

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**ESTUDO POR PCR EM TEMPO REAL DE TRÊS POLIMORFISMOS EM GENES  
ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium*  
*vivax* DA POPULAÇÃO DE BELÉM-PA**

VICTOR RIKER LOBATO

BELÉM – PARÁ

2006

VICTOR RIKER LOBATO

ESTUDO POR PCR EM TEMPO REAL DE TRÊS POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS  
NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium vivax* DA  
POPULAÇÃO DE BELÉM-PA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como  
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Belém – Pará

2006

Lobato, Victor Riker

Estudo por PCR em tempo real de três polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune em pacientes infectados por *Plasmodium vivax* da população de Belém-PA, Belém-Pará, 2006, 70p, Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1. Malária 2. *Plasmodium vivax* 3. Polimorfismos genéticos 4. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) 5. Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) 6. PCR em Tempo Real

VICTOR RIKER LOBATO

ESTUDO POR PCR EM TEMPO REAL DE TRÊS POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS  
NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium vivax* DA  
POPULAÇÃO DE BELÉM-PA

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos  
Departamento de Patologia - UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. José Maria de Souza  
Ambulatório/ Laboratório de Ensaio Clínicos em Malária - Instituto  
Evandro Chagas/ SVS/ MS

Profa. Dra. Ândrea Kelly Campos Ribeiro dos Santos  
Departamento de Patologia - UFPA

Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha  
Departamento de Patologia - UFPA

Prof. Dr. João Farias Guerreiro (Suplente)  
Departamento de Patologia - UFPA

BELÉM, 20 DE OUTUBRO DE 2006

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais pelo eterno incentivo e apoio sem o qual nenhuma realização seria possível;**

**Ao meu irmão pelo amor, amizade e companheirismo que permeou todos os passos da minha vida;**

**À minha esposa Ana Paula pelo grande amor, carinho, compreensão, por ser minha fonte de inspiração, grande incentivadora, companheira e amiga, o que é o grande alicerce para as minhas conquistas.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente A Deus que torna qualquer coisa possível.

A minha família por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sidney Santos, por ter me dado essa oportunidade única e ter acreditado na minha capacidade.

À profa. Ândrea Santos, por sempre estar disposta a me aconselhar e ajudar em todas as dificuldades.

Aos professores do LGHM, Dr. Eduardo Santos e Dr. João Guerreiro;

À Dra. Isabel Silva por estar sempre disposta a ajudar em qualquer coisa e por todas as colaborações que deu a esse trabalho.

Aos professores do X Seminário Laveram e Deane sobre malária, pelas inestimáveis contribuições.

Ao amigo Kleber Xavier por todos os ensinamentos e por estar sempre a disposição para ajudar no que fosse preciso.

Aos amigos Mauro Leite, Ney Santos, Greice Cardoso, Natalle Freitas, Tarcísio Carvalho, Giorgio Marques, Igor Hamoy, Andréa Guedes e Luana Maciel pelas enormes colaborações e pela amizade no decorrer do meu curso de mestrado.

A todos do LGHM.

Ao Anderson Marinho pela ajuda com a técnica de PCR em tempo real.

Aos amigos e funcionários do LGHM Mara Monteiro, Milene Raiol, Hailton Monteiro, Danilo Monteiro e Antonio Lopes por serem parceiros com quem eu sempre pude contar.

Aos amigos do mestrado Izis Sucupira, Andréa Silva, Bruna Tamegão, Renato Fernandes, Auristela do Carmo, Karolina Kalil, Juciclayton Souza, Maria Helena Chaves e Tainá Barros pela amizade que tornaram todos os momentos, até mesmo os mais difíceis, mais agradáveis no decorrer dos últimos dois anos.

A CAPES, bela bolsa de auxílio financeiro que me foi concedida.

A todos que contribuíram e colaboraram para a execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
I. INTRODUÇÃO .....	01
1.1. Considerações Gerais .....	01
1.2. Ciclo Biológico .....	02
1.3. Aspectos Epidemiológicos .....	05
1.4. Patologia e Patogenia .....	07
1.5. Imunidade contra a Malária .....	10
1.5.1. A importância das Citocinas .....	11
1.5.1.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	12
1.5.1.2. Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) .....	14
1.5.2. Mecanismos Efetores na Defesa contra o <i>Plasmodium</i> .....	16
1.6. Polimorfismos Genéticos .....	21
1.6.1. Polimorfismos Relacionados ao Gene do TNF- $\alpha$ .....	23
1.6.2. Polimorfismos Relacionados ao Gene do IFN- $\gamma$ .....	28
1.7. Justificativa .....	30
1.8. Objetivos .....	32
1.8.1. Objetivo Geral .....	32
1.8.2. Objetivos Específicos .....	32
2. Material e Métodos .....	33

2.1. A Amostra Investigada .....	33
2.2. Dados Clínicos dos Pacientes Investigados .....	33
2.2.1. Parasitemia .....	34
2.2.2. Sinais e Sintomas .....	34
2.2.3. Concentração Plasmática de TNF- $\alpha$ .....	35
2.3. Extração do DNA .....	35
2.4. Técnica de Discriminação Alélica .....	35
2.5. Análise Estatística .....	37
3. RESULTADOS .....	39
3.1. Frequências Genotípicas e Alélicas .....	39
3.1.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa .....	39
3.1.2. Interferon Gama .....	41
3.2. Equilíbrio de Hardy-Weimberg .....	42
3.3. Desequilíbrio de Ligação .....	43
3.4. Teste de Risco Relativo ( <i>Odds ratio</i> ) .....	44
3.5. Relação entre Intensidade da Parasitemia, Manifestações Clínicas da Malária, Níveis Plasmáticos de TNF- $\alpha$ e os Polimorfismos Genéticos .....	45
3.5.1. Comparação entre Manifestações Clínicas e Parasitemia .....	46
3.5.2. Comparação entre Parasitemia e Níveis Plasmáticos de TNF- $\alpha$ .....	46
3.5.3. Comparação entre os Níveis de TNF- $\alpha$ e a Temperatura .....	47
3.5.4. Comparação entre os Escores Clínicos e os Níveis de TNF- $\alpha$ .....	47
3.5.5. Comparação entre os Polimorfismos, Parasitemia, Dados Clínicos e os Níveis de TNF- $\alpha$ .....	47



3.5.5.1. Polimorfismos do TNF- $\alpha$ .....	47
3.5.5.2. Polimorfismos do IFN- $\gamma$ .....	49
3.6. Análise das Combinações Alélicas .....	49
3.6.1. Combinações Alélicas entre os Três Sistemas Genéticos .....	49
3.6.2. Combinações Alélicas entre os Dois Sistemas do TNF- $\alpha$ .....	51
4. DISCUSSÃO .....	53
5. CONCLUSÕES .....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 01: Ilustração do Ciclo Evolutivo do Plasmodium .....	04
Figura 02: Ilustrações de atividades que expõem as pessoas ao risco para a transmissão da malária .....	06
Figura 03: Ilustração da detecção dos diferentes alelos utilizando uma sonda marcada com o fluoróforo FAM para a detecção do alelo selvagem e uma sonda marcada com o fluoróforo VIC para a detecção do alelo mutante .....	38
Tabela 01: Frequências alélicas e genótípicas relativas ao polimorfismo TNF-238 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ entre pacientes e controles .....	41
Tabela 02: Frequências alélicas e genótípicas relativas ao polimorfismo TNF-376 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ entre pacientes e controles .....	42
Tabela 03: Frequências alélicas e genótípicas relativas ao polimorfismo IFN+874 no primeiro íntron do gene do IFN- $\gamma$ entre pacientes e controles .....	43
Tabela 04: Resultado do teste empregado para calcular o equilíbrio de Hardy-Weimberg	44
Tabela 05: Valores de Média, desvio e erro padrão da parasitemia, dados clínicos e níveis séricos de TNF- $\alpha$ .....	47
Tabela 06: Frequência das combinações alélicas encontradas no grupo de pacientes e controles .....	51
Tabela 07: Combinações alélicas entre os dois polimorfismos do gene do TNF- $\alpha$ .....	52

