple studies have revealed that malaria has been a major force of evolutionary selection on the human genome (reviewed in (Malaria Genomic Epidemiology, 2014) little is currently known about the effects of malaria on the evolution of the human immune genes, possibly because the phenotypic consequences are more subtle than those of the classic erythrocyte variants (Kwiatkowski, 2005).

\* Corresponding author at: Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: [alepontillo@usp.br](mailto:alepontillo@usp.br) (A. Pontillo).

**Table 1**  
Demographic, clinical and haematological data of Brazilian Amazon patients with *P. vivax* malaria.

CHARACTERISTICS	
Median age, years	34 (25–80)
Male/female, n	122/35
Previous malaria episodes <sup>§</sup> , n	1.5 (1–40)
Days of acute illness, n	5 (3–7)
Presence of fever, yes/no	134/23
Parasitaemia, parasites/ $\mu$ L of blood	1117 (607.5–8238)
Leukocyte counts, $\times 10^3/\mu$ L	5.4 (4.4–14.6)
Haematocrit, %	38.8 (35.6–50.6)
Haemoglobin level, g/dL	Male: 13.2 (12.1–16.9); Female: 12.3 (11.3–15.2)
Anaemia <sup>v</sup> , yes/no	Male: 52/70; Female: 12/23
Platelet counts, $\times 10^3/\mu$ L	95 (62–260)
Thrombocytopenia <sup>†</sup> , yes/no	23/134
Total score, high/low	93/64

Data are reported as median (interquartile range) except where otherwise specified.

<sup>§</sup> Self-reported number of lifetime malaria episodes.

<sup>v</sup> Anaemia: haemoglobin <13 g/dL (Male) and <12 g/dL (Female).

<sup>†</sup> Thrombocytopenia: platelet counts <50  $\times 10^3/\mu$ L.

Notwithstanding, the last few years have seen a rapid growth in the number of reported genetic associations with susceptibility and resistance to clinical malaria, many of which involve immunity and inflammation. In this context, genetic variants in host innate immune genes (i.e., *CRP*, *MBL2*, *NOS2*, *IFNAR1*) and adhesion molecules (*THBS1* and *ESEL*) have been described as predisposing factors for the outcome of *P. falciparum* malaria (Kanchan et al., 2015a, 2015b), while antioxidant enzymes (i.e.: *GSTT*, *GSTM*, *GSTP*, *SOD*, *CAT*) were evaluated as risk factors for *P. vivax* malaria (Andrade et al., 2010; Fernandes et al., 2015).

As *P. vivax* is a potent inducer of inflammatory response (reviewed in (Anstey et al., 2009)) we hypothesised that inflammasome genetics might affect *P. vivax* malaria clinical presentation. To our knowledge, inflammasome genes have not yet been evaluated in malaria. For this purpose, selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in inflammasome genes were analysed among Brazilian Amazon patients with symptomatic *P. vivax* malaria.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

A total of 157 patients with *P. vivax* malaria (122 males/35 females) were recruited for the study after written informed consent, as specified by the Brazilian National Commission for Ethics on Research (Protocol CEPISH/CPqRR/03/2008). Antimalarial and supportive therapies were given according to standard protocols. The study included patients with symptomatic *P. vivax* malaria, and all volunteers were negative for *P. falciparum* and/or *P. malariae* by the means of microscopy and polymerase chain reaction (PCR). Clinical and demographical data were acquired through a standardized questionnaire, and the haematological profiles were assessed by automated complete blood cell counts carried out at local health facilities. Table 1 summarizes demographic, epidemiological, parasitological and haematological data of *P. vivax* infected-volunteers. For statistical purposes, we used a previously validated semi-quantitative clinical assessment to enable numerical comparisons (Campos et al., 2013). Briefly, scores of 0 or 1 were assigned to clinical and hematologic parameters reported as absent (or within reference ranges) or present (or outside reference ranges), respectively; the sum of scores provided patient's final clinical score (scores range from 0 to 7). We grouped 0–3 score as “low” and 4–7 as “high” total clinical score.

