

**CLEBER MONTEIRO CRUZ**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITOTRIOSIDASE COMO UM  
MARCADOR PARA A MALÁRIA VIVAX: ABORDAGENS BIOQUÍMICAS E  
MOLECULARES**

**BELÉM/PA  
2010**

**CLEBER MONTEIRO CRUZ**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITOTRIOSIDASE COMO UM  
MARCADOR PARA A MALÁRIA VIVAX: ABORDAGENS BIOQUÍMICAS E  
MOLECULARES**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, ICB-UFPA.

BELÉM/PA  
2010

**CLEBER MONTEIRO CRUZ**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITOTRIOSIDASE COMO UM  
MARCADOR PARA A MALÁRIA VIVAX: ABORDAGENS BIOQUÍMICAS E  
MOLECULARES**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, ICB-UFPA.

Orientador: Prof. Dr Luiz Carlos Santana da Silva

Banca Examinadora

Avaliador<sub>1</sub>: Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (ICB / UFPA)

Avaliador<sub>2</sub>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jeannie Nascimento dos Santos (ICB / UFPA)

Avaliador<sub>3</sub>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Mousinho Ribeiro (ICB / UFPA)

Avaliador<sub>4</sub>(suplente): Prof. Dr. José Ricardo Vieira dos Santos (ICB / UFPA)

Avaliador<sub>5</sub>(suplente): Prof. Dr. José Eduardo Melo dos Santos (ICB / UFPA)

BELÉM / PA  
2010

Dedico este trabalho à minha  
amada mãe, Esmerina de Castro  
Cruz, *in memoriam*.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me concedido saúde, perseverança e ter iluminado meu caminho com grandes amizades e pessoas especiais que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho diante de tantas dificuldades e que faço questão de agradecê-las com essas palavras simples, mas que possuem um valor afetivo sem tamanho.

A minha família, por todo apoio e carinho, especialmente meu irmão Fábio, pelo companheirismo, amizade, e até pelos puxões de orelha quando assim foi necessário.

Ao meu orientador e grande amigo professor Luiz Carlos Santana da Silva pela orientação, paciência e confiança durante todos esses anos.

A professora Maristela Gomes e as biomédicas Eliane Silva e Sheyla Patrícia pelo apoio e grande aprendizado sobre Malária.

Ao inspetor Miguel Arcanjo e sua equipe da Unidade de Endemias da Cidade Nova VI, por ter me proporcionado um entendimento mais amplo sobre a Malária em nossa região.

À minha tia Maria de Jesus e sua família, pelo amor, carinho e acolhimento quando vim morar aqui em Belém e que não tenho como mensurar minha gratidão.

Ao meu grande amigo e irmão, José Chaváglio e sua família pelos momentos de descontração em Belém que me ajudavam a escrever com mais tranquilidade.

Aos meus amigos da minha querida cidade Abaetetuba: Éderson (Baixo); Paula; Anderson Silva (Bad Boy); Beninaldo; Valdir (Dri); Rivaldo (Tio Riva); Anderson Wilker (Farofa); Sérgio (Dublado); Ivison; Ademir; Maiky (Mará); Gláucia; Marcel, e John Lennon que, mesmo sem entenderem muito sobre o meu mestrado me apoiaram e incentivaram na produção deste trabalho.

Ao meu grande amigo Evandro Barros (Bené), pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos do LEIM, inclusive aqueles que não estão mais efetivos no laboratório: Elaina; Kléverton; Edson; Paty Feio; Nathália Serrão; Lorena Martins; Thaís Vieira; Pedro; Roseani; Camila; Livia; Nathália Lima; Vaneisse; Juliana Albuquerque; Juliana Burlamaqui; Juliana Ferreira; Carla Silva; Patrick; Marina; Rosely Cavaleiro; Raissa; Tássia; Felipe Tuji; Geison; Raisal; Carlos; Gustavo;

Brenda; Mislene; André Ricardo; Naiara; Priscila; Francília; Sérgio; Fernanda; Marla, Clebson e Erik. Amo muito vocês e já começo a sentir saudades de todos.

A todos, meus sinceros agradecimentos pelos momentos, situações e circunstâncias que nortearam este trabalho, onde cada um contribuiu à sua maneira para sua realização. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

## RESUMO

A quitotriosidase foi a primeira quitinase humana descrita e sua função fisiológica ainda não está totalmente esclarecida. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado sua participação como componente na resposta imune humana. Uma duplicação de 24pb no éxon 10 do gene *chit1* promove uma mudança na matriz de leitura do RNAm com deleção de 87 nucleotídeos. Esta alteração produzirá uma proteína sem atividade catalítica. Esta condição é chamada de deficiência de quitotriosidase e apresenta uma frequência aproximada de 6% de homozigose para a duplicação em diferentes grupos étnicos. A malária é uma parasitose endêmica da região amazônica causada por protozoários do gênero *Plasmodium* cujos sintomas incluem febre, dor de cabeça e vômitos, o que induz a uma resposta imunológica característica com o objetivo de combater essa patologia. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento da enzima quitotriosidase em pacientes acometidos por malária no estado do Pará e determinar a frequência da duplicação de 24pb no gene da quitotriosidase em uma amostra representativa. Foi realizada dosagem de quitotriosidase em 100 indivíduos saudáveis e 47 pacientes com malária para a análise. A análise molecular da duplicação de 24 pb foi realizada em 100 voluntários através de protocolo que incluiu as técnicas de extração de DNA, PCR e depois visualização em gel de agarose 2,5% para verificação dos fragmentos normais (homozigoto normal: 195pb) e com a duplicação de 24pb (homozigoto mutante: 219pb; heterozigoto: 219pb e 195pb). Este trabalho descreveu pela primeira vez na literatura científica a elevação dos níveis plasmáticos de quitotriosidase em pacientes acometidos por malária vivax em comparação com um grupo de indivíduos saudáveis. Não houve associação entre a parasitemia e os níveis plasmáticos de quitotriosidase nos pacientes com Malária. A análise molecular apresentou uma frequência de 72% de indivíduos homozigotos normais, 24% de indivíduos heterozigotos e 4% de homozigotos mutantes para duplicação de 24 pb. As frequências alélicas ficaram em torno de 84% para o alelo selvagem e 16% para o alelo mutante. Não foi encontrada correlação entre o genótipo e o fenótipo bioquímico (representado pelos níveis de quitotriosidase) no grupo controle.

## ABSTRACT

Chitotriosidase was the first described chitinase and its physiologic role is not entirely clear, although many studies have been showed its participation as a component of human immune response. A 24pb duplication on exon 10 of *chit1* gene results on RNAm frameshift, leading to a 87 nucleotides deletion. This alteration generates a protein with no catalytic activity at all. This condition is called chitotriosidase deficiency and presents a frequency close to 6% of homozygosis duplication in different ethnical groups. Malaria is an amazon endemic parasitosis caused by protozoaries of genus *Plasmodium* and causes symptoms as fever, headache and vomit, which leads to a characteristic immune response. The objective of this study was to evaluate the chitotriosidase enzyme behavior in patients suffering of malaria in Pará state and to determine the frequency of 24pb duplication on chitotriosidase gene in a representative sample. Chitotriosidase measurement was made in 100 healthy individual and in 47 malarial patients. The molecular analysis of the 24pb duplication was realized in 100 volunteers trough a protocol which included DNA extraction techniques, PCR and 2,5% agarose gel visualization to verify normal fragments (normal homozygote: 195pb) and the 24pb duplication (mutant homozygote: 219pb; heterozygote: 219pb e 195pb). This study described at first time on scientific literature the chitotriosidase plasmatic levels increasing in patients suffering of malaria *vivax* compared to healthy individual. No association was observed between parasitemia and plasmatic chitotriosidase levels in malarial patients. Molecular analysis showed a frequency of 72% normal homozygotes, 24% heterozygotes and 4% mutant homozygotes to 24pb duplication. Allelic frequencies were around 84% to wild allele and 16% to mutant allele. No correlation was found between genotype and biochemical phenotype (represented by chitotriosidase levels) on control group.



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>1.1. QUITOTRIOSIDASE</b>	01
1.1.1. Histórico	01
1.1.2. Quitotriosidase x Resposta Imune	03
1.1.3. Aspectos Bioquímicos	06
1.1.4. Aspectos Genéticos e Moleculares	07
<b>1.2. MALÁRIA</b>	10
1.2.1. Definição	10
1.2.2. Epidemiologia	10
1.2.3. Ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i>	11
1.2.4. Sintomas	14
1.2.5. Quitotriosidase X Malária	14
<b>1.3. JUSTIFICATIVA</b>	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	17
2.1. Objetivos Gerais	17
2.2. Objetivos Específicos	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	18
3.1. Material	18
3.1.1 Caracterização da Amostra	18
3.1.2. Material Biológico	19
3.1.3. Coleta e Armazenamento de Amostras	19
3.1.4. Aspectos Éticos	19
3. 2. Método	20
3.2.1. Curva Padrão para Metilumbeliferona	20
3.2.1.1. Reagentes	20
3.2.2. Protocolo para Ensaio Enzimático da Quitotriosidase	20
3.2.2.1. Reagentes	21
3.2.2.2. Procedimentos	22
3.2.2.3. Cálculos	22
3.2.3. Análise Molecular da Deficiência de Quitotriosidase	23
3.2.3.1. Extração de DNA	23
3.2.3.2. Amplificação do éxon 10 por PCR	23
3.2.3.3. Análise dos Produtos Amplificados	23
3.2.4. Análise Estatística	24
<b>4. RESULTADOS</b>	25
<b>5. DISCUSSÃO</b>	32
5.1. Dosagem de quitotriosidase: grupo controle x pacientes com malária	32
5.2. Atividade de quitotriosidase x parasitemia	35

5.3. Atividade de quitotriosidase x Genótipo	36
5.4. Freqüências da duplicação de 24pb em diferentes populações	37
<b>6. CONCLUSÕES</b>	41
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	42

## **ANEXOS**

Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	49
Termo de consentimento Livre e Esclarecido	50
Dados individuais de pacientes com malária: gênero, idade e parasitemia	51
Dosagens de Quitotriosidase: Pacientes com Malária e grupo controle.	53
Dosagens de Quitotriosidase: Pacientes com Malaria x Parasitemia.	55
Genotipagem individual da duplicação de 24pb no grupo controle	56

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

**Figura 1** – Duplicação de 24pb no Exon 10 do gene *chit 1*. (p 08).

**Figura 2** – Ciclo de vida do *Plasmodium*. (p 14).

**Figura 3** – Comparação da atividade de Quitotriosidase (nmoles/h/mL) entre pacientes com Malária e indivíduos do grupo controle. (p 26)

**Figura 4** – Relação entre os níveis de Quitotriosidase e o grau de Parasitemia. (p 28)

**Figura 5** – Produtos de PCR do éxon 10 do gene *chit1* visualizados em gel de agarose 2,5 % (p 29)

**Figura 6**- Relação entre os níveis plasmáticos de quitotriosidase (expressos em nmoles/h/mL) e genótipos para a duplicação de 24pb. (p 30)

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Frequência genotípica do gene *chit1* em diferentes grupos étnicos. (p 09).

**Tabela 2** - Número de casos de Malária na região Amazônica por Estado: 2002 - 2007 (p.11)

**Tabela 3-** Condições usadas nas reações de PCR. (p.23)

**Tabela 4** – Parasitemia dos pacientes positivos para Malária (p 25)

**Tabela 5** – Dosagem de quitotriosidase em pacientes positivos para malária e Grupo Controle (p 26)

**Tabela 6.** Dosagens plasmáticas individuais de quitotriosidase em pacientes positivos para malária e suas respectivas parasitemias. (p 27)

**Tabela 7** – Genótipo de indivíduos do grupo controle quanto à presença ou ausência da duplicação de 24 pares de bases. (p 30)

**Tabela 8** - Frequências Genotípicas e Alélicas encontradas no Gene *chit1* em 100 indivíduos (p 31)

**Tabela 9** - Frequências genotípicas e alélicas encontradas no gene *chit1* em diversos grupos (p 38)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CS:** circun esporozóita

***chit1*:** gene da quitotriosidase

**TNF $\alpha$ :** fator de necrose tumoral

**LPS:** lipolissacarídeo bacterial

**IFN $\gamma$ :** Interferon gama

**PI:** pH isoelétrico

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase

**TRAP:** trombospondina

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. QUITOTRIOSIDASE

#### 1.1.1. HISTÓRICO

As quitinases são enzimas que degradam a quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, substância presente na superfície externa de certos nematódeos, fungos, insetos, bactérias e peixes. A produção de quitinases é uma característica bioquímica de alguns organismos como uma resposta antiparasitária contra organismos que contém quitina (Boot *et al*, 1995)

Segundo dados da literatura os mamíferos eram incapazes de produzir endoglicosaminidases que fragmentassem quitina. Após estudos em pacientes acometidos pela Doença de Gaucher (DG), um Erro Inato do Metabolismo (EIM) caracterizado por acúmulo de glicocerebrosídeo (glicosilceramida) em diversos tecidos e principalmente no interior de lisossomos de macrófagos em virtude de uma deficiência na atividade da glicocerebrosidase, uma hidrolase lisossomal, esta concepção foi modificada (Beutler & Grabowski, 2001).