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa que atinge aproximadamente 40% da população mundial em mais de 100 países e consiste em um grave problema de saúde pública. As citocinas são moléculas importantes na resposta imune contra a malária e atuam através do estímulo ou inibição da ativação, proliferação e/ ou diferenciação de células, além de regularem a secreção de anticorpos e de outras citocinas. Nesse trabalho investigamos três polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que podem influenciar em uma maior ou menor síntese das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Em relação à malária, os polimorfismos já foram associados com a malária grave, malária cerebral e anemia grave e também com outras doenças infecciosas, auto-imunes e com o câncer. Foram incluídos no estudo oitenta e um (81) pacientes com malária por *Plasmodium vivax* (primeira infecção) e cento e trinta (130) indivíduos sadios, ambos da população de Belém – PA. As frequências genotípicas e alélicas foram pesquisadas através da técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real e os resultados foram comparados entre os dois grupos. Parâmetros clínicos foram utilizados para tentar associar uma maior gravidade das manifestações da malária e a presença dos polimorfismos entre os pacientes. As frequências foram semelhantes entre os dois grupos estudados. O alelo TNF-238\*A não mostrou relação com nenhum dos parâmetros clínicos enquanto o alelo TNF-376\*A estava relacionado com menores níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e com uma menor intensidade dos sintomas. Os pacientes portadores do alelo IFN+874\*A apresentaram menor intensidade da parasitemia. Assim os resultados obtidos não indicam associação dos polimorfismos com a ocorrência da malária na população estudada, mas com alguns dos parâmetros clínicos investigados, e podem auxiliar futuros estudos para tentar esclarecer como as mutações nos genes de citocinas podem influenciar na ocorrência e na evolução clínica da malária e de outras doenças infecciosas e parasitárias.

## ABSTRACT

The malaria is an infectious disease and reaches approximately 40% of the world-wide population in more than 100 countries and is a serious problem for public health. The cytokines are important molecules in the immune response and act through the stimulation or inhibition of the activation, proliferation and or differentiation of cells, besides regulating the secretion of antibodies and other cytokines. In this work we investigate three single-nucleotide polymorphisms (SNP) that can influence in a greater or minor synthesis of cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . In relation to the malaria, the polymorphisms already had been associated with the severe malaria, cerebral malaria and severe anemia and also with other infectious or auto-immune diseases and cancer. Had been enclosed in this study eighty one (81) patients with *Plasmodium vivax* malaria (first infection) and one hundred and thirty (130) healthy individuals, both of the population of Belem - PA. The frequencies had been searched through the allelic discrimination technique by real time PCR and the results had been compared between the two groups investigated. Clinical parameters had been used to try to associate a bigger gravity of the malaria manifestations and the presence of the polymorphism between the patients group. The frequencies had been similar between the two studied groups. The TNF-238\*A allele did not show relation with none of the clinical parameters while the TNF-376\*A was related with minor plasmatic levels of TNF- $\alpha$  and with minor intensity of the symptoms. The patients carrying the IFN+874\*T allele had presented minor intensity of the parasitaemia. Thus the gotten results do not indicate association of the polymorphisms with malaria in the studied population, but yes with some of the clinical parameters investigated, and can assist futures studies to try to clarify as the mutations in the genes of cytokines can influence in the occurrence and the clinical evolution of the malaria and of other infectious and parasitic diseases.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença parasitária que atinge entre 300 e 500 milhões de pessoas por ano, com aproximadamente dois milhões de mortes, a maioria crianças com idade abaixo dos cinco anos (cerca de um milhão), o que mostra o quanto a doença é um problema global e significativo para a saúde pública (Sachs & Malaney, 2002; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a malária distribui-se por mais de 100 países, alcançando mais de 40% da população mundial. É uma doença que tem relação estreita com as desigualdades sociais, pois sua ocorrência é maior em regiões e continentes onde é alto o índice de pobreza, o que provoca um grande impacto sócio-econômico. (Brown *et al.*, 2000; Mendis *et al.*, 2001).

O agente etiológico da malária é um protozoário classificado no filo *Protozoa*, Classe *Sporozoeae*, Família *Plasmodiidae* e Gênero *Plasmodium*. São quatro as principais espécies responsáveis pela malária humana, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo que somente as três primeiras estão associadas à doença no Brasil (Brasil, 2002).

Dentre essas, o *P. vivax* é a espécie mais distribuída globalmente, principalmente nas áreas tropicais e sub-tropicais. Estima-se que ocorram mais de 80 milhões de casos anuais de malária por *P. vivax* (Mendis *et al.* 2001; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

O *P. falciparum* é a espécie que chama mais atenção, devido estar associada com a maioria dos casos fatais da doença, pelo desenvolvimento de resistência dessa espécie aos antimaláricos em muitas partes do mundo e por sua grande frequência na África, continente que concentra a maioria dos casos da doença (Mendis *et al.*, 2001).

A infecção causada pelo *P. malariae*, popularmente conhecida como febre quartã, é considerada re-emergente em algumas partes do mundo, como na Indonésia e Sumatra, e já foi detectada também em algumas regiões brasileiras (Maguire, 2002; Scopel *et al.*, 2004).

Apesar de o *P. falciparum* ser a espécie reconhecidamente com maior potencial patogênico, o *P. vivax* também tem grande importância para a saúde da população e o impacto debilitante da malária causada por essa espécie ainda é alto, e deve ser prevenido (Mendis *et al.*, 2001).

Assim, em área endêmica de *P. vivax* pode-se fazer uma estimativa de que um indivíduo até os 50 anos de idade possa experimentar até 30 casos de malária, o que justifica o grande impacto sócio-econômico da doença, sobretudo com os custos de tratamento e com a perda temporária da força de trabalho, no caso de pessoas durante a idade produtiva, ou com a deficiência de aprendizado no caso de jovens e crianças em idade escolar. Dessa forma pode-se perceber que recorrentes casos de malária por *P. vivax* levam a uma debilidade acumulativa e perda da produtividade, qualidade e expectativa de vida em uma população (Mendis *et al.*, 2001).

## 1.2. CICLO BIOLÓGICO

Os parasitos da malária possuem um ciclo biológico complexo, existindo duas formas de reprodução que definem dois ciclos distintos em sua evolução, a sexuada, ou ciclo esporogônico (que ocorre no vetor) e a reprodução assexuada, ou ciclo esquizogônico (que acontece no homem). O conhecimento sobre o ciclo evolutivo do parasito é fundamental para um melhor entendimento de características clínicas, patológicas e imunológicas na malária (Tosta *et al.*, 2000).