### 2.2. Single nucleotide polymorphisms selection and genotyping

10 SNPs in inflammasome genes *NLRP1*, *NLRP3*, *MEFV*, *CARD8*, *IL1B*, and *IL18* were selected based on functional effect, minor allele

frequency (MAF) and/or previously reported association with human disorders (Levandowski et al., 2013; Verma et al., 2012) (Frayling et al., 2007; Hitomi et al., 2009; Pontillo et al., 2011, 2012a, 2012b, 2013). SNPs genotyping was performed using commercially available TaqMan assays (Applied Biosystems/AB) using StepOne Real-Time platform (AB). Allelic discrimination was performed using the StepOne software (AB).

### 2.3. Data analysis

Effect of SNPs on hematologic and clinical parameters, including haematocrit, haemoglobin, leukocyte and platelet levels, parasitaemia, fever, presence of severe thrombocytopenia and anaemia as well as the total clinical score was analysed by multivariate association based

**Table 2**  
Frequency of studied polymorphisms in Brazilian Amazon cohort of patients with *P. vivax* malaria.

Gene	SNP ID	Alleles/Genotypes	Frequency	H-W p-value
<i>NLRP1</i>	rs12150220	A	0.41	0.185
		T	0.59	
		A/A	0.38	
		A/T	0.43	
		T/T	0.19	
	rs11651270	C	0.48	0.247
		T	0.52	
		C/C	0.25	
		C/T	0.45	
		T/T	0.30	
	rs2670660	A	0.46	0.743
		G	0.54	
		A/A	0.28	
		A/G	0.52	
		G/G	0.20	
<i>NLRP3</i>	rs35829419	A	0.02	1.0
		C	0.98	
		A/A	0	
		A/C	0.03	
		C/C	0.97	
	rs10754558	C	0.62	0.862
		G	0.38	
		C/C	0.39	
		C/G	0.46	
		G/G	0.15	
<i>MEFV</i>	rs224204	A	0.12	1.0
		G	0.88	
		A/A	0	
		A/G	0.24	
		G/G	0.76	
<i>CARD8</i>	rs2043211	A	0.70	0.556
		T	0.30	
		A/A	0.50	
		A/T	0.40	
		T/T	0.10	
	rs6509365	A	0.63	0.303
		G	0.37	
		A/A	0.37	
		A/G	0.51	
		G/G	0.12	
<i>IL1B</i>	rs1143634	A	0.22	0.218
		G	0.78	
		A/A	0.06	
		A/G	0.30	
		G/G	0.64	
<i>IL18</i>	rs5744256	A	0.83	0.767
		G	0.17	
		A/A	0.69	
		A/G	0.29	
		G/G	0.02	

Gene symbol, Single nucleotide polymorphism (SNP) identification (ID), allele and genotype frequencies and p-value for Hardy–Weinberg (H–W) equilibrium test are reported.

**Table 3**  
Association results for polymorphisms in inflammasome genes and clinical presentation in *P. vivax* malaria patients.

Gene	SNP ID	Fever (Yes/No)	PRS (Log)	WBC (Log)	HTC (Log)	HB (Log)	Anaemia (Yes/No)	Platelets (n/μL)	TCP (Yes/No)	Severity (High/Low)
<i>NLRP1</i>	rs12150220	0.019	0.897	0.243	0.081	0.169	0.291	<b>4.5 exp.-4</b>	0.189	<b>0.001</b>
	rs2670660	0.174	0.262	0.172	0.099	0.103	0.027	0.324	0.008	0.024
	rs11651270	0.030	0.402	0.800	0.320	0.590	0.272	0.642	0.672	0.164
<i>NLRP3</i>	rs35829419	0.108	0.468	0.083	0.559	0.730	0.634	0.308	0.369	0.812
	rs10754558	0.708	0.063	0.616	0.842	0.997	0.542	0.620	0.254	0.958
<i>MEFV</i>	rs224204	0.379	0.344	0.900	0.343	0.371	0.059	0.378	0.056	0.935
<i>CARD8</i>	rs2043211	0.092	0.195	0.928	0.149	0.136	0.056	0.291	0.025	0.121
	rs6509365	0.030	0.175	0.202	0.419	0.756	0.594	0.377	0.308	0.522
<i>IL1B</i>	rs1143634	0.295	<b>5.2 exp.-4</b>	0.803	0.387	0.339	0.260	0.519	0.161	0.499
<i>IL18</i>	rs5744256	0.200	0.515	0.348	<b>0.004</b>	<b>2 exp.-4</b>	0.082	0.929	0.249	0.810