Hollak e colaboradores (1993), buscando biomarcadores associados às manifestações clínicas em pacientes com DG, observaram que os níveis da quitotriosidase estavam aumentados em até 1000 vezes em macrófagos ativados, quando comparados aos níveis do grupo controle.

A enzima foi chamada de quitotriosidase (**EC 3.2.1.14**) em virtude de sua capacidade de degradar o substrato artificial quitotriosídeo, e sua atividade foi associada à proliferação de macrófagos ativados (Hollak *et al*, 1993).

Foi observado que neutrófilos também podem expressar quitotriosidase e que, em leucócitos lisados, a atividade quitinolítica da quitotriosidase é significativamente

maior que em plasma, sendo que em leucócitos polimorfonucleados o aumento foi mais acentuado (Bouzas *et al*, 2003; Boussac & Garin, 2000).

A quitotriosidase foi purificada a partir de células do baço humano e mostrou uma atividade quitinolítica (Renkeman *et al*,1995). O cDNA foi clonado a partir de uma biblioteca de cDNA de macrófagos e, após a análise, constatou-se uma seqüência de aminoácidos homóloga à da família das enzimas quitinases, chamada de família 18 das glicosilhidrolases (Boot *et al*,1995).

Em alguns EIM caracterizados por depósito lisossomal, especialmente as esfingolipidoses como Doença de Niemann Pick (DNP), Gangliosidose-GM1 e doença de Krabbe foi observada uma moderada elevação da atividade de quitotriosidase no plasma (Guo *et al*, 1995).

A observação de Hollak e colaboradores (1993) de que a quitotriosidase seria um biomarcador para a DG inaugurou a perspectiva de um melhor monitoramento de pacientes acometidos por essa enfermidade, na medida em que os níveis da quitotriosidase poderiam traduzir o grau de eficiência da intervenção terapêutica nesses pacientes.

Pacientes com DG submetidos à terapia de reposição enzimática e transplante de medula óssea foram monitorados pela mensuração dos níveis de quitotriosidase e revelaram que a primeira é menos efetiva que a segunda no tratamento dessa patologia (Young *et al*, 1997). Esses dados sugeriam que a quitotriosidase corresponde a um parâmetro relevante para uma avaliação bioquímica dos pacientes com DG.

Czartoryska e colaboradores (2000) observaram que a atividade da quitotriosidase na terapia de reposição enzimática depende da continuidade da terapia, pois a quitotriosidase demonstra ser muito sensível à interrupção na administração da droga.

Outros membros da família das proteínas quitinases foram identificados: oviductina; glicoproteína de cartilagem humana 39 (HCgp-39/ YKL40); YKL-39; e TSA. Entretanto, ainda que exista uma significativa homologia entre as quatro quitinases humanas, apenas a quitotriosidase exibe atividade glicosil hidrolase. A função biológica deste grupo de proteínas ainda não está definida, entretanto tendo sido sugerida uma possível participação destas quitinases no processo de remodelação de tecidos, ou quimiotaxia (Malaguarnera, 2006).

### **1.1.2. QUITOTRIOSIDASE x RESPOSTA IMUNE**

O papel fisiológico da quitotriosidase ainda não está claro, entretanto, em virtude da forte homologia com quitinases, vários estudos sustentam a hipótese de que a quitotriosidase poderia estar associada ao sistema imune, ou seja, sua expressão refletiria uma defesa natural do organismo diante de algum patógeno que possuísse quitina, tal qual ocorre em outros organismos (Boot *et al*, 1995).

Estudos que concluíram que a quitotriosidase possui a propriedade de degradar a membrana quitinosa do fungo patogênico *Cândida albicans* têm contribuído para a validação dessa hipótese (Boot *et al*, 2001). Um estudo mostrou que humanos com deficiência de quitotriosidase são mais suscetíveis a infecções por filarídeos. Estes parasitas sintetizam quitina durante vários estágios de seu ciclo de vida, e a quitotriosidase interferiria em algum estágio do seu desenvolvimento (Choi *et al*, 2001).

Van Eijk e colaboradores (2005) observaram atividade antifúngica da quitotriosidase tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, evidenciada pela inibição no crescimento das hifas de colônias de *Cândida neoformans*. Nesse estudo, foi também relatado que, em modelos animais para candidíase e aspergilose sistêmica, a administração de quitotriosidase intraperitoneal proporcionou uma maior



sobrevivência deste grupo quando comparado aos animais com candidíase e aspergilose que não receberam quitotriosidase.

Bouzas e colaboradores (2003) observaram altos níveis de quitotriosidase em leucócitos polimorfonucleares, o que pode refletir que a enzima contribui para a destruição de patógenos.

Elevação nos níveis da quitotriosidase e acúmulo de RNAm de gene que sintetiza a quitotriosidase, chamado de *chit1*, são induzidos por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), sugerindo que a quitotriosidase não é apenas um biomarcador de macrófagos ativado em diversas doenças lisossomais, mas que a quitotriosidase pode ser considerada como um componente da resposta imunológica (Malaguarnera *et al*, 2005).

Os macrófagos possuem receptores de prolactina e quando este hormônio era introduzido no meio de cultura, os níveis de quitotriosidase ficavam elevados de maneira dose e tempo dependentes (Malaguarnera *et al*, 2004). As observações de que a prolactina (um hormônio polipeptídico produzido pela glândula pituitária) está associada com a resposta imune foi confirmada pela indução da expressão do gene da quitotriosidase em macrófagos humanos.

Elevação nos níveis plasmáticos de quitotriosidase foram observados em pacientes com beta talassemia maior, uma desordem hematológica caracterizada por uma deficiência na síntese da beta globina resultando em uma eritropoiese ineficiente e uma enorme expansão do sistema retículo-endotelial (Weatheral *et al*, 2001).

Altos níveis de quitotriosidase foram encontrados em indivíduos acometidos por beta talassemia maior, que é a forma mais grave da doença em que os pacientes necessitam periodicamente de transfusão de sangue, promovendo uma sobrecarga

de ferro no organismo, evidenciada pela grande excreção de ferro na urina. Em indivíduos com beta talassemia intermediária, que é uma forma atenuada desta patologia e que os pacientes não necessitam de transfusão de sangue, foi observada uma elevação moderada nos níveis e quitotriosidase (Altarescu *et al*, 2002; Barone *et al*, 1999).

Boot e colaboradores (1999) descreveram aumento significativo na atividade de quitotriosidase em tecidos ateroscleróticos, mostrando uma clara relação entre a expressão de quitotriosidase e a proliferação de macrófagos na parede dos vasos sanguíneos. A atividade da quitotriosidase mostrou uma relação com a gravidade da lesão aterosclerótica, sugerindo um possível papel da quitotriosidase com um marcador da extensão aterosclerótica.

Artieda e colaboradores (2003) demonstraram que pacientes com trombose e doença isquêmica do coração (DIC) apresentaram níveis plasmáticos de quitotriosidase significativamente elevados quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Entretanto, indivíduos com trombose exibiram uma expressão desta enzima superior quando comparada a indivíduos com DIC, sugerindo que em indivíduos com trombose o processo de aterosclerose é maior que em sujeitos com DIC.

Chong e colaboradores (2005) observaram em seus estudos que a quitotriosidase desempenha um papel crucial em condições patológicas como demência cerebrovascular em que o processo inflamatório está ativado (Chong *et al*, 2005).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa resultando em uma grande perda de função cognitiva, bem como na deposição de proteína Beta Amilóide, característica patológica marcante desta enfermidade. Uma característica do cérebro de pacientes é a liberação de citocinas e quemoquinas pró-inflamatórias através de microglias e astroglias ativadas, além do estresse oxidativo produzido

pela formação demasiada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chong *et al*, 2005).

Da mesma maneira que na DA, os eventos fisiopatológicos envolvidos na doença cerebrovascular isquêmica (DCI) e o comprometimento cognitivo parecem advir de mecanismos secundários substancialmente mediados por inflamação. Assim como na DA, a DCI exhibe uma superprodução de ROS, resultando em aumento nos níveis de peroxidação lipídica e, conseqüentemente, sugerindo a hipótese da participação da enzima quitotriosidase no processo inflamatório dessas patologias (Malaguarnera, 2006).

A análise dos níveis de diversas citocinas (IL-16, IL-18, TGF- $\beta$ 1) revelaram que IL-16 foi bastante elevada em DCI quando comparada a indivíduos com DA e foi significativa e positivamente correlacionada com a quitotriosidase, sugerindo que IL-16 poderia influenciar na expressão de quitotriosidase. A produção de IL-18 mostrou-se elevada e positivamente correlacionada com a quitotriosidase, tanto em DA como em DCI, sugerindo que os altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, incluindo a quitotriosidase e as citocinas produtoras de  $O_2^{\cdot-}$  agravariam a resposta inflamatória. (Malaguarnera, 2006).

A expressão de TGF- $\beta$ 1 em pacientes com DA foi inversamente correlacionada com a expressão de quitotriosidase, sugerindo que a ação de TGF- $\beta$ 1 neutraliza os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios, dessa forma confirmando que a expressão de quitotriosidase reflete a gravidade do processo inflamatório (Di Rosa *et al*, 2005, Schwab, *et al*, 2001).

### **1.1.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS**

A quitotriosidase é uma proteína formada por 466 aminoácidos e que apresenta isoformas heterogêneas quanto à massa e pH isoelétrico (pKi): uma

proteína de 50Kd e pI de 7,2; e uma proteína de 39 Kd e um pI de 8,0 (Boot *et al*, 1995).

A proteína de 50 Kd consiste de um domínio terminal que se liga à quitina, enquanto que a isoforma de 39 Kd corresponde a um domínio N-terminal. Inicialmente, a quitotriosidase é sintetizada como uma proteína de 50 Kd e uma parte dessa produção é direcionada para os lisossomos onde sofre um processamento proteolítico originando a isoforma de 39 Kd (Renkeman *et al*, 1997).

Wajner e colaboradores (2004) investigaram parâmetros bioquímicos da quitotriosidase no plasma de indivíduos normais e pacientes com DG e DNP, como a determinação de pH ótimo para a atividade da enzima; determinação da Curva de Michaelis–Menten observando  $K_m$  e Velocidade Máxima ( $V_m$ ); e análise da estabilidade térmica da enzima. Nesse estudo, foi constatado que o pH ótimo para indivíduos normais corresponde a 5,17. Em relação ao  $K_m$  observou-se que a média dos valores de  $K_m$  para a atividade da quitotriosidase em indivíduos normais foi de 4,7  $\mu$ M.

Quanto à  $V_m$  da quitotriosidase, indivíduos normais apresentaram o valor de 79  $\pm$ 61 nmol/h/mL. Em relação à estabilidade térmica, quando a quitotriosidase foi submetida a uma temperatura de 60°C em diferentes intervalos de tempo, foi observada uma maior estabilidade em indivíduos normais seguido dos pacientes com DG e, por último, os pacientes com DNP (Wajner *et al.*, 2004).

#### **1.1.4. ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES**

O gene que sintetiza a quitotriosidase *chit1* está localizado na região 1q31-q32, é composto por 12 éxons (tamanho variando entre 30 a 461 pares de bases) e apresenta 20 Kb de comprimento (Boot *et al*, 1998).

Uma condição bastante freqüente é a ausência de atividade da quitotriosidase. Essa condição foi denominada de **Deficiência de quitotriosidase** e que resulta de uma mutação no gene *chit1* que promove uma duplicação de 24 pares de bases no éxon 10, a qual leva à ativação de um sítio crítico de “*splicing*” que resulta na mudança de matriz de leitura do RNAm (Figura 01). Esta mutação resultará na deleção de 87 pares de bases da seqüência de nucleotídeos. Desta forma, a seqüência de aminoácidos da quitotriosidase perderá 29 resíduos de aminoácidos que fariam parte de sua estrutura. Todos os indivíduos homozigotos para a duplicação apresentam deficiência total de quitotriosidase (Boot *et al*, 1998; Fusetti *et al*, 2002).

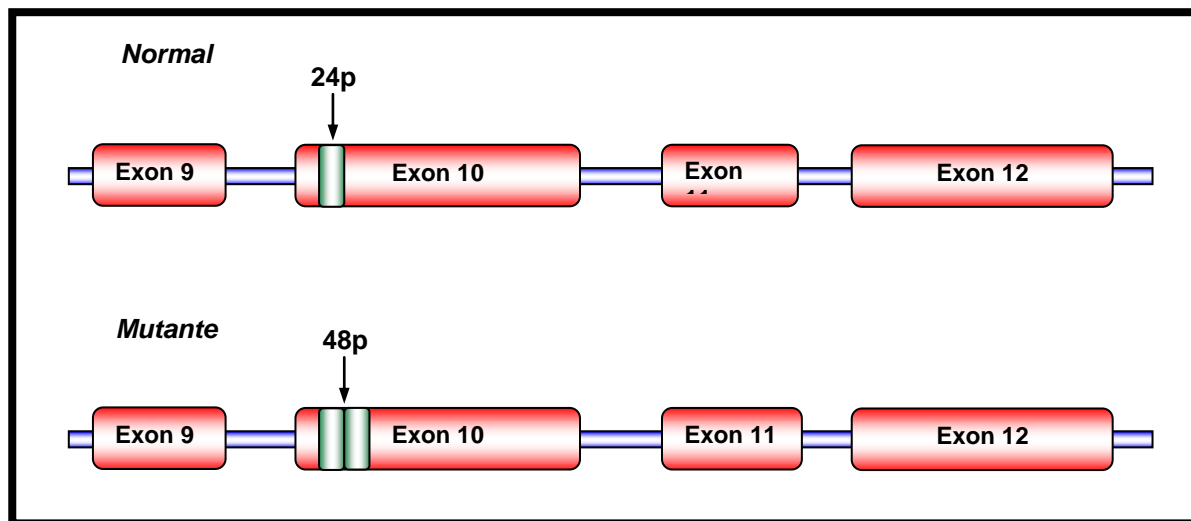


Figura 1 – Duplicação de 24pb no Exon 10 do gene *chit 1*. Adaptado de Boot *et al*, 1998.