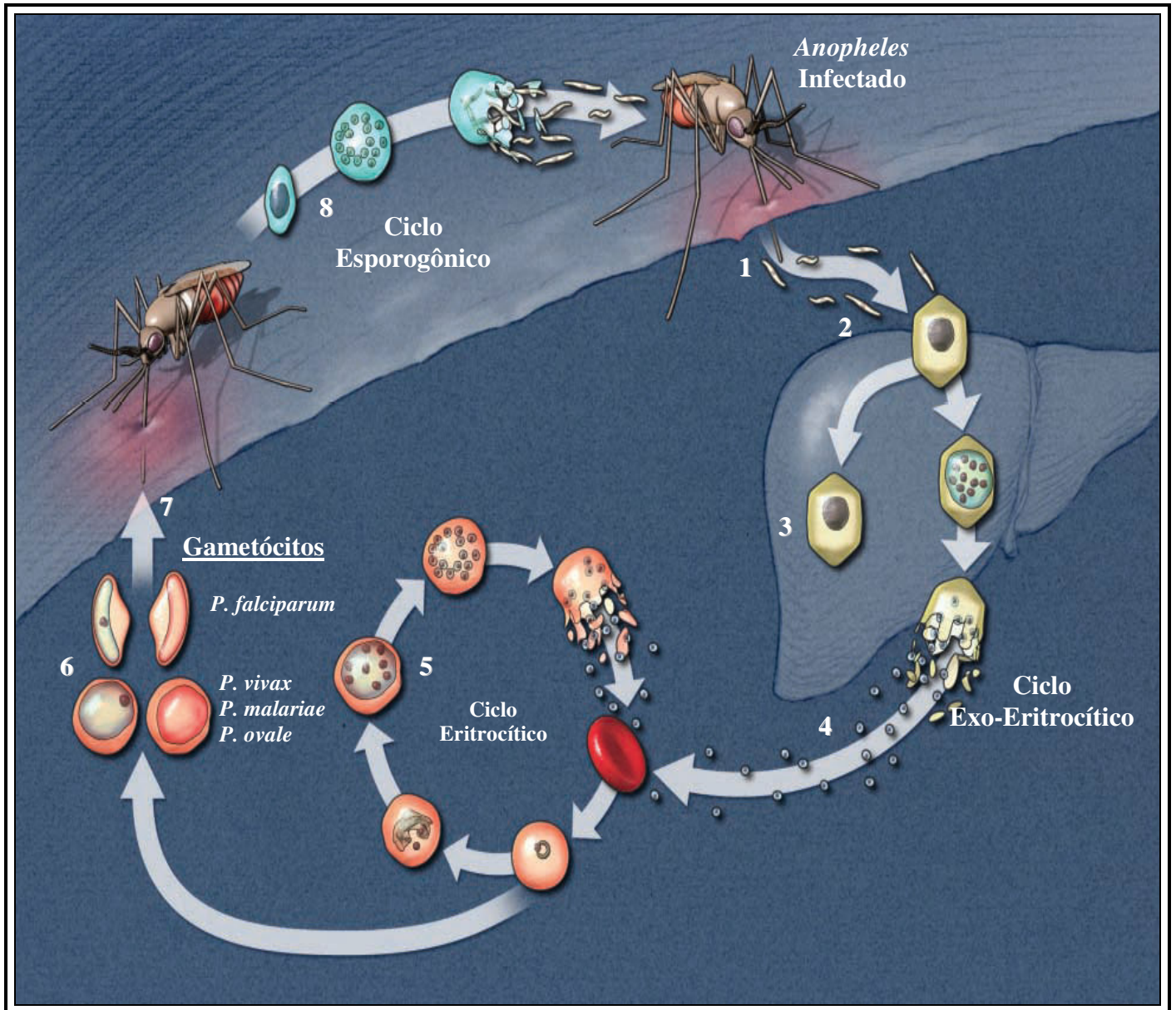
O ciclo esquizogônico acontece em duas etapas, no fígado (esquizogonia tecidual) e nas hemácias (esquizogonia sanguínea). O ciclo tem início no momento em que a fêmea anofelina realiza o

repasto sanguíneo, inoculando no sangue os esporozoítos, que após cerca de uma hora atingem o fígado, parasitando os hepatócitos (Trampuz *et al.*, 2003).

Em infecções por *P. falciparum* ou *P. malariae* os esquizontes teciduais se rompem todos ao mesmo tempo e nenhum persiste no interior dos hepatócitos. Nesses casos, as recrudescências clínicas observadas estão relacionadas quase sempre à persistência dos parasitos eritrocíticos na circulação microcapilar tecidual. As espécies *P. vivax* e *P. ovale* possuem como diferencial a permanência de formas latentes no fígado, os hipnozoítos, que posteriormente podem promover a ocorrência de um novo episódio clínico (Ferreira *et al.*, 2002).

Ao invadirem os eritrócitos, inicia-se a esquizogonia sanguínea, com a formação de novos merozoítos. Seguem-se ciclos repetidos de rompimento das hamácias, liberação dos merozoítos e invasão de novas hemácias, até que em um determinado momento alguns merozoítos irão se diferenciar em gametócitos, formas sexuadas que são infectantes para o mosquito vetor (Trampuz *et al.*, 2003).

O ciclo esporogônico inicia-se no momento de um novo repasto sanguíneo. O mosquito ingere o sangue com gametócitos e, em seu estômago, esses vão se diferenciar em gametas, ocorrendo a fecundação e conseqüente formação do zigoto, que se diferencia posteriormente em oocineto (zigoto móvel) e oocisto (implantação do oocineto na parede do estômago), que se rompe e libera os esporozoítos. Depois de liberadas, essas formas migram para a glândula salivar do mosquito, ficando o mosquito apto a infectar um novo indivíduo (Ferreira *et al.*, 2002). A figura 01 ilustra todo o ciclo evolutivo da malária.



**Figura 01:** Ilustração do ciclo evolutivo do *Plasmodium*. (1) Inoculação dos esporozoítos no momento da picada do mosquito infectado; (2) Invasão dos hepatócitos, iniciando o ciclo exo-eritrocítico; (3) Permanência dos hipnozoítos; (4) Rompimento dos hepatócitos e liberação dos merozoítos; (5) Invasão das hemácias e ciclo eritrocítico; (6) Diferenciação em gametócitos; (7) Ingestão de gametócitos pelo vetor no momento da picada e (8) Fecundação e ciclo de reprodução esporogônica. Adaptado de Suh *et al.* (2004).



### 1.3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A humanidade e o parasito da malária apresentam uma longa associação durante a evolução. Existem hipóteses de que mudanças populacionais relacionadas a diásporas de populações há cerca de 10.000 anos atrás favoreceram a expansão do *Plasmodium* a partir da África para o resto do mundo (Hay *et al.*, 2004).

O crescimento global da população mundial ao longo do século XX provocou importantes alterações na porcentagem global de populações expostas ao parasito. O número de pessoas em áreas de risco expandiu de 900 milhões para três bilhões no período de 1990 a 2002, chegando a estimativa de que 48% da população mundial está exposta à doença, na virada para o século XXI (Hay *et al.*, 2004).

A quase totalidade dos casos de malária, no Brasil, ocorre na região da Amazônia legal, que compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nesta região, o alto risco de infecção está relacionado com atividades que favorecem a transmissão, como atividades ambientais como assentamentos agrícolas, garimpos e exploração de minérios (FIGURA 02) (De Melo, 2005; Américo *et al.*, 2005). A região amazônica também possui características geográficas e ecológicas que favorecem a reprodução do mosquito vetor (Bertoli & Moitinho, 2001).



**FIGURA 02:** Ilustrações de atividades que expõem as pessoas ao risco para a transmissão da malária.

A região extra-amazônica é responsável por apenas 1% dos casos de malária notificados no Brasil, e desses casos, mais de 90% são importados de regiões endêmicas, sendo poucos os casos autóctones, limitados a áreas focais e dependentes de fatores como a densidade dos vetores (Brasil, 2003).

Um intenso processo de erradicação da doença foi bem sucedido nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e Nordeste, a partir da década de 60. Esses resultados não puderam ser alcançados na Amazônia, principalmente devido a fatores ecológicos e populacionais favoráveis a reprodução do mosquito. Além disso, a desordenada ocupação territorial da região, promovida pelo governo para buscar o desenvolvimento da região, promoveu uma dinâmica populacional que favorece a transmissão da doença (Américo *et al.*, 2005).

O estado do Pará apresentava no ano 2.000 um total de 279 mil casos de malária, ocorrendo uma redução de 62% dos casos no ano de 2004, ano no qual ocorreram apenas 107 mil casos da doença. Essa redução se deve a ação de programas que visaram a diminuição da incidência da doença, como o Programa Nacional de Controle da malária (PNCM) e o Programa de Intensificação das Ações de Controle da malária -PIACM. (Américo *et al.*, 2005).