p-values (adjusted for sex, age and number of malaria episodes) according to general linear model (GLM) analysis are reported for studied SNPs and clinical variables as well as for malaria severity (based on "total score"). p-values < 0.05 are underlined; p-values < 0.005 are in bold characters.

SNP ID: Single nucleotide polymorphism identification number; PRS: parasitaemia; WBC: white blood cells (leukocytes); HB: haemoglobin level; HTC: haematocrit; TCP: thrombocytopenia.

on general linear model (GLM) adjusted for variables (sex, age, number of malaria episodes) using R-project package "SNP-assoc" version 1.5–2 (Gonzalez et al., 2007). The Haploview software (Barrett, 2009) was used to investigate the association and linkage disequilibrium (LD) pattern and for deriving the haplotypes. A multiple testing correction (Bonferroni) would require a significance threshold of  $p = 0.005$ .

### 3. Results

The frequency of studied polymorphisms in our patients is reported in Table 2. The distribution of genotypes was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium for all SNPs (Table 2). Multivariate analysis results are summarized in Table 3.

Polymorphisms in candidate genes, such as *NLRP3* and *MEFV*, previously shown as important players in malaria (Dutra et al., 2014; Fumagalli et al., 2009; Kalantari et al., 2014), was not associated to malaria presentation in our cohort (Table 3).

Un-expectedly, SNPs in *NLRP1* resulted differently distributed in *P. vivax* malaria patients according to several clinical parameters (fever, anaemia, platelets counts and thrombocytopenia) (Table 3).

It was possible to observe a significant lower level of platelets in patients harbouring the minor allele T of the rs12150220 (A/T + T/T: 4.92 n/μL vs A/A: 5.02 n/μL;  $p_{adj} = 4.5 \text{ exp.-4}$ ) (Table 4).

When total clinical score was taken in account ("high" versus "low"), *NLRP1* rs12150220 appeared to be significantly more frequent in individuals with a high clinical score (0.73) compared to a low one (0.55) ( $p_{adj} = 0.001$ ;  $OR_{adj} = 3.89$ ) (Table 4).

These findings suggest the contribution of missense variation *NLRP1* rs12150220 (L155H) in severity of *P. vivax* malaria.

We would like to briefly mention other association results with  $p < 0.05$ , even if they did not pass Bonferroni correction, maybe due to the limited size of analysed cohort, as in our opinion corroborate fully statistically significant data. *NLRP1* rs1215022 and rs11651270 SNPs are more frequent in patients with fever ( $n = 134$ ) versus individuals reporting no fever episodes ( $n = 23$ ) ( $p_{adj} = 0.019$  and  $OR_{adj} = 4.68$ ; and  $p_{adj} = 0.030$  and  $OR_{adj} = 7.74$ , respectively) (Supplementary File 1). Moreover *NLRP1* promoter variant rs2670660 resulted more frequent in anaemic patients ( $p_{adj} = 0.027$ ;  $OR_{adj} = 2.67$ ) as well as in individuals with thrombocytopenia ( $p_{adj} = 0.008$ ;  $OR_{adj} = 4.54$ ) (Supplementary File 1).

Polymorphisms in inflammasome-related cytokines IL-1β and IL-18 resulted significantly associated to clinical parameters in our cohort.