A Deficiência de quitotriosidase apresenta uma distribuição pan-ética com uma freqüência média de 6% para homozigotos com a duplicação. Estudos estimam que 37% da população mundial é portadora do gene mutante da quitotriosidase (Tabela 1). Diante da alta incidência da deficiência de quitotriosidase, os pesquisadores argumentam que ela seria uma enzima redundante em humanos, e que esta deficiência seria de alguma forma compensada pelo organismo (Boot *et al*, 1998; Malaguarnera 2006).

Lee e colaboradores (2007) identificaram dois polimorfismos no gene da quitotriosidase, G354 e A442, cuja frequência é predominante em populações de origem africana. Estes polimorfismos também estão associados com a redução na atividade da quitotriosidase.

**Tabela 1 – Frequência Genotípica do gene *chit1* em diferentes grupos étnicos.**

<b>População</b>	<b>Genótipo</b>		
	<b>Homozigoto Normal</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto Mutante</b>
<b>Holanda</b>	58,5%	35,1%	6,4%
<b>Judeus Ashenazi</b>	60,3%	33,8%	5,9%
<b>Portugal</b>	60,0%	37,3%	2,7%
<b>Espanha</b>	54,3%	39,6%	6,0%
<b>Sicília</b>	51,0%	44,5%	5,5%
<b>Sardenia</b>	65,6%	32,7%	3,7%
<b>Burquina Faso</b>	98,0%	2,0%	0%

Adaptado de Malaguarnera, 2006.

As observações de que a quitotriosidase exibe uma propriedade de defesa diante de patógenos contendo quitina levam à dedução de que esta enzima é filogeneticamente muito conservada, como confirmada pelo papel primitivo dos macrófagos no mecanismo de defesa diante de protozoários e helmintos (Malaguarnera *et al*, 2004).

## **1.2. MALÁRIA**

### **1.2.1. DEFINIÇÃO**

A malária é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e cada uma de suas espécies determina aspectos clínicos diferentes para a enfermidade, sendo quatro espécies as: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale* (Neves, 2004).

O protozoário é transmitido ao homem pelo sangue, geralmente por mosquitos do gênero *Anopheles*, ou, mais raramente, por outro meio que coloque o sangue de uma pessoa infectada em contato com o de uma sadia, como, por exemplo, o compartilhamento de seringas (consumidores de drogas), transfusão de sangue, ou até mesmo, de mãe para feto, na gravidez. (Torres & Bonini-Domingos, 2005).

### **1.2.2. EPIDEMIOLOGIA**

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que o impacto da Malária sobre as populações humanas continua aumentando: ocorre em mais de 90 países, pondo em risco cerca de 40% da população mundial – estima-se que ocorram de 300 a 500 milhões de novos casos, com média de um milhão de mortes por ano. Representa, ainda, risco elevado para viajantes e migrantes, com casos importados em áreas não-endêmicas (OMS/ WHO 2003).

No Brasil, o maior número de casos é registrado na região Amazônica, cujas condições ambientais e socioculturais favorecem a expansão de sua transmissão. Sendo que o estado do Pará apresenta um dos maiores índices de transmissão de malária, mesmo apresentando uma redução de casos nos últimos anos de acordo com o DATA SUS (Tabela 2).

**Tabela 2 - Número de casos de Malária na região Amazônica por Estado: 2002 – 2007.**

<i>Estado Ano</i>	<i>2002</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>
<b>Acre</b>	9.216	12.247	31.606	57.242	93.863	51.278
<b>Amazonas</b>	70.223	140.642	146.296	226.372	185.747	196.851
<b>Amapá</b>	16.257	16.650	20.252	28.059	29.290	21.956
<b>Maranhão</b>	16.000	11.017	14.092	11.193	9.519	6.619
<b>Mato Grosso</b>	7.085	5.022	6.446	8.437	6.650	6.761
<b>Pará</b>	149.088	115.605	107.026	123.432	101.763	76.268
<b>Rondônia</b>	71.224	93.786	106.634	118.631	101.640	81.879
<b>Roraima</b>	8.036	11.819	25.811	31.964	20.646	15.231
<b>Tocantins</b>	1.130	1.207	848	717	379	288
<b>Total</b>	<b>348.259</b>	<b>407.995</b>	<b>459.013</b>	<b>606.050</b>	<b>549.497</b>	<b>457.131</b>

Fonte: Secretaria de Saúde do Estado do Pará (SESPA)

### **1.2.3. CICLO DE VIDA DO *Plasmodium***

O parasito é transmitido ao homem pelos mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (Figura 2). No homem (hospedeiro intermediário), o parasito desenvolve o ciclo assexuado; enquanto que no mosquito (hospedeiro definitivo), o parasito desenvolve o ciclo sexuado. O mosquito inocula os esporozoítos na derme no momento do repasto sangüíneo, em seguida esses parasitos atravessam o endotélio vascular e alcançam o fígado, em menos de 30 minutos. A interação dos esporozoítos com as células da derme é ainda pouco conhecida, mas deve ser importante, uma vez que pode influenciar a ativação de células do sistema imune inato, e assim, impedir o estabelecimento da infecção (Mota & Rodrigues, 2004).

Os mecanismos utilizados pelos parasitos para romper a membrana plasmática das células do hospedeiro ainda não são totalmente conhecidos, mas tem sido descrito que a liberação de lipases, proteases e perforinas facilitam a invasão (Blackman, 2004). Os esporozoítos possuem proteínas que contêm domínios de perforinas e foram localizadas em organelas secretórias, como o micronema. Foi



demonstrado que após a invasão do parênquima hepático, o esporozoíto continua a migrar entre vários hepatócitos até ocorrer a interação parasito/hospedeiro que melhor favoreça a sua invasão e a diferenciação (Mota & Rodriguez, 2004).

O desenvolvimento do ciclo hepático também depende de interações moleculares entre o parasito e o hospedeiro. Várias moléculas que participam do processo de invasão têm sido identificadas nas organelas do complexo apical, o qual caracteriza os parasitos do filo Apicomplexa. Este complexo é formado pelas organelas roptrias, micronema e grânulos densos. Entre as proteínas secretadas pelo complexo apical estão a proteína circunesporozoíta (CS) e a proteína relacionada à trombospondina (TRAP). A CS é a proteína mais expressa na superfície do esporozoíto e facilita o processo de reconhecimento da célula hospedeira pelo parasito. A TRAP é secretada pelos micronemas e é uma das proteínas necessárias para a motilidade da membrana do parasito no momento da invasão (Sinnis & Sim, 1997; Gaur *et al.*, 2004).

Durante a invasão, inicia-se a formação do vacúolo parasitóforo, nesse momento, serão expressas várias proteínas na membrana desse vacúolo, as quais podem contribuir para a evasão da resposta imune. Após a invasão, o esporozoíto se diferencia em trofozoíto hepático, que se desenvolve em esquizonte hepático. Nesta etapa do ciclo, o parasito realiza reprodução assexuada por esquizogonia. Os esquizontes hepáticos se rompem e podem liberar até 40.000 merozoítos para a circulação, levando ao aumento da densidade parasitária que dará início ao ciclo sanguíneo

O ciclo sanguíneo ou eritrocítico se inicia quando os merozoítos são liberados e invadem os eritrócitos. Como já descrito para a fase hepática ou pré-eritrocítica, a função das organelas do complexo apical é conservada nestas duas fases, ou seja, são expressas proteínas que desempenham funções semelhantes, relacionadas à invasão e ao estabelecimento da infecção nos eritrócitos. Portanto, a invasão celular

é mediada por proteínas de superfícies, assim como, proteínas liberadas pelo complexo apical (Sinnis & Sim, 1997; Bannister *et al.*, 2000).

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é um processo complexo, composto pelas seguintes etapas: reconhecimento por proteínas de superfície, reorientação apical, formação da junção irreversível e do vacúolo parasitóforo, além das modificações do citoesqueleto da célula hospedeira (Gaur *et al.*, 2004).

A primeira etapa do processo de invasão é o reconhecimento das moléculas do merozoíto, que participam do contato inicial, por ligantes na superfície do eritrócito. Nessa fase, as principais proteínas envolvidas são da família das Proteínas de Superfície do Merozoíto . (Gaur *et al.*, 2004, Goel *et al.*, 2003).

Após esse contato inicial, ocorre a formação de domínios de reconhecimento, os quais permitem a reorientação apical do merozoíto. Essa junção é estabilizada, ocorrendo aumento na eletrondensidade desta região de contato entre o eritrócito e o merozoíto. Nesta etapa, a principal molécula envolvida é o Antígeno-1 da Membrana Apical.

A etapa posterior é a invasão dos eritrócitos, da qual participam o antígeno ligante de eritrócito (EBA-175), no caso da invasão pelo *P. falciparum*, e as proteínas, que se ligam à molécula Duffy (Proteína Ligante de Duffy) e ao reticulócito (Proteína Ligante de Reticulócito), no caso do *P. vivax*. Após a invasão, os merozoítos se diferenciam em trofozoítas, que evoluem para esquizontes. Durante a esquizogonia sangüínea são gerados novos merozoítos que continuam o ciclo com a invasão de outros eritrócitos.

Alguns merozoítos evoluem para formar os gametócitos femininos ou macrogametócito e masculinos ou microgametócito, que permitem a continuidade do ciclo. Os gametócitos são ingeridos no momento do repasto sangüíneo. No mosquito, o macrogametócito se diferencia em macrogameta ou gameta feminino e o microgametócito sofre diferenciação pelo processo de exflagelação, originando o

microgameta ou gameta masculino. Após a união dos gametas, ocorre a formação do zigoto (oocineto), que penetra no intestino médio do mosquito, e permanece entre o epitélio e a lâmina basal deste tecido, originando o oocisto. Esta forma passa por sucessivas mitoses e dá origem aos esporozoítos, os quais alcançam a circulação linfática do mosquito e se acumulam nas glândulas salivares. No momento do repasto, os esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, é mantida a cadeia de transmissão da malária.

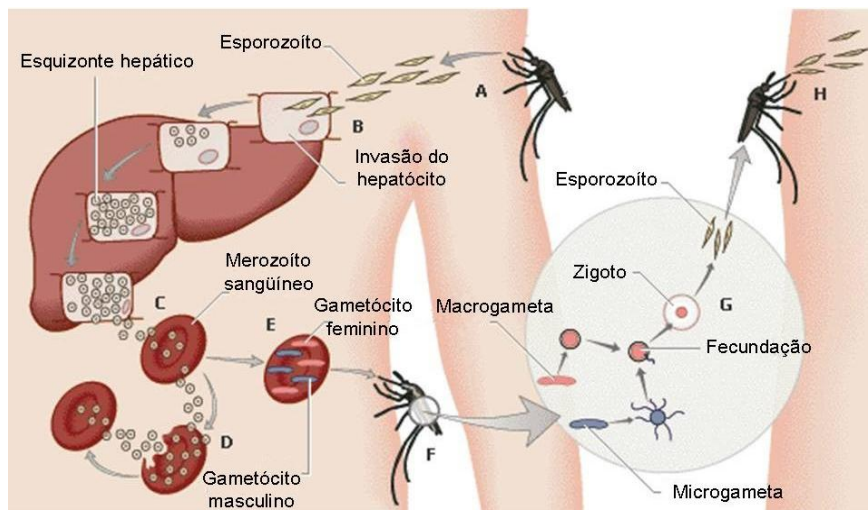


Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium*. Fonte: Adaptado de [www.encarta.msn.media](http://www.encarta.msn.media)

#### 1.2.4. SINTOMAS

Os sintomas mais freqüentes na malária são febre e calafrios que podem ser acompanhados de dores de cabeça, mialgia, fraqueza, náusea e vômitos. Outros sintomas clínicos podem estar presentes como esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, hipoglicemia, disfunção renal ou pulmonar, e mudanças neurológicas. O quadro clínico depende da espécie infectante, nível de parasitemia e da resposta imune do indivíduo (Leorati, 2004).

#### 1.2.5. QUITOTRIOSIDASE X MALÁRIA

A produção da quitotriosidase está associada à atividade de macrófagos ativados (Hollak *et al*, 1993) e, mesmo com sua função fisiológica pouco esclarecida, vários

estudos sugerem que a enzima é um componente do sistema imune (Bouzas *et al*, 2003; Van Eijk *et al*, 2005).

Barone e colaboradores (2003) observaram uma elevação nos níveis de quitotriosidase em pacientes com malária na África e sugeriram que a destruição de células vermelhas induzidas pela malária estimularia a produção de quitotriosidase, uma vez que a infecção ativaria o sistema imune pela deposição de subprodutos decorrentes da degradação das hemácias que ficariam acumulados em macrófagos.