Segundo dados mais recentes, no ano de 2005 ocorreram 602.997 casos de malária na região da Amazônia Legal, com 447.943 casos de *P. vivax* e 154.834 casos de *P. falciparum*. O Pará foi, em 2005, o terceiro Estado que mais contribuiu com casos da doença, 123.185 notificações (91.130 por *P. vivax* e 32.002 por *P. falciparum*), atrás somente dos Estados do Amazonas e de Rondônia (SIVEP/ MALÁRIA 2005).

No ano de 2006, até o dia 30 de junho, o Estado do Pará apresentou 45.749 casos de malária, 34.427 casos de *P. vivax* e 11.293 casos de *P. falciparum* (SIVEP/ MALÁRIA 2005). Em conjunto, esses dados mostram a importância da malária por *P. vivax*, que domina a grande maioria dos casos da doença na região Amazônica.

#### 1.4. PATOLOGIA E PATOGENIA

A malária é uma doença que pode evoluir para casos complicados e até mesmo fatais se não houver um pronto atendimento do paciente, com início rápido do tratamento adequado. Os principais sinais e sintomas da doença são: febre, calafrios, dores de cabeça e sudorese, também podendo ocorrer tontura, mialgia, náusea, vômitos, taquicardia, icterícia e hepato-esplenomegalia (Trampuz *et al.*, 2003).

As principais complicações da doença são: a malária cerebral, doença pulmonar aguda, edema pulmonar, insuficiência renal, anemia grave e hemorragias. Distúrbios como hipóxia, hipoglicemia, hipotensão e choque também podem ocorrer (Trampuz *et al.*, 2003).

Os achados laboratoriais mais frequentes são: anemia, trombocitopenia e hiperbilirrubinemia, entretanto a intensidade das alterações acompanha o grau de gravidade da doença (Trampuz *et al.*, 2003).

Entre as quatro espécies causadoras de malária humana, O *P. falciparum* é a espécie com maior potencial patogênico, levando às síndromes mais graves como a malária cerebral, anemia grave, falência renal e doença pulmonar (Heddini, 2002). Entretanto, também têm se observado a ocorrência de casos graves de malária por *P. vivax*, com casos de comprometimento pulmonar, anemia grave, coagulação intravascular e até mesmo casos incomuns de falência múltipla de órgãos, malária na gravidez e malária cerebral em pacientes infectados somente por *P. vivax* (Lawn *et al.*, 2003; Trampuz *et al.*, 2003; Da Silva, 2004; Mackintosh *et al.*, 2004; Alexandre *et al.*, 2005).

Porém, fatores como a capacidade de parasitar hemácias de todas as idades e a ocorrência do fenômeno de seqüestro celular, com a aderência das hemácias infectadas ao endotélio vascular, ainda são os grandes diferenciais que conferem o maior potencial patogênico ao *P. falciparum*, principalmente quando se trata de malária cerebral (Mendis *et al.*, 2001; Heddini, 2002).

Esse fenômeno de seqüestro celular ocorre principalmente no cérebro, músculos esqueléticos, placenta, coração, e pulmões. A indução de citocinas por produtos dos parasitos, o aumento da expressão e a redistribuição de receptores endoteliais induzidos por citocinas ou pelos eritrócitos infectados, a diminuição ou mesmo o bloqueio do fluxo sanguíneo local e disfunção dos órgãos afetados são assim um conjunto de eventos que conduzem à malária grave por *P. falciparum* (Heddini, 2002).

Segundo a OMS, um paciente com malária grave é o indivíduo que apresenta ao menos um dos seguintes sintomas: prostração, insuficiência respiratória, edema pulmonar, tonteira, distúrbios de consciência, colapso circulatório, sangramentos anormais, icterícia, hemoglobinúria e anemia profunda, caracterizada por concentração de hemoglobina abaixo de 50g/L e hematócrito inferior a 15%. (Suh, 2004).

Na maioria dos casos, a malária por *P. vivax* é caracterizada como uma doença primariamente febril, cuja conseqüência patológica mais comum é a anemia. O quadro clínico da

doença é marcado pela tríade clássica da malária, febre, calafrios e cefaléia, e o paroxismo é tipicamente curto, cerca de 8 horas (Da Silva, 2004).

Os primeiros sintomas são os calafrios, que podem ser seguidos de tremores. Durante esse período, a temperatura começa a subir rapidamente e pode atingir um pico de 40°C uma ou duas horas após o início dos calafrios. Cerca de duas horas depois a temperatura começa a baixar gradualmente e chega aos níveis normais após um período de quatro ou cinco horas e o paciente experimenta uma intensa sudorese (Mendis *et al.*, 2001; Karunaweera *et al.*, 2003).

Esses sinais e sintomas podem ser acompanhados de mal estar geral, cefaléia, náuseas, vômitos e mialgia, com dores nas costas e articulações. Após cessar o paroxismo o paciente comumente sente alívio e exaustão o que leva a um sono profundo (Mendis *et al.*, 2001; Karunaweera *et al.*, 2003; Da Silva, 2004).

O paroxismo é precedido pelo rompimento sincronizado das hemácias parasitadas, que liberam no sangue as chamadas toxinas da malária, que são produtos parasitários que vão estimular o sistema imunológico e conseqüentemente a patogenia e o início do paroxismo. Essas toxinas ativam as células T, que produzem a interleucina dois (IL-2), que por sua vez irá estimular a produção de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  atua como pirogênio endógeno, assim como outra citocina, a interleucina seis (IL-6), e estimula a febre e o GM-CSF estimula os monócitos que vão participar da resposta imune contra os parasitos (Mendis *et al.*, 2001; Karunaweera *et al.*, 2003).

A invasão das hemácias é um evento crucial para a patogenia, pois permite a continuação do ciclo biológico do parasito e o aumento da parasitemia. Essa invasão ocorre por um processo de invaginação a partir do contato da porção apical do parasito com a superfície dos eritrócitos. Existem vários receptores na superfície das hemácias e a ligação inicial entre a célula e o

merozoíto se dá através da interação entre ácido siálico e a proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1) (Heddini, 2002).

Distúrbios na eritropoiese e o aumento da destruição de hemácias são os principais eventos que provocam a anemia grave. O aumento da destruição das hemácias na malária aguda é provocado diretamente pelo parasito, com eritrócitos infectados e até os não-infectados sendo removidos da circulação através da fagocitose e lise mediada pelo sistema complemento. A redução na produção de eritrócitos está relacionada com a baixa atividade da eritropoetina, que se reflete em um baixo número de reticulócitos nos pacientes infectados (Mendis *et al.*, 2001; Mackintosh *et al.*, 2004;).

Outros mecanismos também estão envolvidos com a patogenia da anemia na malária, como o hipersplenismo e a deficiência de ferro ou de folato. Deficiências desses elementos são muitas vezes comuns em áreas onde a malária é endêmica, o que também contribui para o desenvolvimento da anemia, grave ou não, durante a infecção malárica (Nussenblat *et al.*, 2001).

## 1.5. IMUNIDADE CONTRA A MALÁRIA

Muitos aspectos da imunidade contra a malária não são completamente conhecidos e acredita-se que uma imunidade natural efetiva leve anos para se desenvolver em indivíduos expostos a sucessivas infecções (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Stevenson & Zavala 2006).