Malaria patients carrying *IL1B* rs1143634 minor A allele presented a lower parasite load than G/G ones (A/A + A/G: 2.89 log (parasite/μL) versus G/G: 3.2;  $p_{adj} = 5.2 \text{ exp.-4}$ ), emphasizing the contribution of this inflammasome-dependent cytokine in controlling parasitaemia (Table 5).

**Table 4**  
Detailed results for significantly associated *NLRP1* SNPs.

SNP	Clinical variable	Individuals (frequency)	me ± se	dif	Lower	upper	p	P <sub>adj</sub>
<b>Platelets counts (103/μL)</b>								
rs12150220	A/A	0.38	120.484 ± 7.990	Ref.			3.9 exp-4	4.5 exp-4
	A/T-T/T	0.62	94.629 ± 04.892	-25.855	-43.179	-8.532		
<b>Total clinical score</b>								
rs12150220	A/A	0.27	0.45	Ref			0.022	0.001
	A/T-T/T	0.73	0.55	3.89	1.63	9.30		

Genotypes distribution according to inheritance model (dominant over-dominant), p-value, p-values adjusted for sex, age and number of malaria episodes, as well as Odds Ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI), or difference (dif) and 95% confidence intervals (lower, upper) are reported for *NLRP1* SNPs associated with malaria clinical variables. me±se: mean and standard error. Ref.: reference genotype.

**Table 5**  
Detailed results for significantly associated *IL18* and *IL18* SNPs.

Gene/SNP	Clinical variable		me ± se	dif	Lower	Upper	p	P <sub>adj</sub>
<i>IL18</i>								
rs1143634	Parasitaemia (log)							
	G/G	0.73	3.20 ± 0.07	Ref.				
	A/G-A/A	0.27	2.89 ± 0.09	-0.51	-0.78	-0.24	0.009	5.2 exp.-4
<i>IL18</i>								
rs5744256	Haemoglobin level (log)							
	A/A	0.69	2.53 ± 0.01	Ref.				
	A/G	0.29	2.58 ± 0.02	0.06	0.01	0.12		
	G/G	0.02	2.31 ± 0.34	-0.37	-0.58	-0.16	0.003	1.9 exp.-4
rs5744256	Haematocrit (log)							
	A/A-A/G	0.98	3.64 ± 0.01	Ref.				
	G/G	0.02	3.39 ± 0.35	-0.26	-0.43	-0.08	0.005	0.004

Genotypes distribution according to inheritance model (co-dominant, dominant or recessive), p-value, p-values adjusted for sex, age and number of malaria episodes, as well as difference (dif) and 95% confidence intervals (lower; upper) are reported for inflammasome SNPs associated with discrete/continuous variables. me ± se: mean and standard error; Ref.: reference genotype.

Lower haemoglobin levels were found in *IL18* rs5744256 G/G individuals (log(Hb) = 2.305) compared to A/A (log(Hb) = 2.526) and A/G individuals (log(Hb) = 2.578) (p<sub>adj</sub> = 1.9 exp.-4) (Table 4). The same *IL18* SNP was significantly associated with low haematocrit values according to a recessive inheritance model (p<sub>adj</sub> = 0.004) (Table 4), suggesting that this 3'UTR variant, which lead to a reduced serum level of IL-18 (Frayling et al., 2007), could contribute to the development of anaemia in malaria patients. Accordingly, *IL18* rs5744256\_A > G resulted less frequent in the anaemic patients (male: Hb < 13.00 g/dL; female: Hb < 12.00 g/dL) as compared to non-anaemic ones (0.21 versus 0.37; OR = 0.46), however once again this association could not be considered statistically significant after Bonferroni correction (p<sub>adj</sub> = 0.037) (Supplementary File 1).

Finally, linkage disequilibrium was tested in the studied population and the 2 *CARD8* SNPs (rs2043211, rs6509365) resulted in LD (D' = 0.94; r<sup>2</sup> = 0.64) (Supplementary File 2), however the derived 4 haplotypes (A-A, T-G, A-G, T-A) did not result significantly associated with malaria clinical presentation (p > 0.05).