Além disso, a sobrecarga de ferro intracelular poderia ser um dos fatores responsáveis por essa elevação, uma vez que recentes estudos demonstram que experimentalmente em camundongos, uma sobrecarga de ferro promove elevação nos níveis de quitotriosidase (Meraïtou *et al*, 1997).

Diante de seus achados Barone e colaboradores (2003) inferiram que a dosagem de quitotriosidase poderia ser um instrumento muito útil no monitoramento de pacientes com malária e, portanto, os altos níveis plasmáticos de quitotriosidase em indivíduos afetados pela malária representariam uma reação da fase aguda desta patologia, estes dados confirmaram que os níveis de quitotriosidase representariam um importante biomarcador da atividade da doença. A gravidade e as manifestações clínicas fatais da doença seriam os resultados da ativação anormal de macrófagos, o que poderia ser expressa pela dosagem dos níveis de quitotriosidase.

Outro aspecto relevante é a alta frequência da deficiência de quitotriosidase (conferida pelo alelo mutante para a duplicação de 24 pares de base em homozigose) em diversos grupos étnicos, o que gera a especulação sobre uma possível desvantagem seletiva para os portadores da mutação em locais endêmicos para parasitoses (Malaguarnera *et al*, 2004).

Apesar do papel da quitotriosidase como fator seletivo ainda não estar elucidado, alguns trabalhos têm contribuído para essa hipótese. Em um trabalho

desenvolvido na população negra do Sub-Saara, uma região endêmica para a malária e outras doenças infecciosas causadas por patógenos contendo quitina como nematódeo, foi observada uma baixa incidência da deficiência de quitotriosidase. A partir desses dados, pode-se postular que a persistência de parasitoses poderia ter preservado o gene selvagem em algumas regiões. É interessante notar que em populações do Mediterrâneo, onde a malária foi erradicada após a Segunda Guerra Mundial os níveis de quitotriosidase são menores que na população do Sub-Saara (Malaguarnera *et al*, 2004).

Dessa forma, a ausência do polimorfismo representaria um fator de proteção em alguns grupos étnicos diante de fatores ambientais desfavoráveis como, por exemplo, a incidência de parasitoses (Malaguarnera *et al*, 2004).

### **1.3. JUSTIFICATIVA**

A funcionalidade da quitotriosidase tem sido alvo de diversas pesquisas em variados segmentos da ciência, desde a biologia molecular à patologia, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre essa enzima e seu papel fisiológico no corpo humano.

Diante das evidências da participação da quitotriosidase como componente da resposta imune e pelo motivo que o Estado do Pará pertencer a uma região endêmica para malária, uma patologia que exhibe uma resposta imunológica característica, este estudo faz-se relevante na medida em que contribuirá para fornecer informação complementar sobre o envolvimento da quitotriosidase no processo fisiopatológico da Malária.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

- ✓ Avaliar a enzima quitotriosidase como um biomarcador usando como modelo de estudo a malária e correlacionar sua atividade enzimática com os genótipos encontrados em uma amostra de indivíduos não parasitados.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Estabelecer valores de referência para a enzima quitotriosidase em uma amostra representativa da população;
- ✓ Correlacionar os níveis plasmáticos de quitotriosidase com a parasitemia presente em pacientes acometidos por Malária;
- ✓ Investigar a frequência da duplicação de 24 pares de base no gene da quitotriosidase em uma amostra representativa.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1. Caracterização da Amostra**

A amostra foi composta por indivíduos sadios e pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de Malária *vivax*, provenientes da Unidade de Endemias da Cidade Nova VI no município de Ananindeua-PA. Os dados referentes ao quadro clínico, idade e gênero foram obtidos a partir dos prontuários analisados no período de março de 2006 a abril de 2007.

O grupo amostral para este estudo constou de 154 indivíduos distribuídos da seguinte forma:

- Subgrupo A: 100 indivíduos sadios (47 homens e 53 mulheres): neste grupo foi realizado ensaio enzimático para determinar a atividade de quitotriosidase com o objetivo de estabelecer os valores de referência em nosso meio. Antes da confirmação de participação voluntária nos testes, os indivíduos deste grupo eram argüidos quanto ao seu estado clínico no que se referem a patologias que pudessem interferir nos resultados obtidos na dosagem plasmática de quitotriosidase, tais como infecções fúngicas, asma, ou doenças cardíacas crônicas. Ainda nesse mesmo grupo foi realizada a análise molecular para investigar a presença da duplicação de 24 pares de base no gene da quitotriosidase.
- Subgrupo B: 54 (35 homens e 19 mulheres): pacientes com idade variando entre 8 e 69 anos, com diagnóstico laboratorial de Malária realizado na unidade de endemias da cidade nova VI, em Ananindeua: neste grupo foi realizado ensaio enzimático para determinar a atividade de quitotriosidase, com amostras coletadas antes do tratamento, com o objetivo de verificar se havia algum aumento dos níveis plasmáticos de quitotriosidase nestes pacientes.

### **3.1.2. Material Biológico**

O material biológico necessário para a investigação constou de 154 amostras de sangue que foram utilizados no ensaio enzimático da quitotriosidase (154) e estudo molecular (100) da Deficiência de Quitotriosidase.

### **3.1.3. Coleta e Armazenamento das Amostras**

Para a identificação da duplicação de 24 pares de base no gene *chit1* uma amostra de sangue total (5 a 10mL) foi obtida por punção venosa e colhida em frascos de vidro de 5mL (tipo *vacutainer*), contendo 54 $\mu$ L de EDTA . A amostra foi adequadamente identificada (nome do paciente e data de colheita) e armazenada a -20°C até o momento da extração de DNA.

Para o **Ensaio enzimático da Quitotriosidase** uma amostra de sangue (10 mL) foi coletada em seringa com heparina. Após a coleta, o sangue foi centrifugado para obtenção de plasma, o qual foi posteriormente armazenado a -20°C até o momento do ensaio.

### **3.1.4. Aspectos Éticos**

Este trabalho levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Para tanto, a avaliação ética desta pesquisa se baseará em quatro pontos fundamentais: qualificação da equipe de pesquisadores e do próprio projeto; na avaliação da relação risco-benefício; no consentimento livre e esclarecido e na avaliação prévia por um Comitê de Ética em Pesquisa. O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Estado do Pará avaliou e aprovou este projeto no dia 14 de Março de 2006 (anexos 1 e 2).



## **3.2. MÉTODO**

### **3.2.1. CURVA PADRÃO PARA METILUMBELIFERONA**

#### **3.2.1.1. REAGENTES:**

##### **a) Metilumbeliferona 25 mM**

Pesar 49,5 mg de metilumbeliferona. Transferir o reagente para um copo Becker pequeno e dissolver em 5 mL de água destilada. Após completa dissolução, transferir o reagente para um balão volumétrico de 10 mL e completar o volume, homogeneizando bem com movimentos de inversão do balão. Armazenar em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### **b) Metilumbeliferona 250 $\mu\text{L}$**

Retirar 100  $\mu\text{L}$  de metilumbeliferona 25 mM e colocar em um copo Becker pequeno e adicionar 5mL de água destilada. Transferir o reagente para um balão volumétrico de 10 mL e completar o volume, homogeneizando bem com movimentos de inversão. Armazenar em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### **c) Metilumbeliferona 2,5 $\mu\text{M}$**

Retirar 100  $\mu\text{L}$  de metilumbeliferona 250  $\mu\text{M}$ , colocar em um copo Becker pequeno e adicionar 5mL de água destilada. Transferir o reagente para um balão volumétrico de 10 mL e completar o volume, homogeneizando bem com movimentos de inversão. Armazenar em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2. PROTOCOLO PARA ENSAIO ENZIMÁTICO DA QUITOTRIOSIDASE**

(Adaptado de Hollak *et al*, 1993).

### 3.2.2.1. Reagentes:

#### a) 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-N-N'-N''-triacetilquitotriosideo 0,026 mM

- ⇒ Pesar 1mg de 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-N-N'-N''-triacetilquitotriosidase.
- ⇒ Medir 23 mL do tampão citrato 100mM-fosfato 200mM
- ⇒ Completar com água destilada até o volume de 50 mL. Manter em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### b) Tampão citrato 100 mM – fosfato 200mM pH 5,2

##### ▪ Solução I:

- ⇒ Pesar 3,84 g de ácido cítrico anidro.
- ⇒ Dissolver até o volume de 100mL com água destilada.

##### ▪ Solução II:

- ⇒ Pesar 2,84 G de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  anidro.
- ⇒ Dissolver até o volume de 50 mL com água destilada.

##### ▪ Solução final:

- ⇒ 23,3 mL da solução I.
- ⇒ 26,7mL da solução II.
- ⇒ Adicionar 40 mL de água e calibrar o pH para 5,2. Em seguida, completar com água destilada até o volume de 100mL.

#### c) Ácido cítrico 0,2 M:

- ⇒ Pesar 3,84g de ácido cítrico.
- ⇒ Dissolver até o volume de 100 mL com água destilada. Conservar em geladeira.

**d) Albumina 10mg/ mL:**

⇒ Pesar 100 mg de albumina.

⇒ Dissolver em 10 mL de água em balão volumétrico. Conservar em geladeira.

**e) Tampão Glicina/NaOH pH 10,3:**

Pesar 37,535g de glicina e 12,5g de NaOH, transferir para um bequer e dissolver com 800mL de água destilada, acertar o pH 10,3 com NaOH 10M. Completar o volume com água até 1000 mL.

**3.2.2.2. Procedimentos:**

O quadro abaixo mostra os procedimentos iniciais para o ensaio da enzima quitotriosidase:

**PROTOCOLO PADRÃO DE CURVA DE METILUMBELIFERONA**

	<b>Branco (sem alb.)</b>	<b>Branco (com alb.)*</b>	<b>Testes</b>
<b>Água destilada</b>	5 uL		-
<b>Albumina 1%*</b>		5 uL	-
<b>Amostra(acidificada)</b>	-	-	5 uL
<b>Substrato</b>	100 uL	100 uL	100 uL

- Incubar 15 minutos a 37°C.
- Parar a reação com 1 mL de tampão glicina pH 10,3. Ler a fluorescência no espectrofluorômetro. Excitação 365nm - Emissão 450 nm.
- Usar a curva de 4-metilumbeliferil.

**3.2.2.3. Cálculos:**

QM = concentração MU/ fluorescência.

nmoles/h/mL = (fluorescência teste - branco) X QM X 880

### 3.2.3. ANÁLISE MOLECULAR DA DEFICIÊNCIA DE QUITOTRIOSIDASE

#### 3.2.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por Sambrook & Russel, 2001.

#### 3.2.3.2. Amplificação do éxon 10 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a identificação da duplicação de 24 pares de bases foi realizada amplificação do gene *chit 1* na região do Exon 10 (figura 01) através da técnica de PCR. Foram utilizados iniciadores (*primers*) específicos: **F 5' –GAA GAG GTA GCC AGG CTC TGG- 3'** e **R 5' – CTG CCG TAG CGT CTG GAT GAG -3'** (Lee *et al*, 2007). As condições de PCR utilizadas estão destacadas a seguir:

**Tabela 3. Condições usadas nas reações de PCR.**

<b><i>Estágios</i></b>	<b><i>Número de ciclos</i></b>	<b><i>Temperatura</i></b>	<b><i>Tempo</i></b>
Desnaturação inicial	1	94°C	4'
Desnaturação		95°C	1'
Anelamento	35	61,5°C a 62°C	30''
Extensão		72°C	30''
Extensão final	1	72°C	5'

Adaptados de Lee *et al*, 2007.

#### 3.2.3.3. Análise dos Produtos Amplificados

Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% com brometo de etídio para visualização das bandas de interesse. Um fragmento de 195 pb corresponde ao alelo selvagem (homozigoto

selvagem); um fragmento de 219 pb corresponde ao alelo mutante (homozigoto recessivo), indicando deficiência total da enzima quitotriosidase; dois fragmentos (um com 195 pb e outro com 219 pb) corresponde ao padrão de heterozigoto para a duplicação de 24 pb.

#### **3.2.4. Análise Estatística**

A análise descritiva inicial dos dados foi baseada a partir da determinação de média e desvio padrão dos níveis de quitotriosidase através do programa BioEstat 5.0 (teste T e análise de regressão).

O teste “T” de *Student* é um teste estatístico que estabelece uma comparação entre duas amostras com o objetivo de constatar se há similaridade ou discrepância entre os valores obtidos nas amostras de interesse.

O teste de regressão é utilizado para averiguar se há algum grau de dependência entre duas variáveis, ou seja, alguma correlação entre elas.

Para averiguar uma possível correlação entre os genótipos para a duplicação de 24pb e os níveis plasmáticos de quitotriosidase no grupo controle foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

O teste de Mann-Whitney, conhecido também como teste U, é uma prova não paramétrica destinada a comparar duas amostras independentes do mesmo tamanho ou desiguais, cujos escores tenham sido mensurados pelo menos a nível cardinal.

A frequência da duplicação de 24 pares de base foi obtida a partir de contagem alélica simples, dividindo a quantidade de alelos mutantes encontrados pelo número total de alelos analisados. Os dados obtidos foram comparados com os observados na literatura através da análise do Qui-Quadrado.

Para efeito de cálculos estatísticos foram excluídas as análises que deram resultados não detectados para a atividade enzimática de quitotriosidase.