A maioria dos antígenos do parasito e das proteínas parasitárias inseridas na membrana de células infectadas apresenta um alto grau de variação e por isso a imunidade natural talvez se desenvolva gradualmente após a ocorrência de várias infecções, o que permitiria que o organismo desenvolvesse um amplo repertório de anticorpos específicos (Plebanski & Hill 2000; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

Indivíduos sem imunidade geralmente desenvolvem doença clínica quando infectados pela primeira vez, ao contrário daqueles que vivem em áreas endêmicas, que estão expostos constantemente ao parasito e podem adquirir um grau de proteção. Dessa forma a imunidade contra a malária não só modifica a prevalência da doença no decorrer da idade como tem um forte efeito no espectro clínico da doença (Marsh & Snow 1997)

Porém essa resposta imune está sujeita a interferência de outros fatores relacionados ao parasito como o estágio evolutivo e também de fatores do hospedeiro como polimorfismos genéticos em genes do sistema imunológico, idade, estado nutricional, entre outros, e que podem afetar a natureza da resposta e o curso da infecção (Riley *et al.*, 2006; Stevenson & Zavala 2006).

### **1.5.1. A importância das Citocinas**

As citocinas são um grande grupo de proteínas ou glicoproteínas que atuam no sistema imunológico através do estímulo ou inibição dos processos de ativação, proliferação e/ ou diferenciação de várias células, além de regularem a secreção de anticorpos, produtos celulares e de outras citocinas. Esse grupo de moléculas participa na promoção, inibição ou re-direcionamento da resposta imune. (Kelso, 1998; Opdal *et al.*, 2003; Henao *et al.*, 2006).

As citocinas atuam como mensageiras de forma global ou em sítios específicos dentro de um sistema celular, pois as células efectoras, de reconhecimento ou de apresentação de antígenos circulam por todo o organismo e entre diferentes órgãos e tecidos. Dentro desse estado dinâmico, o sistema deve gerar uma resposta rápida e integrada a qualquer estímulo antigênico, onde quer que ele ocorra. (Kelso, 1998).

O perfil de síntese de citocinas varia de acordo com o tipo de resposta de células CD4+ que está sendo estimulado. Citocinas que estimulam a resposta inflamatória, como a IL-1, IL-12, TNF-

$\alpha$  e IFN- $\gamma$ , estão relacionadas com a resposta de células T CD4<sup>+</sup> do subtipo Th1 ou do tipo 1, com o estímulo da resposta celular (citocinas pró-inflamatórias), enquanto que a resposta do subtipo Th2, ou tipo 2, está associada com a síntese de citocinas que estimulam a resposta humoral, sendo consideradas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4, 10, 5 e 13 (Baptista *et al.*, 1997; Kelso, 1998; Malaguarnera & Musumeci, 2002; Hunt & Grau 2003; Opdal *et al.*, 2003; Bastürk *et al.*, 2005).

No presente estudo foram investigadas duas citocinas envolvidas na resposta do tipo um (pró-inflamatórias) e reconhecidamente envolvidas na resposta imune e na patogenia da malária.

#### **1.5.1.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )**

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), liberado por células NK (Natural Killer), monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos além de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é uma das principais moléculas efetoras na imunidade contra a malária. O TNF- $\alpha$  pode atuar, ainda, no controle de tumores e de doenças causadas por vírus, bactérias, parasitos e fungos (Richards, 1997). O TNF é sintetizado como uma proteína de membrana que posteriormente é clivada para dar origem a sua forma solúvel (Hajeer & Hutchinson, 2001).

O TNF- $\alpha$  participa ativamente da resposta mediada por células através das funções de (1) Promover o extravasamento de neutrófilos, linfócitos e monócitos a aumentando a adesão às células endoteliais; (2) Controlar a ativação de células T e a expressão de moléculas de MHC e de receptores para adesinas na superfície de diversas células; (3) Induzir apoptose em vários tipos celulares; (4) Induzir a síntese de várias outras citocina pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, entre outras, e (5) regular a produção de Interleucina 12 (IL-12) pelos macrófagos, sendo co-fator para a produção de IFN- $\gamma$  mediada pela IL-12 (Richards, 1997; Malaguarnera & Musumeci, 2002; Gimenez *et al.*, 2003).



Na malária a produção do TNF- $\alpha$  é estimulada especialmente na fase eritrocítica do parasito, com a liberação, sobretudo, do GPI derivado do parasito no sangue (Gimenez *et al* 2003), e altos níveis plasmáticos dessa citocina estão associados com forte resposta de células do tipo Th1 e aumento da gravidade da doença, especialmente a anemia grave e a malária cerebral (Day *et al.*, 1999; Nussenblatt *et al.*, 2001; Gourley *et al.*, 2002; Hunt & Grau, 2003; Mackintosh *et al*, 2004).

Ringwald *et al.* (1991) estudaram os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  no sangue de pacientes com malária aguda por *P. falciparum* e indivíduos controle e relataram que os pacientes apresentaram níveis plasmáticos da citocina maiores que os controles, e que o TNF- $\alpha$  se correlacionou positivamente com a intensidade da parasitemia. Os autores relataram ainda que níveis elevados dessa citocina no sangue demonstram uma maciça ativação celular.

Baptista *et al.* (1997) realizaram estudo semelhante em crianças da ilha de São Tomé e também detectaram níveis maiores de TNF- $\alpha$  nos pacientes e relataram que os níveis plasmáticos da citocina podem predizer uma evolução mais grave da doença.

Day *et al.* (1999) também investigaram a relação entre a malária grave e o TNF- $\alpha$  através do acompanhamento de pacientes com malária grave causada por *P. falciparum*. O estudo demonstrou que os pacientes com formas graves da doença que evoluíram para óbito tiveram os maiores níveis da citocina, o que também indica que níveis elevados de TNF- $\alpha$  podem indicar uma evolução mais grave da doença.

De acordo com esse mesmo estudo os pacientes que desenvolveram malária cerebral tiveram níveis plasmáticos menores de TNF- $\alpha$ , indicando que o nível desta citocina no sangue está relacionado com patologia sistêmica e que a malária cerebral é uma patologia com efeitos mais localizados.

McGuire *et al.* (1999) descrevem que crianças com anemia grave têm níveis de TNF- $\alpha$  mais baixos, em contraste com os níveis comumente altos encontrados em pacientes com malária cerebral.

Como citocina pró-inflamatória o TNF- $\alpha$  tem essa forte relação com a patogenia da malária e durante a evolução da doença existe uma variação na expressão do gene do TNF- $\alpha$ , levando a um nível maior ou menor da citocina dentro da resposta imune. O controle sobre essa expressão ocorre a nível gênico, e polimorfismos no gene do TNF- $\alpha$  podem promover uma maior expressão do gene e assim um desequilíbrio no balanço entre citocinas do tipo Th1 e Th2 no sangue (Nussemlat *et al.*, 2001; Malaguarnera & Musumeci, 2002).

#### **1.5.1.2. Interferon Gama (IFN- $\gamma$ )**

O IFN- $\gamma$  é um importante fator ativador de macrófagos (Richards, 1997), e suas principais fontes são as células NK e células CD4+ e CD8+ ativadas (Malaguarnera & Musumeci, 2002). A secreção de IFN- $\gamma$  é regulada através da IL-12 (Richards, 1997).

As células alvo para o IFN- $\gamma$  produzido são macrófagos, monócitos, neutrófilos, células Th2 e hepatócitos infectados. Quando ativados pelo interferon, os macrófagos produzem TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, radicais de oxigênio, óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de nitrogênio, que atuam, individualmente ou em conjunto, para controlar o crescimento ou eliminar o parasito. Esse controle é realizado através da destruição dos hepatócitos infectados com a ação do NO estimulado pela via da L-arginina, com a ação da enzima óxido nítrico sintetase (Richards, 1997; Malaguarnera & Musumeci, 2002).