#### 4. Discussion

In murine models of malaria infection NLRP3-inflammasome has been pointed out as the complex responsible for inflammation in response to *Plasmodium* spp. hemozoin (Kalantari et al., 2014) moreover haemolysis in term of increasing extracellular heme also activates NLRP3-mediated IL-18 secretion (Dutra et al., 2014). However, unexpectedly, *NLRP3* variants did not associate with any analysed characteristics of clinical malaria.

Similarly, the other strong candidate gene, *MEFV*, which has been previously pointed out as a protector factor against *P. falciparum* malaria (Fumagalli et al., 2009) did not result significantly associated to *P. vivax* malaria in our cohort.

However our data suggested an important role of another inflammasome receptor, the NLRP1, in shaping the clinical presentation of *P. vivax* malaria, in term of presence of thrombocytopenia, a relevant complication in *P. vivax* malaria (Lacerda et al., 2011) and severity of the disease. Up to date, NLRP1 has not been associated to disease characterized by episodes of fever as other inflammasome-related NLRs, nor with platelet disorder. Moreover information about PAMPs and/or DAMPs able to activate NLRP1 is still lacking, suggesting that during *P. vivax* infection still unknown molecular patterns could appear and induce inflammasome activation through this receptor. Recent reports indicate that NLRP1 could play a key role in endothelium, and especially in endothelial disorders (Bleda et al., 2014, 2015). As *P. vivax* targets endothelium and induces vascular damage (Barber et al., 2015), we can hypothesise that individual carrying *NLRP1* gain-of-function SNPs could be more

susceptible to develop *P. vivax*-related vascular disorder. On the other hand, the association of *NLRP1* SNPs with cytopenia (platelets and, even if not fully significant, red blood cells) recalls the work by (Masters et al., 2012) where NLRP1-inflammasome activation has been associated to pyroptosis cell death in haematopoietic progenitor cells in mice. Deeper investigations are needed to elucidate the role of NLRP1 in *P. vivax* malaria.

Cyclic inflammation is a common hallmark of malaria and it is related to high levels of pro-inflammatory cytokines (Anstey et al., 2009), however it is still unclear whether the production of cytokine is a benefit for immune response against *Plasmodium*. Our results suggested that IL-18 seemed to be important in controlling parasitaemia. For what concerns IL-18, it was recently shown in a murine model of malaria that augmented levels of IL-18 positively correlated with *Plasmodium* parasitaemia and with the severity of the infection (Basir et al., 2012). In our cohort, the *IL18* loss-of-function variation rs5744256 (Frayling et al., 2007) was associated to reduced haemoglobin level and haematocrit. These results partially confirmed previously published data about the association between *IL18* promoter variants and severe malarial anaemia in children (Anyona et al., 2011).

#### 5. Conclusions

Despite the limited size of studied cohort, our results showed a significant association between inflammasome genetics and clinical presentation of *P. vivax* malaria, suggesting that polymorphisms in inflammasome genes could affect one or another aspect of malaria pathogenesis. Moreover, these data confirm previously reported results about the key role of NLRP3-inflammasome in mouse model of malaria, and reveal novel aspects of *P. vivax*/host interaction that might be deeper investigated in term of *NLRP1*/platelets and/or endothelium interplay.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.038>.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MLSS and TNS participated to the statistical analysis and to the manuscript draught; ECR and PB carried out the genotyping experiments; CFAB and LHC participated in the design of the study and drafted the manuscript; MVL and CJF F recruited malaria patients; AP conceived

and coordinated the study, analyses the data and wrote the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo Research foundation (FAPESP) (2013/06142-1).

A.P. is recipient of a Fellowship from CNPq. ECR is a recipient of a Fellowship from CAPES. PB is a recipient of a Fellowship from FAPESP (TT3). MLSS is a recipient of a Fiocruz Fellowship.