#### 4. RESULTADOS

A Tabela 4 mostra dados referentes à parasitemia dos pacientes com malária. Quanto à parasitemia observou-se uma variação de 500 a 88000 parasitos/mm<sup>3</sup>, com uma média de 9860 parasitos/mm<sup>3</sup> e desvio padrão de 17835 parasitos/mm<sup>3</sup>. Sete pacientes foram classificados quanto à parasitemia através de cruces que representam uma escala para a classificação do paciente nesse parâmetro, desses 7 pacientes 2 foram classificados como +; 4 como ++ e 1 como ++++. Diante desta circunstância estes pacientes não foram incluídos nos cálculos estatísticos que relacionaram parasitemia x dosagem de quitotriosidase.

**Tabela 4 – Parasitemia dos pacientes positivos para Malária**

	N	Parasitemia (parasitos/mm <sup>3</sup> )
Pacientes com Malária	47	Média / DP 9860 ± 17835

Na Tabela 5 estão representados os valores de quitotriosidase obtidos de pacientes com malária e indivíduos do grupo controle. No primeiro grupo os níveis da enzima variaram de 0 a 221,76 nmoles/h/mL, enquanto que em indivíduos sadios os níveis variaram de 0 a 114,95 nmoles/h/mL. Os indivíduos acometidos por Malária apresentaram atividade da enzima quitotriosidase significativamente maior (69,85±24,8 nmoles/h/mL) do que aqueles do grupo controle (38,03±19,8 nmoles/h/mL) (p<0,05). Esta diferença entre os grupos pode ser visualizada na figura 3.

**Tabela 5 – Dosagem de quitotriosidase em pacientes positivos para malária e Grupo Controle.**

Amostra analisada	Dosagem de Quitotriosidase
Grupo controle (100)	0 - 114,95 38,03±19,8
Pacientes com Malária (54)	0- 221,76 69,85±24,8

Atividade expressa em nmoles/h/mL

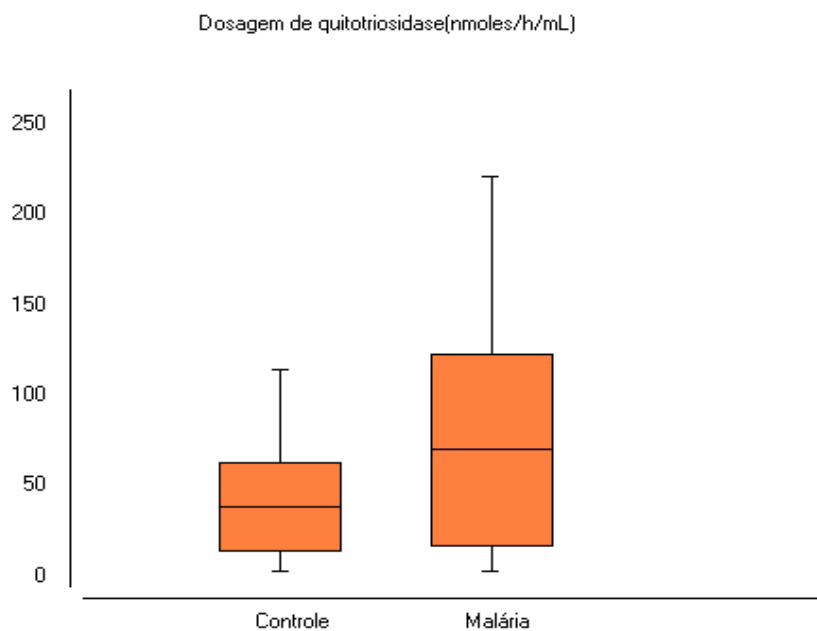


Figura 3 - Comparação da atividade de Quitotriosidase (nmoles/h/mL) entre pacientes com Malária e indivíduos do grupo controle.

A Tabela 6 exibe os resultados pareados da dosagem de quitotriosidase em indivíduos com Malária e suas respectivas parasitemias.

**Tabela 6. Dosagens plasmáticas individuais de quitotriosidase em pacientes positivos para malária e suas respectivas parasitemias.**

<b>Identificação</b>	<b>Dosagem de quitotriosidase</b>	<b>Parasitemia(parasitos/mm<sup>3</sup>)</b>
M-01	97,104	1700
M-02	48,84	2500
M-03	3,828	2000
M-04	33,212	500
M-05	77,26	10000
M-06	76,49	500
M-09	88,57	3000
M-10	22,00	2000
M-11	68,90	2000
M-12	11,48	12500
M-13	56,91	10000
M-14	25,34	10000
M-15	14,04	3000
M-17	24,57	15000
M-18	28,09	1000
M-19	221,76	3000
M-21	67,58	10000
M-23	71,28	88000
M-24	48,31	10000
M-25	50,4	10000
M-26	43,56	2500
M-27	29,57	10000
M-29	<b>0,0</b>	10000
M-30	92,6	2500
M-31	92,4	2000
M-34	60,19	10000
M-35	80,25	88000
M-37	20,06	500
M-38	80,78	6000
M-39	170,54	10000
M-40	8,97	10000
M-41	10,96	20000
M-42	120,12	5000
M-43	92,66	2500
M-44	99,00	17500
M-45	29,7	3500
M-46	39,07	3500
M-47	29,30	1500
M-48	56,60	20000
M-49	146,52	3500
M-50	186,84	1000
M-51	167,17	3500
M-52	98,34	1000
M-53	49,71	3000
M-54	49,71	10000



A figura 4 apresenta a análise de regressão entre a atividade da enzima quitotriosidase e os níveis plasmáticos de parasitas por  $\text{mm}^3$ . O valor  $F = 0.0137$  (regressão) não foi significativo ( $p = 0.05$ ). Os dados da correlação entre as duas variáveis permitem verificar que o coeficiente de regressão não difere significativamente ( $b = 0.0001$ ;  $t_c = 0.1171$ ;  $p=0.05$ ).

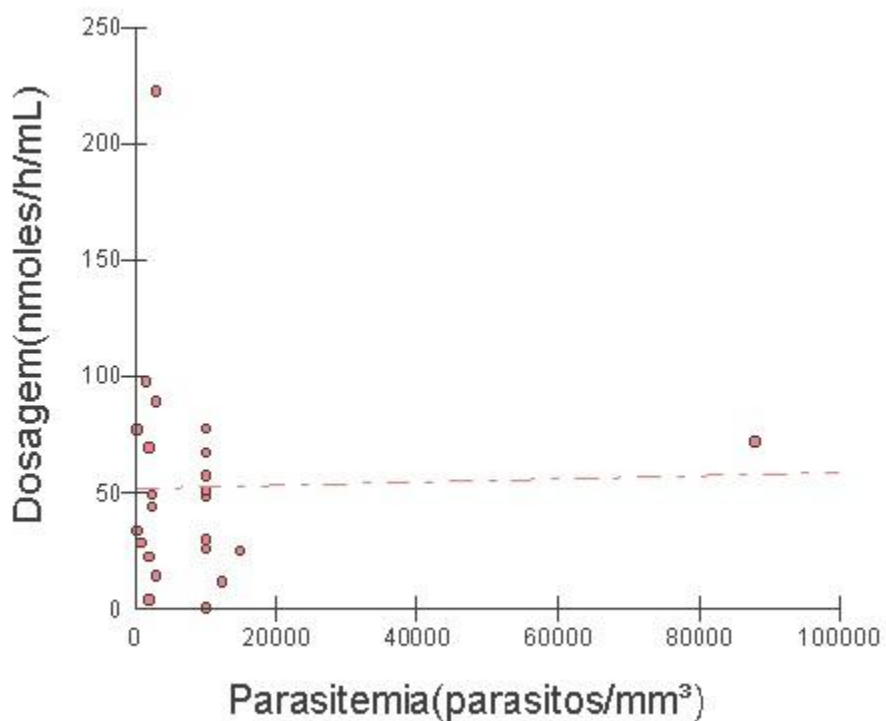
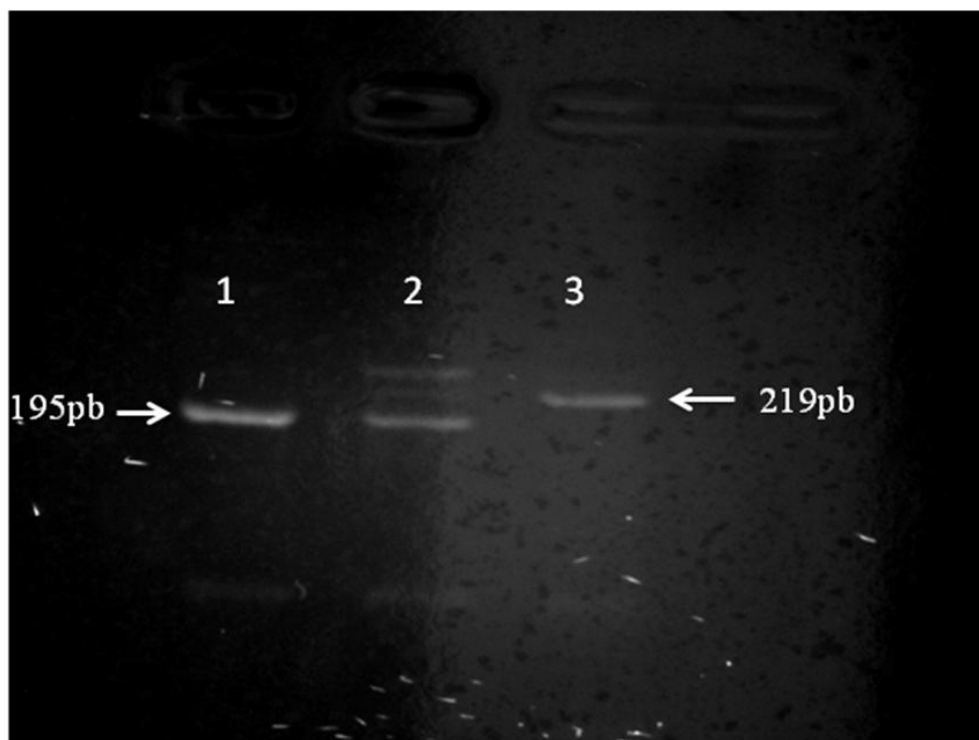


Figura 4 - Relação entre os níveis de Quitotriosidase e o grau de Parasitemia.

Na figura 5 estão representados os padrões de bandas das amostras de 3 indivíduos submetidos à reação de PCR e eletroforese em gel de agarose 2,5%.



**Figura 5 – Produtos de PCR do éxon 10 do gene *chit1* visualizados em gel de agarose 2,5 %.** Canaleta 01: homocigoto selvagem; canaleta 02: heterocigoto para duplicação de 24 pares de base; canaleta 03: homocigoto para a duplicação de 24 pares de base.

A Tabela 7 apresenta o genótipo (homocigoto normal, homocigoto mutante e heterocigoto) de 100 indivíduos quanto à presença ou ausência da duplicação de 24 pares de base.

**Tabela 07 – Genótipo de indivíduos do grupo controle quanto à presença ou ausência da duplicação de 24 pares de bases.**

	Homozigoto normal	Homozigoto mutante	Heterozigoto	Total Analisado
<b>Grupo controle</b>	<b>72</b>	<b>04</b>	<b>24</b>	<b>100</b>

Na figura 6 estão representados os dados referentes à investigação da correlação genótipo (homozigoto normal e heterozigoto para a duplicação de 24 pb) x fenótipo bioquímico (representado pelas concentrações plasmáticas de quitotriosidase).

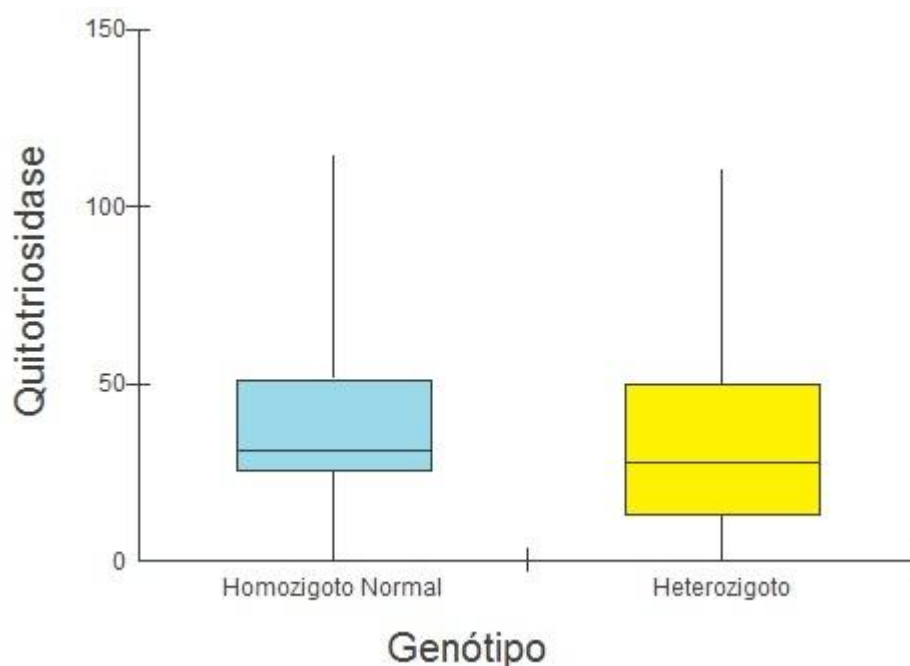


Figura 6 - Relação entre os níveis plasmáticos de quitotriosidase (expressos em nmoles/h/mL) e genótipos para a duplicação de 24pb.