O IFN- $\gamma$  é importante no direcionamento da resposta imune para uma resposta celular mais intensa (reposta do tipo Th1) e dessa forma associa-se com uma melhor defesa contra o parasito. Segundo estudo de Torre *et al.* (2002B) uma resposta dirigida por citocinas do tipo Th1, em particular o IFN- $\gamma$ , é importante para limitar a progressão da doença e evitar a ocorrência de complicações durante a fase aguda da doença (Malaguarnera & Musumeci, 2002).

Entretanto o IFN- $\gamma$  também tem forte relação com a patogenia da doença, contribuindo para a potencialização de sintomas agudos da malária, como febre, náusea e dores de cabeça através da indução de TNF- $\alpha$  e IL-1 (Malaguarnera & Musumeci, 2002). O aumento na regulação de vários tipos de moléculas de adesão nas células endoteliais é um outro fator que reforça o envolvimento do interferon gama com a patogenia da malária (Wenisch *et al.*, 1995).

Luty *et al.* (1999) relataram o papel do IFN- $\gamma$  na proteção contra re-infecções e na defesa do organismo contra as formas teciduais do parasito. Ainda segundo esses autores, estudos *in vitro* demonstraram o efeito de inibição do crescimento dessas formas teciduais do parasito e também de formas sanguíneas, só que de forma mais indireta através da ativação de macrófagos, e que essa inibição tem como molécula efetora o NO.

Cabantous *et al.* (2005) investigaram a influência do IFN- $\gamma$  na patogenia da malária cerebral, com o acompanhamento de crianças com malária cerebral e com malária não complicada atendidas em hospital de Mali, e demonstraram que as crianças que apresentavam malária não-complicada tinham níveis maiores de IFN- $\gamma$ .

Os autores concluíram que os níveis cerca de três vezes maiores de IFN- $\gamma$  nas crianças que conseguiram controlar a infecção e não desenvolveram complicações mostram que essa citocina pode ter papel crítico no controle da malária e tem uma função maior de proteção do que qualquer ação relacionada com o agravamento da doença.

Outros autores relataram altos níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes com malária aguda na Ásia e África (Hunt & Grau, 2003). Wenisch *et al.* (1995) também encontraram níveis séricos elevados de interferon gama em pacientes com malária sem tratamento.

Deloron *et al.* (1991) também expõem que altos níveis séricos de IFN- $\gamma$  estão associados com proteção contra a malária, mas com a necessidade da ação em conjunto com outras citocinas. De acordo com esses autores o IFN $\gamma$  endógeno produzido pode persistir por meses após o início da doença, atuando contra as formas hepáticas para prevenir a ocorrência de possíveis re-infecções.

Estudos com modelos animais de malária já mostraram que camundongos tratados com IFN- $\gamma$  exógeno apresentaram diminuição de eritrócitos parasitados durante infecção por *P. chabaudi*. Outro estudo mostrou que tratamento diário com IFN- $\gamma$  recombinante resultou em evolução menos grave e maior taxa de sobrevivência em camundongos infectados por cepa letal de *P. yoelii* (Su & Stevenson, 2000).

Estudos com camundongos sem receptores para o IFN- $\gamma$  também já associaram a citocina com a patogenia da malária. Os Experimentos demonstraram resistência desses camundongos contra a malária cerebral, porém os animais permaneciam susceptíveis a malária grave e morte, o que mostra a importância de outras citocinas pró e anti-inflamatórias no curso da doença (Mackintosh *et al.*, 2004).

### **1.5.2. Mecanismos Efetores na Defesa Contra o *Plasmodium***

Muito do que se conhece sobre a resposta imune ou os mecanismos de defesa do organismo contra o parasito foi obtido através de experimentos *ex vivo* e com modelos animais da doença (Angulo & Fresno, 2002).

A imunidade contra o *Plasmodium* envolve as respostas celular e humoral, com a interação entre anticorpos, células apresentadoras de antígenos (APC), células B, células T e células NK (*Natural killers*).

São três os principais objetivos dessa resposta protetora: (1) interromper o ciclo de vida do parasito, (2) prevenir o processo patogênico da doença e (3) tentar bloquear a transmissão (Hisaeda *et al.*, 2005).

Uma resposta imune efetiva parece ser aquela que inicia de forma rápida mediada por citocinas pró-inflamatórias para eliminar os parasitos intracelulares e as células infectadas e depois deve ser suprimida de forma igualmente rápida pela ação das citocinas anti-inflamatórias de forma que se controle o crescimento parasitário sem nenhuma consequência imunopatológica (Riley *et al.*, 2006).

Nesse contexto vemos que o controle efetivo da infecção depende de um delicado equilíbrio ou de uma progressão coordenada entre as respostas de células T CD4+ do tipo Th1 e Th2, ou resposta inflamatória e anti-inflamatória. Esses dois tipos de resposta são fundamentais, mas precisam ser adequadamente controladas em tempo e intensidade e qualquer fator que interfira nesse controle pode alterar o curso e as manifestações da malária no indivíduo (Ângulo & Fresno, 2002; Riley *et al.*, 2006).

E devido a esse balanço entre controle da infecção e prevenção da imunopatologia podemos citar a existência de mecanismos de tolerância imunológica, que existem para que os parasitos possam ser eliminados com mínimo dano ao organismo. Esses mecanismos envolvem a supressão da resposta e regulação das células ativadas, nos quais os agentes mais importantes são os linfócitos T regulatórios, ou células T CD4+ CD25+, que inibem a linfoproliferação, e as citocinas inibitórias como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) que participam na inibição da resposta inflamatória (Riley *et al.*, 2006).

Experimentos com modelos animais têm sido muito úteis na tentativa de se elucidar os mecanismos de interação entre as células, citocinas e os parasitos dentro da resposta protetora. A primeira forma do parasito a estimular o sistema imune é o esporozoíto, que é inoculado pela fêmea anofelina e irá infectar os hepatócitos. A resposta imune contra os parasitos no fígado ocorre através de anticorpos que podem bloquear os esporozoítos e prevenir a invasão das células ou por meio da resposta de citotoxicidade das células T CD8<sup>+</sup> contra os hepatócitos infectados. (Deloron *et al.*, 1991; Malaguarnera & Musumeci, 2002; Hisaeda *et al.*, 2005).

A resposta contra as formas hepáticas do parasito visa erradicar a infecção impedindo a invasão dos hepatócitos, prevenindo a ocorrência da fase sanguínea e consequentemente a transmissão da doença. Cerca de trinta minutos após a picada os esporozoítos chegam ao fígado e a primeira resposta ocorre por meio de anticorpos, que podem prevenir a invasão das células bloqueando os esporozoítos livres. Aquelas formas que escapam da ação dos anticorpos e invadem os hepatócitos serão combatidas pelas células T produtoras de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), células T CD8<sup>+</sup> e também em parte pelos anticorpos, que se ligam às células infectadas e podem mediar a sua lise pela ativação do sistema complemento ou no processo de citotoxicidade dependente de anticorpos (Plebanski & Hill 2000; Marrot & Zavala 2004; Pouniotis *et al.*, 2004).

A apresentação dos antígenos dos parasitos teciduais ocorre principalmente através das células dendríticas e a principal proteína parasitária é a circunporozoíta (CS) presente na superfície do parasito. Essa proteína participa da ligação entre o esporozoíto e o hepatócito e por isso é o alvo principal para a ação dos anticorpos neutralizantes (Plebanski & Hill 2000).

As células NK, T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são responsáveis pelo combates aos parasitos intracelulares. A ativação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> pela apresentação dos antígenos via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) tipo II e I respectivamente tem como principal

efeito a liberação de IFN- $\gamma$ , que por sua vez irá estimular a produção de interleucina 12 (IL-12), citocina que amplifica a resposta estimulando as células NK a produzirem mais IFN- $\gamma$  (Doolan & Hoffman 2000).