#### References

- Andrade, B.B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S.M., Raffaele-Netto, I., Camargo, L.M.A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2010. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e650.
- Anstey, N.M., Russell, B., Yeo, T.W., Price, R.N., 2009. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 25, 220–227.
- Anyona, S.B., Kempaiah, P., Raballah, E., Ouma, C., Were, T., Davenport, G.C., Konah, S.N., Vulule, J.M., Hittner, J.B., Gichuki, C.W., Ong'echa, J.M., Perkins, D.J., 2011. Functional promoter haplotypes of interleukin-18 condition susceptibility to severe malarial anemia and childhood mortality. *Infect. Immun.* 79, 4923–4932.
- Ataide, M.A., Andrade, W.A., Zamboni, D.S., Wang, D., Souza Mdo, C., Franklin, B.S., Eljan, S., Martins, F.S., Pereira, D., Reed, G., Fitzgerald, K.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., 2014. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog.* 10, e1003885.
- Barber, B.E., William, T., Grigg, M.J., Parameswaran, U., Piers, K.A., Price, R.N., Yeo, T.W., Anstey, N.M., 2015. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog.* 11, e1004558.
- Barrett, J.C., 2009. Haploview: visualization and analysis of SNP genotype data. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, (pdb ip71).
- Basir, R., Hasballah, K., Jabbarzare, M., Gam, L.H., Abdul Majid, A.M., Yam, M.F., Moklas, M.A., Othman, F., Che Norma, M.T., Zalina, A., Mahmud, R., Abdullah, W.O., 2012. Modulation of interleukin-18 release produced positive outcomes on parasitaemia development and cytokines production during malaria in mice. *Trop. Biomed.* 29, 405–421.
- Bleda, S., de Haro, J., Varela, C., Esparza, L., Ferruelo, A., Acin, F., 2014. NLRP1 inflammasome, and not NLRP3, is the key in the shift to proinflammatory state on endothelial cells in peripheral arterial disease. *Int. J. Cardiol.* 172, e282–e284.
- Bleda, S., De Haro, J., Varela, C., Ferruelo, A., Acin, F., 2015. Aspirin therapy inhibits NLRP1 (nucleotide-binding domain-like receptor protein 1) inflammasome gene expression in patients with peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* 61, 1103–1104.
- Campos, F.M.F., Santos, M.L.S., Kano, F.S., Fontes, C.J.F., Lacerda, M.V.G., Brito, C.F.A., Carvalho, L.H., 2013. Genetic variability in platelet integrin  $\alpha 2\beta 1$  density: possible contributor to plasmodium vivax-induced severe thrombocytopenia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 325–328.
- Dutra, F.F., Alves, L.S., Rodrigues, D., Fernandez, P.L., de Oliveira, R.B., Golenbock, D.T., Zamboni, D.S., Bozza, M.T., 2014. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4110–E4118.
- Fernandes, R.C., Hasan, M., Gupta, H., Geetha, K., Rai, P.S., Hande, M.H., D'Souza, S.C., Adhikari, P., Brand, A., Satyamoorthy, K., 2015. Host genetic variations in glutathione-S-transferases, superoxide dismutases and catalase genes influence susceptibility to malaria infection in an Indian population. *Mol. Gen. Genet.* 290, 1155–1168.
- Frayling, T.M., Rafiq, S., Murray, A., Hurst, A.J., Weedon, M.N., Henley, W., Bandinelli, S., Corsi, A.M., Ferrucci, L., Guralnik, J.M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2007. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Med. Sci.* 62, 73–78.
- Fumagalli, M., Cagliani, R., Pozzoli, U., Riva, S., Comi, G.P., Menozzi, G., Bresolin, N., Sironi, M., 2009. A population genetics study of the familial Mediterranean fever gene: evidence of balancing selection under an overdominance regime. *Genes Immun.* 10, 678–686.