A Tabela 8 apresenta as freqüências genóticas e alélicas do gene *chit1* em diversos grupos étnicos. A população analisada nesse estudo apresentou uma

freqüência de 72% de indivíduos homozigotos normais, 24% de indivíduos heterozigotos e 4% de homozigotos para a duplicação de 24 pb. As freqüências alélicas ficaram em torno de 84% para o alelo selvagem e 16% para o alelo mutante.

**Tabela 08 - Freqüências genótípicas e alélicas encontradas no gene *chit1* em 100 indivíduos.**

População	Amostra (N)	Freqüência Genotípica (%)			Freqüência Alélica (%)		Hardy-Weinberg P-valor
		CC	Cc	cc	C	c	
Pará	100	72	24	4	84	16	0.2840

C= Alelo Selvagem

c= Alelo Mutante

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. DOSAGEM DE QUITOTRIOSIDASE: GRUPO CONTROLE X PACIENTES COM MALÁRIA.

O presente trabalho descreveu pela primeira vez na literatura a elevação dos níveis plasmáticos da quitotriosidase em pacientes acometidos por malária *vivax*, uma doença endêmica do estado do Pará com milhares de pessoas infectadas anualmente pelo parasita que promove a doença, quando comparados a um grupo de indivíduos não parasitados por malária.

Os dados comparativos (gráfico 01) submetidos ao teste “t” forneceram informação consistente permitindo sugerir que os níveis plasmáticos de quitotriosidase em indivíduos sadios e indivíduos acometidos por malária diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). É importante ressaltar que os valores do desvio padrão referentes à atividade da quitotriosidase e observados no grupo de pacientes com Malária e no grupo controle foram elevados, sugerindo uma expressiva heterogeneidade na atividade da enzima quitotriosidase, causando sobreposição entre os dois grupos.

Barone e colaboradores (2003) verificaram que a média dos níveis de quitotriosidase estava elevada em indivíduos acometidos por Malária *Falciparum* ou Malária grave quando comparados a indivíduos sadios.

Os dados fornecidos neste estudo referentes à dosagem de quitotriosidase não apresentaram um padrão que se possa presumir o diagnóstico de Malária. Ao contrário, por exemplo, da DG em que os valores de quitotriosidase acima de 4000 nmoles/h/mL são preditivos para o diagnóstico de DG. (Ries *et al*, 2006).

Esse dado é relevante na medida em que um dos objetivos do trabalho foi avaliar a aplicação da quitotriosidase como marcador bioquímico para malária. Os valores obtidos não podem ser usados como ferramentas de diagnóstico ou acompanhamento de pacientes, na medida em que há uma faixa de sobreposição entre os valores de doentes e sadios. No entanto, os valores significativamente aumentados da quitotriosidase observados no grupo de pacientes com Malária *vivax* podem corresponder a um marcador de resposta fisiológica.

A constatação de que os níveis plasmáticos elevados de quitotriosidase observados em pacientes com malária no presente estudo ainda estão abaixo dos valores observados em pacientes com DG pode estar associada ao fato de que a DG é uma doença crônica e gradativa, com intensa proliferação de macrófagos, enquanto que a malária *vivax* é caracterizada por episódios agudos de febres seguidos por sintomas como dor de cabeça e calafrios.

Dessa forma, os níveis de quitotriosidase significativamente elevados em DG são inerentes do estado fisiopatológico crônico desta enfermidade, enquanto que os níveis observados em pacientes com Malária são correspondentes a uma resposta fisiológica do organismo desencadeada por um processo como descrito por Beutler & Grabowski, (2001); Neves (2004).

A quitotriosidase é uma enzima secretada por macrófagos com a capacidade de degradar quitina e o seu papel fisiológico no organismo ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, diversos trabalhos sugerem que a expressão de quitotriosidase está associada à resposta imune, ou que seria uma resposta natural do organismo diante de um patógeno, como sugerido por Hollak *et al*, (1993), Malaguarnera *et al*, (2005); Van Eijk *et al* (2005).

A participação da quitotriosidase no processo de resposta imune é respaldada também por sua atividade estar diretamente ligada à proliferação de macrófagos ativos, uma vez que estes são importantes componentes do

mecanismo de defesa do organismo. Nesse contexto, Boot e colaboradores (1995) demonstraram que, em determinadas circunstâncias, a quitotriosidase pode ser considerada a principal proteína secretada pelos macrófagos, correspondendo a cerca de 1% das proteínas totais secretadas.

A observação de níveis aumentados de quitotriosidase neste estudo é representativa do processo de resposta imune, uma vez que a ação da quitotriosidase está associada com a liberação de fatores de resposta imune como o TNF- $\alpha$  (Malaguarnera *et al*, 2005), que é um fator liberado pelas células do sistema monocítico/macrofágico, e cuja liberação está associada a muitos dos sintomas da malária aguda, particularmente a febre e o mal-estar (Neves, 2004).

Uma característica clínica dos pacientes com malária é a ocorrência de anemia, a qual está relacionada à destruição das células vermelhas do sangue. Esse evento induz aumento de quitotriosidase em virtude do acúmulo de ferro e produtos da degradação da membrana dentro dos macrófagos (Barone *et al*, 2003).

Outro trabalho desenvolvido por Barone e colaboradores (1999) observou níveis de quitotriosidase aumentados em pacientes com Beta Talassemia Maior comparáveis aos de pacientes com DG em 10% dos pacientes do estudo. Uma característica desta patologia é a sobrecarga de ferro provocada por uma eritropoiese ineficiente, bem como transfusões que estes pacientes são submetidos. Este evento seria um dos fatores responsáveis pelos níveis aumentados da quitotriosidase nesta patologia.

A interleucina 12, ou IL-12, é uma molécula que faz parte de uma família de proteínas secretadas por linfócitos, heterogênea quanto ao aspecto estrutural, mas que fundamentalmente estimula modificações celulares amplificadoras da resposta imune. Especificamente, a IL-12, é liberada por macrófagos e induz produção de células NK e IFN $\gamma$ . (Feldman, 1997)

Lauw e colaboradores (1999) observaram uma associação positiva entre o aumento dos níveis de IL-12 e quitotriosidase. Levando-se em consideração evidências de que a resposta imune na malária é mediada por uma seqüência de eventos que envolvem a IL-12. Essa associação pode ser justificada pelo fato que a IL-12 estimula a produção de IFN $\gamma$ , e que há uma superexpressão do RNAm da quitotriosidase em macrófagos estimulados quando IFN $\gamma$  está presente (Malaguarnera *et al*, 2005)

A participação da quitotriosidase em todo esse processo ainda não está bem esclarecida: se ela é apenas um marcador do estado fisiológico inerente ao paciente com malária, ou se ela tem uma participação mais direta nesse evento no que se refere ao envolvimento desta proteína em alguma via de resposta inflamatória. Essa circunstância abre a perspectiva de novas pesquisas que possam elucidar o papel fisiológico da quitotriosidase, desde a sua expressão até sua efetividade no contexto celular.

Entre as amostras estudadas do grupo controle sete indivíduos não exibiram atividade de quitotriosidase, quadro compatível com a Deficiência de Quitotriosidase. Esse resultado será discutido mais adiante.

## **5.2. ATIVIDADE DE QUITOTRIOSIDASE x PARASITEMIA**

Neste trabalho, foi avaliada uma possível relação das dosagens de quitotriosidase e o nível de parasitemia, que é um parâmetro hematológico de rotina para avaliação clínica dos pacientes com Malária no qual são observados valores aproximados dos números de parasitos por mm<sup>3</sup> a partir de uma gota de sangue coletada do dedo indicador do paciente. A parasitemia é realizada por análise microscópica e determinada no momento do diagnóstico.

A relação da atividade de quitotriosidase e parasitemia em pacientes com Malária foi analisada por teste de regressão. Os resultados (figura 3) entre as duas



variáveis não foram significantes, permitindo informar a partir da análise estatística que a atividade da quitotriosidase é independente do grau de parasitemia do paciente.

Esse resultado pode ser explicado pela atividade específica da enzima quitotriosidase em degradar quitina, a qual não se encontra no *Plasmodium*. A partir desses resultados, pode-se argumentar que os valores elevados da quitotriosidase são eminentemente decorrentes da proliferação de macrófagos ativados e não por sua atuação direta no combate a infecção por *Plasmodium*.

### **5.3. ATIVIDADE DE QUITOTRIOSIDASE X GENÓTIPO**

Neste trabalho não foi observada uma correlação direta entre os níveis plasmáticos de quitotriosidase (fenótipo bioquímico) e os genótipos para a duplicação de 24pb que determina a deficiência de quitotriosidase no caso de homozigotos mutantes. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Rodrigues e colaboradores (2004) que não encontraram uma associação consistente para determinação da relação genótipo/fenótipo para esse polimorfismo e a dosagem de quitotriosidase.

Boot e colaboradores (1998) sugerem em seu trabalho que heterozigotos para a duplicação de 24pb apresentam níveis de quitotriosidase com aproximadamente metade dos valores observados em homozigotos normais. Esse dado difere dos resultados constatados no presente trabalho uma vez que foi evidenciado nos resultados um faixa acentuada de sobreposição entre homozigotos normais e heterozigotos para a duplicação de 24 pb. (Figura 05)

#### 5.4. FREQUENCIAS DA DUPLICAÇÃO DE 24pb EM DIFERENTES POPULAÇÕES

O gene da quitotriosidase é formado por 12 éxons, totalizando um gene de 20Kb. Uma duplicação de 24 pares de bases no éxon 10 do gene *chit1* e em homozigose condiciona a deficiência de quitotriosidase (Figura 01). Esta mutação promove uma mudança na estrutura da proteína resultando na perda de 29 aminoácidos, interferindo na sua atividade catalítica. Essa condição é muito freqüente, com uma estimativa de 6% de homozigotos mutantes em diferentes etnias (Boot *et al*, 1998).

A Tabela 9 apresenta as freqüências gênicas e alélicas referentes a presença ou ausências da duplicação de 24pb no éxon 10 do gene *chit1* bem como a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é utilizado para verificar se uma população esta sofrendo ação de mecanismos evolutivos como uma mutação, deriva gênica, migração ou seleção natural. Através da análise do Qui-quadrado é possível inferir se a população alvo do estudo está em equilíbrio.

A freqüência do alelo mutante (presença da duplicação de 24 pb) observada neste trabalho se aproximou das freqüências obtidas na maioria dos estudos realizados.

A análise da tabela 9 também permite verificar uma variabilidade nas freqüências da duplicação de 24pb entre as populações estudadas. A freqüência do alelo mutante variou de 11,7% na população dos Países Bascos a 27,4% na Sícia (Itália). Em relação ao genótipo há ausência de homozigotos mutantes na população basca. A população francesa apresentou a maior freqüência (9,3%) de homozigotos para a duplicação de 24pb.

A duplicação de 24pb foi estudada por Rodrigues e colaboradores (2010) em 122 indivíduos sadios da Região Sudeste do Brasil, sendo observada uma frequência do alelo mutante de 30% e do genótipo homozigoto mutante de 9%, diferindo dos resultados encontrados para o presente estudo ( $p>0,05$ ).

**Tabela 9 - Frequências genotípicas e alélicas encontradas no gene *chit1* em diversos grupos.**

População	Amostra (N)	Frequência Genotípica (%)			Frequência Alélica (%)		Hardy-Weinberg P-valor	Referência
		CC	Cc	cc	C	c		
Pará	100	72	24	4	84	16	0.2840	Presente estudo
Rio Grande do Sul	207	57.5	38.6	3.9	76.8	23.2	0.4054	Wajner <i>et al.</i> , 2006
Espanha	103	61.2	32.0	6.8	77.2	22.8	0.399	Piras <i>et al.</i> , 2006
Países Bascos	60	76.7	23.3	0.0	88.3	11.7	1.000	Piras <i>et al.</i> , 2006
França	128	59.4	31.3	9.3	75.0	25.0	0.061	Piras <i>et al.</i> , 2006
Sardênia	340	68.6	27.9	3.5	82.5	17.5	0.572	Piras <i>et al.</i> , 2006
Córsega	194	74.8	24.2	1.0	86.9	13.1	0.540	Piras <i>et al.</i> , 2006
Itália	99	63.7	34.3	2.0	80.8	19.2	0.514	Piras <i>et al.</i> , 2006
Turquia	95	66.3	29.5	4.2	81.1	18.9	0.731	Piras <i>et al.</i> , 2006
Judeus Askenazi	68	60.3	33.8	5.9	0.772	22.8	0.6902	Boot <i>et al.</i> , 1998
Portugal	295	60.0	37.3	2.7	0.786	21.35	0.2685	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
Sicília	100	51.01	44.54	5.45	0.7255	27.45	0.2809	Malaguarnera <i>et al.</i> , 2003

No presente estudo sete indivíduos não apresentaram atividade da enzima quitotriosidase, resultado compatível com deficiência de quitotriosidase. No entanto, a análise molecular evidenciou que destes, 3 não eram homozigotos mutantes para essa condição. Lee e colaboradores (2007) observaram dados similares em seu estudo com indivíduos de diferentes ancestralidades nos quais houve uma associação entre os polimorfismos G354R e A442V e a ausência de atividade da quitotriosidase.