Esse interferon gama produzido participará da eliminação dos parasitos através da indução da enzima óxido nítrico sintetase, pela via dependente de L-arginina, para a produção de óxido nítrico (NO) que atua diretamente na eliminação do esquizonte intracelular ou mesmo da célula parasitada. Outros radicais livres tóxicos para o parasito, como os radicais de oxigênio e reativos intermediários de nitrogênio também auxiliam nesse processo (Kirunpetcharat *et al.*, 1999; Doolan & Hoffman 2000; Riley *et al.*, 2006).

Os parasitos se multiplicam no interior dos hepatócitos por um período de aproximadamente sete dias para depois promoverem a lise da célula, liberando os merozoítos na circulação que irão invadir as hemácias dentro do ciclo sanguíneo da doença. Uma vez no interior das células sanguíneas se iniciarão ciclos de multiplicação, lise e invasão de novas células que caracteriza a periodicidade das manifestações clínicas da malária (Plebanski & Hill 2000).

Nessa fase a resposta imune atua principalmente através de anticorpos e de células T CD4+, tendo as células T CD8+ papel limitado ou mesmo nenhuma ação. Os anticorpos dirigidos contra proteínas dos merozoítos livres ou proteínas parasitárias expressas em células infectadas podem inibir a invasão de novas células e interromper o ciclo biológico do *Plasmodium*, prevenir a citoaderência ou mesmo promover a lise da hemácia parasitada através da ativação do sistema complemento (Plebanski & Hill 2000; Artavanis & Tsakonas 2003).

Uma série de toxinas e substâncias liberadas no sangue com o rompimento das hemácias parasitadas, como o glicofosfatidil inositol (GPI) derivado do parasito estimulam os macrófagos a produzirem TNF- $\alpha$  e células T CD4+ produzem IFN- $\gamma$ . Apesar de apresentarem um papel mais

calaramente ligado a proteção durante a fase hepática, na fase sanguínea essas citocinas apresentam papel mais ambíguo, com potencial para participarem da proteção e também da patogenia da doença (Plebanski & Hill 2000; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

O IFN- $\gamma$  juntamente com as células NK atuam como potentes fatores de ativação dos macrófagos para potencializar a fagocitose e a morte das hemácias infectadas. Os macrófagos ativados também produzem outras citocinas como o TNF- $\alpha$ , interleucina um (IL-1) e interleucina seis (IL-6) que atuam como pirogênicos endógenos, estimulando a febre, e também participam dentro da resposta inflamatória (Kirunpetcharat *et al.*, 1999; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

O IFN- $\gamma$  também induz a produção de anticorpos IgG específicos contra antígenos de parasitos do estágio sanguíneo, auxiliando assim nos mecanismos de inibição celular com a ação de anticorpos (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

As manifestações clínicas da doença também ocorrem principalmente devido a ação dessas citocinas inflamatórias, pois uma resposta inflamatória exacerbada pode promover danos teciduais e efeitos sistêmicos graves durante a remoção dos parasitos, como anemia grave e a malária cerebral (Malaguarnera & Musumeci, 2002; Riley *et al.*, 2006).

Observações sobre populações de áreas endêmicas mostram que a malária grave, particularmente a malária cerebral, não é comum em crianças de pouca idade que estão experimentando seu primeiro episódio da doença e sim em crianças ligeiramente mais velhas que já apresentaram dois ou mais episódios da doença. Isso se explica possivelmente porque sucessivas infecções levam a uma maior produção do IFN- $\gamma$ , o que juntamente com a imunidade adquirida ao longo das infecções tornam o organismo mais predisposto a desenvolver uma malária grave (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

O estudo de Wenisch *et al.* (1995), sugeriu que ambas as citocinas pró e anti-inflamatórias, Th1 e Th2 respectivamente, estão co-expressas na fase aguda da doença, ilustrando a



complexa relação entre o parasito e o hospedeiro, e que o balanço entre essas respostas determina a sobrevivência do parasito e a evolução da doença.

## 1.6. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Existem inúmeras cepas de *Plasmodium* na natureza, algumas com maior potencial patogênico do que outras. Cada cepa possui um potencial patogênico intrínseco, porém fatores relacionados à susceptibilidade do hospedeiro também são importantes (Nacher *et al.*, 2001).

A identificação de fatores relacionados com a resistência contra a malária (formas graves ou não), particularmente os fatores ligados à regulação gênica da resposta imunológica, pode contribuir para um maior entendimento das interações que ocorrem entre o parasito e o hospedeiro, além de também auxiliar na busca de novas medidas de controle e na capacidade de poder melhor avaliar indivíduos que estejam em risco potencial de vida (Modiano *et al.*, 2001; Nacher *et al.*, 2001).

A malária é uma doença responsável pela seleção e manutenção de alelos humanos em populações de áreas endêmicas da doença. Nesse grupo estão inclusos genes codificadores de moléculas MHC de classe II, do TNF- $\alpha$  entre outros levando em consideração que existe uma complexa relação entre o parasito e o hospedeiro, com o envolvimento cada vez maior de variantes genéticas (Craig *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos podem evidenciar a presença de populações particulares resistentes à infecção. O *P. vivax* e o *P. falciparum*, como as duas espécies mais importantes entre as causadoras da malária humana, co-existem em muitas partes do mundo. É conhecido que o *P. vivax* é incomum em uma região no oeste da África e que nessa região a maioria dos indivíduos são negativos para o antígeno sanguíneo Duffy. Este fato permitiu (ou auxiliou) a descoberta de que indivíduos

negativos para esse antígeno sanguíneo (Duffy) são resistentes à infecção pelo *Plasmodium vivax*, parasito que não é capaz de invadir os eritrócitos sem a presença do antígeno em questão (Kwiatkowski, 2000).

A pesquisa de como a genética controla a intensidade da infecção não é simples de ser realizada, pois o ciclo biológico do parasito leva a uma constante variação na parasitemia circulante (Kwiatkowski, 2000). Os estudos genéticos também encontram dificuldades na natureza multifatorial das doenças infecciosas, que além de fatores relacionados com os patógenos e com o hospedeiro, também sofrem influencia de fatores relacionados ao meio ambiente (Henaó *et al.*, 2006).

Apesar das citocinas apresentarem um baixo grau de variação genética, um número cada vez maior de estudos vem implicando os polimorfismos localizados em regiões reguladoras de genes de citocinas como fator que pode influenciar na susceptibilidade ou na evolução de uma doença infecciosa (Henaó *et al.*, 2006).

Polimorfismos na região reguladora de citocinas vêm sendo descritos e genótipos específicos de algumas importantes citocinas envolvidas na resposta imune estão sendo associados com risco para rejeição de órgãos após transplantes, e também com a susceptibilidade ou gravidade em certas doenças infecciosas e auto-imunes (Gentile *et al.*, 2003).

Esses polimorfismos podem resultar em alterações nos sítios de reconhecimento de alguns fatores de transcrição e exercer influência positiva ou negativa sobre os níveis de produção de citocinas importantes na resposta imune (Henaó *et al.*, 2006).

Nesse contexto os estudos genéticos são importantes para investigar a participação de um gene específico em eventos que podem alterar o curso ou a gravidade de doenças importantes como a malária (Henaó *et al.*, 2006).

No presente estudo os polimorfismos estudados foram três polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *Single nucleotide polymorphism*), dois na região promotora do gene do TNF-

$\alpha$  e um no primeiro íntron do gene do IFN- $\gamma$ . Os SNP consistem na mudança de um único nucleotídeo e são as formas mais abundantes de variação genética, com frequência no genoma de um SNP a cada 1.000 pares de base (Johnson *et al.*, 2004).

### **1.6.1. Polimorfismos Relacionados ao Gene do TNF- $\alpha$**

O TNF é uma citocina que atrai bastante interesse devido sua forte relação com a defesa e com a patogenia da doença (Kwiatkowski, 2000). O cluster gênico do TNF está localizado no braço longo do cromossomo seis (Hajeer & Hutchinson, 2001; González *et al.*, 2003).