- Gonzalez, J.R., Armengol, L., Sole, X., Guino, E., Mercader, J.M., Estivill, X., Moreno, V., 2007. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23, 644–645.
- Hitomi, Y., Ebisawa, M., Tomikawa, M., Imai, T., Komata, T., Hirota, T., Harada, M., Sakashita, M., Suzuki, Y., Shimojo, N., Kohno, Y., Fujita, K., Miyatake, A., Doi, S., Enomoto, T., Taniguchi, M., Higashi, N., Nakamura, Y., Tamari, M., 2009. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (779–785), e776.
- Kalantari, P., DeOliveira, R.B., Chan, J., Corbett, Y., Rathinam, V., Stutz, A., Latz, E., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., Fitzgerald, K.A., 2014. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep.* 6, 196–210.
- Kanchan, K., Jha, P., Pati, S.S., Mohanty, S., Mishra, S.K., Sharma, S.K., Awasthi, S., Venkatesh, V., Habib, S., 2015a. Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) microsatellite repeat and single nucleotide polymorphism haplotypes of IFN-alpha receptor (IFNAR1) associated with enhanced malaria susceptibility in Indian populations. *Infect. Genet. Evol.* 29, 6–14.
- Kanchan, K., Pati, S.S., Mohanty, S., Mishra, S.K., Sharma, S.K., Awasthi, S., Venkatesh, V., Habib, S., 2015b. Polymorphisms in host genes encoding NOS1L, C-reactive protein, and adhesion molecules thrombospondin and E-selectin are risk factors for *Plasmodium falciparum* malaria in India. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 2029–2039.
- Kwiatkowski, D.P., 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 171–192.
- Lacerda, M.V., Mourao, M.P., Coelho, H.C., Santos, J.B., 2011. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 (Suppl. 1), 52–63.
- Levandowski, C.B., Mailloux, C.M., Ferrara, T.M., Gowan, K., Ben, S., Jin, Y., McFann, K.K., Holland, P.J., Fain, P.R., Dinarello, C.A., Spritz, R.A., 2013. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1beta processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2952–2956.
- Malaria Genomic Epidemiology, N., 2014. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nat. Genet.* 46, 1197–1204.
- Man, S.M., Kanneganti, T.D., 2015. Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* 265, 6–21.
- Masters, S.L., Gerlic, M., Metcalf, D., Preston, S., Pellegrini, M., O'Donnell, J.A., McArthur, K., Baldwin, T.M., Chevrier, S., Nowell, C.J., Cengia, L.H., Henley, K.J., Collinge, J.E., Kastner, D.L., Feigenbaum, L., Hilton, D.J., Alexander, W.S., Kile, B.T., Croker, B.A., 2012. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity* 37, 1009–1023.
- Pontillo, A., Vendramin, A., Catamo, E., Fabris, A., Crovella, S., 2011. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 539–544.
- Pontillo, A., Girardelli, M., Kamada, A.J., Pancotto, J.A., Donadi, E.A., Crovella, S., Sandrin-Garcia, P., 2012a. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 45, 271–278.
- Pontillo, A., Oshiro, T.M., Girardelli, M., Kamada, A.J., Crovella, S., Duarte, A.J., 2012b. Polymorphisms in inflammasome genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59, 121–125.
- Pontillo, A., Carvalho, M.S., Kamada, A.J., Moura, R., Schindler, H.C., Duarte, A.J., Crovella, S., 2013. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 63, 147–151.
- Verma, D., Samdahi, E., Andersson, H., Eriksson, P., Fredrikson, M., Jonsson, J.I., Lerm, M., Soderkvist, P., 2012. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1beta and IL-18 production. *PLoS One* 7, e34977.
- WHO, 2015. World Malaria Report 2015. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Zhou, J., Ludlow, L.E., Hasang, W., Rogerson, S.J., Jaworowski, A., 2012. Opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages. *Malar. J.* 11, 1–13.