Choi e colaboradores (2001) encontraram uma associação entre a quitotriosidase e regiões endêmicas para filariose, onde a frequência de deficiência de quitotriosidase nessas regiões é baixa. Estes autores alegaram a possibilidade da presença de uma pressão evolutiva que essa região sofreu no decorrer do tempo. Seguindo esse raciocínio seria razoável se pensar que ocorra um fenômeno similar em nosso estudo, uma vez que o estado do Pará se encontra em uma região endêmica para malária. Entretanto, seria prematuro afirmar isso na medida em que ainda não há evidências suficientes da participação da quitotriosidase no processo inflamatório da malária. Este fato é reforçado uma vez que neste trabalho não foi encontrada uma correlação entre a quitotriosidase e a parasitemia dos pacientes com Malária *vivax*.

Considerando que o papel fisiológico da quitotriosidase ainda está em discussão, a alta frequência da deficiência de quitotriosidase em países de origens étnicas diferentes contribui para o fortalecimento da idéia de que a quitotriosidase perdeu, ao longo da evolução, sua função primária, e que há pelo menos uma outra proteína que desempenha o mesmo papel no organismo (Boot *et al*, 1998).

As evidências de que a quitotriosidase tem ação quitinase e que esta proteína corresponde a uma ferramenta de monitoramento para avaliar a eficácia do tratamento de pacientes com DG são as atribuições e aplicações mais concretas sobre a quitotriosidase.

Nesse caso um estudo molecular no gene *chit1* se faz relevante pela alta frequência de deficiência de quitotriosidase o que tem interferência direta na tomada de decisão para se utilizar uma medida terapêutica adequada diante de doenças fúngicas ou outros parasitas bem como a própria DG. Este tipo de estudo aponta para a possibilidade de possíveis pesquisas em outras etnias que compõem a população do Estado do Pará, como por exemplo, em índios (Oliveira, 2010, dados não publicados) e quilombolas.

## 6. CONCLUSÕES

A média dos níveis plasmáticos de quitotriosidase em indivíduos com malária vivax foi significativamente maior em relação aos níveis plasmáticos de quitotriosidase observados em indivíduos não parasitados.

Não há correlação entre os níveis plasmáticos de quitotriosidase e o nível de parasitemia para malária.

A frequência genotípica para a deficiência de quitotriosidase foi de 72% para Homozigotos Normais; 24% para Heterozigotos e 4% para Homozigotos mutantes.

Não foi possível estabelecer correlação entre os níveis plasmáticos de quitotriosidase e os genótipos para a duplicação de 24pb.

A frequência alélica da duplicação de 24pb no exon 10 do gene *chit1* na população paraense foi de 84% para o alelo selvagem e 16% para o alelo mutante.

## 7 .REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALTARESCU, G., RUDENSKY, B., ABRAHAMOV, A., GOLDFARB, A.; RUND, D, ZIMRAN, A. AND ELSTEIN, D. Plasma chitotriosidase activity in patients with beta-thalassemia. **Am. J. Hematol. Am. J. Hematol.** 71: 7–10, 2002.

ARTIEDA, M., CENARRO, A., GANAN, A., JERICO, I., GONZALVO, C., CASADO, J. M., VITORIA, I., PUZO, J., POCOVI, M. AND CIVEIRA, F. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 23: 1645–1652, 2003.

CHONG, Z. Z., LI, F. & MAIESE, K. Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. **Brain Res. Brain Res. Rev.** 49: 1–21, 2005.

BANNISTER, L.H.; HOPKINS, J.M.; FOWLER, R.E.; KRISHNA, S.; MITCHELL, G.H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitology Today** , 16: 427-433, 2000

BARONE, R., DI GREGÓRIO, F.; ROMEO, M.A.; SCHILIRO, G.; PAVONE, L. Plasma chitotriosidase activity in patients with  $\beta$ - Thalassemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases** 21: 01-08, 1999.

BARONE, R.; SIMPORE, J.; MALAGUANERA, L.; PIGNATELLI, S.; MUSUMECI, S Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malária. **Clinica Chimica Acta** 331: 79-85, 2003.

BEUTLER, E.; GRABOWSKI, G.A. Gaucher Disease In: **The Metabolic e Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>th</sup> ed.** New York: McGraw-Hill, 3335-3668 (2001)

BLACKMAN, M.J. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. **Cellular Microbiology**, **6**: 893-903, 2004.

BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; VERHOECK, M.; STRIJILAND, A; BLIEK, J.; DE MEULEMEESTER, T.M.A.M.O.; MANNERS, J.M.F.G.; AERTS, J.M.F.G.. The human chitotriosidase gene: nature of inherited enzyme deficiency. **J. Biol. Chem.** 273: 25680–25685, 1998.

BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; VERHOECK, M.; STRIJILAND, A; BLIEK, J.; DE MEULEMEESTER, T.M.A.M.O.; MANNERS, J.M.F.G.; AERTS, J.M.F.G. Purification e Characterization of Human Chitotriosidase, a Novel Member of Family of Proteins. **J. Biol. Chem.** 270(5) 2198-2202, 1995

BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; VERHOEK, M.; STRIJILAND, A.; BLIEK, J.; MAURICE, T.; DE MEULEMEESTER, A.M.O.; MANNENS, M.M.A.M.; AERTS, J.M.F.G. The Human Chitotriosidase: Nature of Inherited Enzyme Deficiency. **Eur.J. Biochem** 270: 26252-26256, 1995

BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; STRIJILAND, A; VAN ZONNEVELD, A.J.; AERTS, J.M.F.G. Cloning of cDNA Encoding Chitotriosidase, a Human Chitinase Produced by Macrophages. **J. Biol. Chem** 270 26252-26256, 1995

BOOT, R. G., VAN ACHTERBERG, T. A., VAN AKEN, B. E., RENKEMA, G. H., JACOBS, M. J., AERTS, J. M. AND DE VRIES, C. J. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.** 19: 687–694, 1999.

BOOT, R.G.; BLOOMAART, E.F.C.; SWART, E.; GHAUHARALI-VAN DER VLUGT, K.; BIJL, N.; MOE, C.; PLACE, A.; AERTS, J.M.F.G.; Identification of a



Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase **J. Biol. Chem.** 276(9) 6770-6778. 2001

BOUSSAC, M & GARIN, J. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: proteomic approach. **Electrophoresis.** 21: 665-672, 2000.

BOUZAS, L.; CARLOS GUINARTE, J; CARLOS TUTOR, J. Chitotriosidase Activity in Plasma and Mononuclear and Polymorphonuclear Leukocyte Populations. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** 17: 271–275, 2003.

CHOI, E.H.; ZIMMERMAN P.A.; FOSTER C.B.; ZHU, S.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T. B.; CHANOCK, S. J. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. **Genes & Immunity** 5(2): 248-253, 2001.

CZARTORYSKA, B.; TYLKI-SZYMANSKA, A.; LUGOWSKA, A. Changes in Serum Chitotriosidase Activity with Cessation of Replacement Enzyme (Cerebrosidase) e Administration in Gaucher Disease **Clinical Biochemistry** 33: 147-149, 2000.

DI ROSA, M., DELL'OMBRA, N., ZAMBITO, A. M., MALAGUARNERA, M., NICOLETTI, F. AND MALAGUARNERA, L. Chitotriosidase and inflammatory mediator levels in Alzheimer's disease and cerebrovascular dementia. **Eur. J. Neurosci.** 23: 2648–2656, 2006.

FUSETTI, F.; VON MOELLER, H.; HOUSTON, D.; ROZEBOOM, H.; DIJKSTRA, B.W.; BOOT, R.G.; AERTS, J.F.M.G.; VAN AALTENS, D.M.F. Structure of Human Chitotriosidase: Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. **J. Biol. Chem.** 277 25537-25544, 2002.

GAUR, D.; MAYER, D.C.; MILLER, L.H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal of Parasitology**, **34**: 1413-1429, 2004.

GOEL, V.K.; LI, X.; CHEN, H.; LIU, S.C.; CHISHTI, A.H.; OH, S.S. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, **100**: 5164-5169, 2003.

GUO Y.; HE, W.; BOER ,A.M.; WEVERS RA, DE BRUIJN, A.M.; GROENER, J.E.M.; HOLLAK, C.E.M, AERTS, J.M.F.G.; GALJAARD, H.; VAN DIGGELEN, O.P. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. **J Inherit Metab Dis**. 18:717–722. 1995

HOLLAK, C.E.M.; VAN WEELY, S.; VAN OERS, M.H.J.; AERTS, J.M.F.G. Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase. A Novel Hallmark of Gaucher Disease **J Clin Invest**. 93(3): 1288–1292, 1994.

LAUW, F. N., TE VELDE, A. A., DEKKERS, P. E., SPEELMAN, P.,AERTS, J. M., HACK, C. E., VAN DEVENTER, S. J. AND VAN DER POLL,T. Activation of mononuclear cells by interleukin-12: an *in vivo* study in chimpanzees. **J. Clin. Immunol**. 19, 231–232, 1999.

LEE, P.; WAALLEN, J., CRAIN, K.; SMARGON, A., BEUTLER, E. Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity **Blood Cells Mol. Diseases**. 39(3): 353-360, 2007.

LEORATI, F.M.S. **Resposta Imune Humoral na Malária Humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum***. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo, 2004. 149p.

MALAGUARNERA, L.; SIMPORÈ, J.; PRODI, D. A.; ANGIUS, A.; SASSU, A.; PERSICO, I.; BARONE, R.; MUSUMECI, S. . A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. **Genes Immun.** 4: 570–574, 2003.

MALAGUANERA, L.; BARONE, R.; ANGIUS, A.; MUSUMECI, S.; chitotriosidase, a prematurely orphan enzyme. **Hum. Evol.** **19(1)**: 71-75, 2004.

MALAGUANERA, L.; MUSUMECI, M.; LICATA, F.; Di ROSA, M.; MESSINA, A.; MUSUMECI, S. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages **Immunology** 94: 57–63, 2004.

MALAGUANERA, L.; MUSUMECI, M.; Di ROSA, M.; SCUTO, A.; MUSUMECI, S. Interferon-gamma, Tumor Necrosis Factor-alpha, and Lipopolysaccharide Promote Chitotriosidase Gene Expression in Human Macrophages. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** **19**: 128–132, 2005.

MALAGUANERA, L. Chitotriosidase: the yin and yang. **Cellular and Molecular Life Sciences** 01-12, 2006

MOTA, M.M. & RODRIGUEZ, A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **Cellular Microbiology**, **6**: 1113-1118, 2004.

PIRAS, I.; MELIS, A.; GHIANI, M.E.; FALCHI, A.; LUISIELI, D.; MORAL, P.; VARESI, L.; CALÓ, C.M.; VONA, G.; Human CHIT1 gene distribution: new data from Mediterranean and European populations **J.Hum. Genet.** 52: 110-116, 2006.

RENKEMA, G.H.; BOOT, R.G.; MUIJSERS, A.O.; DONKER-KOOPMAN, W.; E; AERTS, J.M.F.G. Purification e Characterization of Human Chitotriosidase, a Novel Member of Family of Proteins. **J. Biol. Chem** 270(5) 2198-2202, 1995.

RENKEMA, G.H.; BOOT, R.G.; STRIJLAND, A; DONKER-KOOPMAN, W.E.; VAN DEN BERG, M.; MUIJSERS, A.O.; AERTS, J.M.F.G. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chototriosidase . **Eur.J. Biochem** 244: 279-285, 1997.

RIES, M.; SCHAEFER, E.; LÜHRS, T.; MANI, L.; KUNH, J.; VANIER, M.T.; KRUMMENAUER, F.; GAL, A.; BECK, M.; MENGEL Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C. **J. Inherit. Metab. Dis.** 29: 647-652, 2006.

RODRIGUES, M.R.; SÁ MIRANDA, M.C.; AMARAL Allelic frequency determination of 24-bp chiototriosidase duplication in the Portuguese population by real time PCR. **J. Biol. Chem.** 270(5) 2198-2202, 2004.

RODRIGUES, M.D.B.; MULLER, K. B.; PEREIRA, V. G.; MARTINS, A. M.; D'ALMEIDA, V. Chitotriosidase deficiency in Brazil: Evaluation of enzyme activity and genotypes, **Blood Cells Mol. Diseases** (2010),

SAMBROOK, J. & RUSSEL D.W. **Molecular cloning – A Laboratory Manual.** 3a. edição, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWAB, J. M., NGUYEN, T. D., MEYERMANN, R. AND SCHLUESENER, H. J.  
Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16  
(IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes  
and activated microglia/macrophages. **J. Neuroimmunol.** 114: 232–  
241.2001

SINNIS, P. & SIM, B.K. Cell invasion by the vertebrate stages of Plasmodium.  
**Trends in Microbiology**, 5: 52-58, 1997.

VAN EIJK, M.; VAN ROOMEN, C.P.A.A.; RENKEMA, G.H.; BUSSINK, A.P.;  
ANDREWS, L.; BLOMMAART, E.F.C.; SUGAR, A.; VERHOEVEN, A.J.;  
BOOT, R.G.; AERTS, J.F.M.G. Characterization of Human phagocyte-  
derived chitotriosidase, a component of innate immunity **International  
Immunology** 17: 1505-1512 2005

VENTURA, A.M.R.S.; PINTO, A.Y. N.; SILVA, R. S.U., CALVOSA, V. S.P.; FILHO,  
M. G. S.; SOUZA, J. M. Malária por *Plasmodium vivax* em crianças e  
adolescentes – aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **J  
Pediatr**;75(3):187-94. 1999

WAJNER, A.; MICHELIN, K.; BURIN, M.G; PIRES, R.F.; PEREIRA, M.L.S.;  
GIUGLIANI, R.; COELHO, J.C. Biochemical characterization of  
chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and  
patients with Gaucher and with Niemann–Pick diseases **Clinical  
Biochemistry** 37: 893– 897. 2004

YOUNG, E.; CHATERTON, C.; VELLODI, A.; WINCHESTER.B. Plasma  
chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated  
either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy  
with alglucerase **J. Inher. Metab.** 20: 596-602, 1997.



**GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ**  
**FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**TERMO DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 14 de março de 2006 o projeto de pesquisa intitulado “ **ANÁLISE DA ENZIMA QUITOTRIOSIDASE EM DIFERENTES CONDIÇÕES CLÍNICAS: MALÁRIA E TALASSEMIA** ” de autoria do discente CLÉBER MONTEIRO CRUZ, orientado pelo Prof. Dr. LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolver – lo na Universidade Federal do Pará.

Belém, 11 de abril de 2006.

Informo ainda, que V. As. Deverá apresentar relatório semestral (previsto para 01/10/06), anual e/ ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto ( item VII.13.d. da Resolução nº 196/96 – CNS / MS).

Atenciosamente,

*Simone R. S. Silva Conde*  
Clínica Médica e Doenças Hepáticas  
*Simone Conde*  
Dra. Simone Conde  
Coordenadora do CEP

## **ANEXO 02**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo**

O presente trabalho tem como objetivo de avaliar aspectos bioquímicos e moleculares da proteína de função enzimática denominada quitotriosidase usando como modelo de estudo a Malária. Essa investigação fundamenta-se na possibilidade de uma melhor compreensão do papel bioquímico da quitotriosidase e sua participação como componente de resposta imune em um modelo de doença endêmico de nossa como é o caso da malária. Além disso, este trabalho visa estabelecer a freqüência da Deficiência de quitotriosidase, uma condição relativamente freqüente em diversos povos, e com implicações clínicas pouco conclusivas e que ainda não há dados a respeito dessa condição na Região Norte.

Como instrumento para o alcance dos objetivos deste trabalho será coletada uma amostra de 10 mL de sangue em seringa com heparina para a dosagem enzimática da quitotriosidase e/ou 5 mL de sangue com EDTA para análise molecular do gene da quitotriosidase. Os resultados do teste são confidenciais e utilizados exclusivamente para fins do objeto de do trabalho, sendo resguardado o sigilo, o direito às informações a qualquer momento, bem como a recusa em participar do trabalho.

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida relacionada ao trabalho, da liberdade de não participar do estudo, da segurança do sigilo e do caráter confidencial das informações.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Nome do Participante:** \_\_\_\_\_

**Pesquisador: Cléber Monteiro Cruz**

### ANEXO 03

#### Dados Individuais de Pacientes com Malária: gênero, idade e parasitemia

Identificação	Gênero	Idade (Anos)	Parasitemia (parasitos/mm <sup>3</sup> )
M-01	Masculino	33	1700
M-02	Masculino	41	2500
M-03	Masculino	26	2000
M-04	Feminino	28	500
M-05	Feminino	69	10000
M-06	Masculino	60	500
M-07	Masculino	36	++
M-08	Masculino	19	+
M-09	Masculino	52	3000
M-10	Masculino	24	2000
M-11	Masculino	15	2000
M-12	Masculino	27	12500
M-13	Masculino	08	10000
M-14	Masculino	31	10000
M-15	Feminino	41	3000
M-16	Masculino	55	25
M-17	Masculino	24	15000
M-18	Masculino	51	1000
M-19	Feminino	14	3000
M-20	Masculino	35	+++
M-21	Feminino	65	10000
M-22	Feminino	32	++
M-23	Feminino	40	88000
M-24	Feminino	31	10000
M-25	Feminino	48	10000
M-26	Masculino	53	2500
M-27	Masculino	13	10000
M-28	Feminino	30	++
M-29	Feminino	59	10000
M-30	Masculino		2500
M-31	Masculino		2000
M-32	Masculino		+
M-33	Masculino		++
M-34	Masculino		10000
M-35	Masculino		88000
M-36	Feminino		6v
M-37	Feminino		500
M-38	Masculino		6000
M-39	Feminino		10000
M-40	Masculino		10000
M-41	Masculino		20000
M-42	Feminino		5000
M-43	Masculino		2500
M-44	Masculino		17500



---

M-45	Masculino	3500
M-46	Masculino	3500
M-47	Masculino	1500
M-48	Masculino	20000
M-49	Masculino	3500
M-50	Feminino	1000
M-51	Feminino	3500
M-52	Feminino	1000
M-53	Masculino	3000
M-54	Feminino	10000

---

## ANEXO 04

### Dosagens de Quitotriosidase: Pacientes com Malária e grupo controle.

DOSAGEM DE QUITOTRIOSIDASE (nmoles/h/mL)							
M-01	97,104	M-51	167,17	C-01	7,92	C-51	114,95
M-02	48,84	M-52	98,34	C-02	19,00	C-52	102,96
M-03	3,828	M-53	49,71	C-03	0,0	C-53	85,80
M-04	33,212	M-54	49,71	C-04	19,0	C-54	26,76
M-05	77,26			C-05	61,25	C-55	55,44
M-06	76,49			C-06	51,48	C-56	110,88
M-07	191,03			C-07	24,08	C-57	26,40
M-08	41,34			C-08	73,92	C-58	26,40
M-09	88,57			C-09	53,86	C-59	52,80
M-10	22,00			C-10	18,48	C-60	52,80
M-11	68,90			C-11	9,37	C-61	58,08
M-12	11,48			C-12	35,90	C-62	39,60
M-13	56,91			C-13	20,06	C-63	26,40
M-14	25,34			C-14	64,68	C-64	21,12
M-15	14,04			C-15	24,95	C-65	26,40
M-16	10,53			C-16	39,07	C-66	14,52
M-17	24,57			C-17	43,48	C-67	39,60
M-18	28,09			C-18	8,98	C-68	26,40
M-19	221,76			C-19	10,03	C-69	26,40
M-20	165,06			C-20	8,98	C-70	13,20
M-21	67,58			C-21	0,0	C-71	29,04
M-22	141,63			C-22	19,96	C-72	13,20
M-23	71,28			C-23	37,07	C-73	29,04
M-24	48,31			C-24	78,14	C-74	31,68
M-25	50,4			C-25	20,59	C-75	0,0
M-26	43,56			C-26	0,0	C-76	31,68
M-27	29,57			C-27	39,34	C-77	42,24
M-28	80,38			C-28	27,72	C-78	39,60
M-29	0,0			C-29	9,83	C-79	52,80
M-30	92,6			C-30	27,72	C-80	39,60
M-31	92,4			C-31	22,97	C-81	26,40
M-32	30,88			C-32	14,45	C-82	36,60
M-33	55,44			C-33	22,97	C-83	92,40
M-34	60,19			C-34	3,96	C-84	36,60
M-35	80,25			C-35	29,57	C-85	26,40
M-36	20,06			C-36	14,45	C-86	52,80
M-37	20,06			C-37	21,12	C-87	26,40
M-38	80,78			C-38	51,48	C-88	26,40
M-39	170,54			C-39	34,32	C-89	39,60
M-40	8,97			C-40	0,0	C-90	31,68
M-41	10,96			C-41	85,80	C-91	79,20
M-42	120,12			C-42	31,68	C-92	36,60
M-43	92,66			C-43	31,68	C-93	29,04
M-44	99,00			C-44	49,26	C-94	10,56
M-45	29,7			C-45	85,80	C-95	10,56

---

M-46	39,07	C-46	0,0	C-96	0,0
M-47	29,30	C-47	85,80	C-97	29,04
M-48	56,60	C-48	51,48	C-98	31,68
M-49	146,52	C-49	65,68	C-99	36,68
M-50	186,84	C-50	82,10	C-100	29,04

---

## ANEXO 05

### Dosagens de Quitotriosidase: Pacientes com Malaria x Parasitemia.

Identificação	Dosagem de quitotriosidase	Parasitemia(parasitos/mm <sup>3</sup> )
M-01	97,104	1700
M-02	48,84	2500
M-03	3,828	2000
M-04	33,212	500
M-05	77,26	10000
M-06	76,49	500
M-09	88,57	3000
M-10	22,00	2000
M-11	68,90	2000
M-12	11,48	12500
M-13	56,91	10000
M-14	25,34	10000
M-15	14,04	3000
M-17	24,57	15000
M-18	28,09	1000
M-19	221,76	3000
M-21	67,58	10000
M-23	71,28	88000
M-24	48,31	10000
M-25	50,4	10000
M-26	43,56	2500
M-27	29,57	10000
M-29	0,0	10000
M-30	92,6	2500
M-31	92,4	2000
M-34	60,19	10000
M-35	80,25	88000
M-37	20,06	500
M-38	80,78	6000
M-39	170,54	10000
M-40	8,97	10000
M-41	10,96	20000
M-42	120,12	5000
M-43	92,66	2500
M-44	99,00	17500
M-45	29,7	3500
M-46	39,07	3500
M-47	29,30	1500
M-48	56,60	20000
M-49	146,52	3500
M-50	186,84	1000
M-51	167,17	3500
M-52	98,34	1000
M-53	49,71	3000
M-54	49,71	10000

**ANEXO 06****Genotipagem Individual da duplicação de 24pb no grupo controle**

<b>Paciente</b>	<b>Condição</b>	<b>Paciente</b>	<b>Condição</b>
C-01	Heterozigoto	C-51	Homozigoto normal
C-02	Homozigoto normal	C-52	Homozigoto normal
C-03	Homozigoto mutante	C-53	Homozigoto normal
C-04	Heterozigoto	C-54	Heterozigoto
C-05	Homozigoto normal	C-55	Heterozigoto
C-06	Homozigoto normal	C-56	Heterozigoto
C-07	Homozigoto normal	C-57	Homozigoto normal
C-08	Homozigoto normal	C-58	Homozigoto normal
C-09	Homozigoto normal	C-59	Homozigoto normal
C-10	Heterozigoto	C-60	Homozigoto normal
C-11	Homozigoto normal	C-61	Homozigoto normal
C-12	Homozigoto normal	C-62	Homozigoto normal
C-13	Homozigoto normal	C-63	Homozigoto normal
C-14	Homozigoto normal	C-64	Homozigoto normal
C-15	Homozigoto normal	C-65	Homozigoto normal
C-16	Homozigoto normal	C-66	Homozigoto normal
C-17	Homozigoto normal	C-67	Homozigoto normal
C-18	Homozigoto normal	C-68	Homozigoto normal
C-19	Homozigoto normal	C-69	Homozigoto normal
C-20	Heterozigoto	C-70	Homozigoto normal
C-21	Heterozigoto	C-71	Heterozigoto
C-22	Heterozigoto	C-72	Homozigoto normal
C-23	Homozigoto normal	C-73	Homozigoto normal
C-24	Homozigoto normal	C-74	Homozigoto normal
C-25	Homozigoto normal	C-75	Homozigoto mutante
C-26	Homozigoto mutante	C-76	Homozigoto normal
C-27	Homozigoto normal	C-77	Homozigoto normal
C-28	Homozigoto normal	C-78	Homozigoto normal
C-29	Heterozigoto	C-79	Homozigoto normal
C-30	Homozigoto normal	C-80	Homozigoto normal
C-31	Homozigoto normal	C-81	Homozigoto normal
C-32	Heterozigoto	C-82	Homozigoto normal
C-33	Homozigoto normal	C-83	Heterozigoto
C-34	Heterozigoto	C-84	Homozigoto normal
C-35	Homozigoto normal	C-85	Homozigoto normal
C-36	Heterozigoto	C-86	Homozigoto normal
C-37	Homozigoto norma	C-87	Homozigoto normal
C-38	Heterozigoto	C-88	Homozigoto normal
C-39	Homozigoto normal	C-89	Homozigoto normal
C-40	Homozigoto normal	C-90	Heterozigoto
C-41	Homozigoto normal	C-91	Homozigoto normal

**ANEXO 06****Genotipagem Individual da duplicação de 24pb no grupo controle(continuação)**

<b>C-42</b>	Heterozigoto	<b>C-92</b>	Homozigoto normal
<b>C-43</b>	Heterozigoto	<b>C-93</b>	Homozigoto normal
<b>C-44</b>	Heterozigoto	<b>C-94</b>	Heterozigoto
<b>C-45</b>	Homozigoto normal	<b>C-95</b>	Homozigoto normal
<b>C-46</b>	Homozigoto normal	<b>C-96</b>	Homozigoto mutante
<b>C-47</b>	Homozigoto normal	<b>C-97</b>	Homozigoto normal
<b>C-48</b>	Heterozigoto	<b>C-98</b>	Heterozigoto
<b>C-49</b>	Heterozigoto	<b>C-99</b>	Homozigoto normal
<b>C-50</b>	Homozigoto normal	<b>C-100</b>	Homozigoto normal