## Apêndice 2 – Conjunto de miRNAs alvos identificados em amostras estudadas de pacientes e controles

---

### Conjunto de miRNAs alvos

---

hsa-let-7b-5p  
hsa-miR-122-5p  
hsa-miR-126-3p  
hsa-miR-142-3p  
hsa-miR-144-3p  
hsa-miR-150-5p  
hsa-miR-16-5p  
hsa-miR-1976  
hsa-miR-199a-3p+hsa-miR-199b-3p  
hsa-miR-223-3p  
hsa-miR-23a-3p  
hsa-miR-25-3p  
hsa-miR-33a-5p  
hsa-miR-4454+hsa-miR-7975  
hsa-miR-451a  
hsa-miR-520f-3p  
hsa-miR-93-5p

---

Conforme recomendações do fabricante, foram considerados apenas os alvos que apresentaram contagem média dos valores brutos superior a 100, considerado o *background* do ensaio de detecção de miRNAs pela plataforma nCounter®

**Apêndice 3 – Vias de sinalização identificadas considerando-se as comparações entre grupos de pacientes (P1 a P3) e controles**

<b>Vias canônicas</b>	<b>-log(p-value) - P1 X P3</b>
Sinalização de IL-17	3.25E00
Via Th1	3.01E00
Sinalização mTOR	2.9E00
Via de sinalização de neuroinflamação	2.74E00
Sinalização FLT3 em células progenitoras hematopoiéticas	2.71E00
Sinalização ERK5	2.64E00
Sinalização p38 MAPK	2.62E00
Via de ativação Th1 e Th2	2.41E00
Sinalização de apoptose	2.17E00
Sinalização de IL-8	2.14E00
Via Th2	2.09E00
Sinalização de IL-6	2.03E00
Sinalização de Interferon	2.03E00
Via de sinalização de IL-7	2.03E00

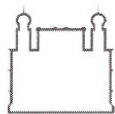
<b>Vias canônicas</b>	<b>-log(p-value) - P1 X P2</b>
Via Th1	2.71E00
Mecanismos moleculares de câncer	2.23E00
Via de ativação Th1 e Th2	2.19E00
Sinalização de IL-17	2.07E00

<b>Vias canônicas</b>	<b>-log(p-value) - Pacientes X Controles</b>
Sinalização p38 MAPK	5.17E00
Via de sinalização de neuroinflamação	4.86E00
Sinalização de apoptose	4.55E00
Via STAT3	4.38E00
Diferenciação de célula T Helper	3.48E00
Sinalização de IL-6	2.97E00
Sinalização de IL-8	2.5E00
Via de ativação Th1 e Th2	2.49E00
Via Th1	2.31E00
Sinalização de IL-17	2.18E00
Via Th2	2.18E00
Sinalização de IL-10	2.16E00
Sinalização mTOR	2.15E00
Sinalização ERK/MAPK	2

Vias canônicas extraídas do software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)



**Anexo 1 – Parecer Comitê de Ética 03/2008**

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Comitê de Ética**PARECER Nº 03/2008 – CEPESH- CPqRR**

Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 05/2008

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

Pesquisador Responsável: Luzia Helena Carvalho

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

Data de entrada no CEP: 14/02/2008

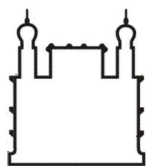
Ao se proceder à análise do protocolo em questão, constatou-se que o projeto atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

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

Situação: **PROJETO APROVADO**

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2008.

João Carlos Pinto Dias  
Coordenador*Dr. João Carlos Pinto Dias*  
COORDENADOR  
COMITÊ DE ÉTICA

**Anexo 2 – Parecer Comitê de Ética CAAE: 80235017.4.0000.5091**

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ****Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

**CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2018 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS**

**Projeto de Pesquisa:** “Estudo da contribuição de componentes da cascata da coagulação e inflamação para a patogênese da malária humana por **Plasmodium vivax**”.

**Pesquisadora Responsável:** Luzia Helena Carvalho

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou

**CAAE:** 80235017.4.0000.5091

**Situação:** PROJETO APROVADO (Número do Parecer: 2.580.866)

**Período de Vigência do Projeto:** de 04/04/2018 a 30/12/2021

Belo Horizonte, 04 de Abril de 2018

Marcelo Pascoal  
Coordenador do CEP-CPqRR