Existem três polimorfismos na região promotora do gene TNF- $\alpha$ , nas posições -238, -308 e -376 a partir do sítio de início da transcrição, que merecem destaque. (Hajeer & Hutchinson, 2001). Esses três SNP são caracterizados pela mudança de uma guanina (G) por uma adenina (A), e o significado funcional dessa mutação é uma alteração na ligação de fatores de transcrição, o que pode afetar a expressão do gene, levando a maiores ou menores níveis plasmáticos da citocina (Hajeer & Hutchinson, 2001).

O alelo que vem sendo alvo da maioria dos estudos é o TNF-308\*A, que já foi associado com a susceptibilidade a malária grave, especialmente a malária cerebral, incluindo casos fatais ou de graves seqüelas neurológicas (Hajeer & Hutchinson, 2001; González *et al.*, 2003; Henao *et al.*, 2006). O significado funcional dessa mutação está ligado com o aumento da expressão do gene, pois afeta a seqüência consenso para a ligação do fator de transcrição AP-2 (Kwiatkowski, 2000; González *et al.*, 2003).

Portadores desse alelo (TNF-308\*A) podem apresentar um risco quatro vezes maior de desenvolver a malária cerebral, e esse risco aumenta para sete vezes para o desenvolvimento de seqüelas neurológicas com a infecção (Hajeer & Hutchinson, 2001).

Um estudo realizado por González *et al.* (2003), na Espanha, com um grupo de pacientes portadores de uma doença inflamatória crônica, não encontrou relação entre a presença do alelo TNF-308\*A e a susceptibilidade a essa doença. No entanto, quando comparou o polimorfismo com a produção do TNF $\alpha$ , o estudo encontrou um nível quase sete vezes mais alto de TNF $\alpha$  sérico nos indivíduos portadores do alelo TNF-308\*A do que nos portadores de TNF-308\*G.

O polimorfismo -238 é o mais estudado depois do -308 (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004) e o alelo TNF-238\*A já foi associado principalmente com a anemia grave provocada pela malária na Gâmbia (Kwiatkowski, 2000; Wirzet *et al.*, 2004). Acredita-se que o alelo TNF-238\*A pode influenciar na maior expressão de TNF e esse polimorfismo já foi associado com doenças auto-imunes e infecciosas. Entretanto existe um estudo até mesmo ligando o polimorfismo com a diminuição da expressão do gene (Jang *et al.*, 2001).

Alguns estudos também fazem associação do alelo TNF-238\*A com outras doenças infecciosas e com o câncer. De Oliveira *et al.* (2004) defende uma associação significativa do alelo mutante com a susceptibilidade e risco de desenvolver formas clínicas graves de tuberculose (extra-pulmonar e disseminada), outra doença infecciosa muito importante.

Jang *et al.* (2001) relacionaram esse polimorfismo com proteção contra o câncer. Nessa amostra alelo TNF-238\*A estava significativamente aumentado nos pacientes com câncer. Selavaraj *et al.* (2001) e Rodríguez-Pérez *et al.* (2004), por outro lado, não encontraram associação entre o alelo e doença, estudando grupos de pacientes com tuberculose e com Doença de Chagas, respectivamente.

As frequências relatadas para o alelo TNF-238\*A em determinadas populações são 7,1% em Coreanos, 3% em Japoneses, 2% em população da Suécia, 6,3% em Italianos e 9% em Sul-africanos (Jang *et al.*, 2001). Wirz *et al.* (2004) relatam a frequência de 1 a 9%, na população mundial, para o alelo TNF-238\*A.

Um estudo realizado por Mombo *et al.* (2003) demonstrou uma frequência de 9,6% para esse alelo no Gabão, África. Frequências de 2,1% em afro-americanos, 6% para caucasianos e 9,6% para africanos da região do sub-shaara também são citadas nesse mesmo estudo. Gourley *et al.* (2002) referem uma frequência de 6,1% em uma população do Quênia.

O terceiro polimorfismo na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , na posição -376, já foi associado a doenças infecciosas, como a malária, tuberculose, assim como a doenças auto-imunes (Wirz *et al.*, 2004).

O alelo TNF-376\*A participa no processo de ligação ao fator de transcrição Oct-1, participando, dessa forma, da expressão do gene. (Kwiatkowski, 2000). O polimorfismo altera a conformação do sítio do Oct-1, de forma que o alelo TNF-376\*A se liga ao Oct-1 e o TNF-376\*G não (Hajeer & Hutchinson, 2001).

Martinez *et al.* (2004) relatam uma forte associação do alelo TNF-376\*A com a esclerose múltipla. Tal associação foi primariamente encontrada em um primeiro estudo na Espanha (com uma pequena população) e posteriormente confirmada com o aumento do número amostral, na mesma população. Segundo esses autores a frequência do alelo para a população espanhola foi de 9,2%.

A partir dos achados de que aos alelos TNF-308\*A e TNF-376\*A estão associados com a malária cerebral e que o alelo TNF-238\*A parece estar relacionado com uma menor susceptibilidade a essa complicação, sugere-se que a evolução clínica da malária pode estar ligada a uma complexa

variação genética dentro do gene do TNF- $\alpha$ , e que a seleção natural pode ter favorecido a formação de haplótipos que balanceiam os riscos e benefícios da ocorrência das duas complicações da doença (McGuire *et al.*, 1999).

De fato, existe associação entre os alelos TNF-376\*A, TNF-238\*A e TNF-308\*A em algumas populações, como Caucasianos. Hajeer *et al.* (2001) encontraram associação entre os três alelos, e também entre os alelos e alta produção de TNF- $\alpha$  *in vitro*. Zambom *et al.* (2005) também relataram uma associação entre os alelos TNF-238\*A e TNF-376\*A.

Wirz *et al.* (2004) chegaram a importantes conclusões em um estudo no Norte da Sardenha, ilha Italiana localizada no mar mediterrâneo. Segundo os autores, os alelos TNF-238\*A e TNF-376\*A apresentaram uma frequência elevada nessa população.

Como a população estudada é considerada geneticamente isolada, os autores sugerem que a presença de uma maior frequência de alelos raros demonstra que os mesmos foram selecionados positivamente, por conferirem vantagem seletiva para essa população (Wirz *et al.*, 2004).

Esse mesmo estudo relaciona todos os três alelos, TNF-308\*A, TNF-238\*A e TNF-376\*A, de forma independente, com a gravidade da malária. Do ponto de vista evolutivo estima-se que o alelo TNF-376\*A foi originado depois do TNF-238\*A. Normalmente, encontra-se nessas populações o portador dos dois alelos, formando os haplótipos TNF-376\*A/ TNF-238\*A ou TNF-376\*A/ TNF-238\*G. Segundo os autores, os alelos TNF-238\*A e TNF-376\*A possuem uma associação de 98% na população estudada, bastante elevada compara aos 5% estimados para a população em geral (Wirz *et al.*, 2004). Knight *et al.* (1999) também relatam em sua investigação que o polimorfismo TNF-376 é mais recente na evolução humana.

As frequências dos diferentes genótipos, ainda relatadas por esse mesmo estudo, para o sistema TNF -376 foram: ausência do genótipo A/A; frequência de 6% para o genótipo A/G e de 94%

para o genótipo G/G. Em relação ao sistema TNF-238 as frequências encontradas foram de 1% para o genótipo A/A; 11% para o genótipo A/G; e 88% para o genótipo G/G (Zambon *et al.*, 2005).

Essas frequências estão de acordo com dados de outros estudos, relatando que os alelos variantes do TNF- $\alpha$  existem em baixas frequências ao redor do mundo (Wirzet *et al.*, 2004). Gourley *et al* (2002) descrevem uma frequência para o alelo TNF-376\*A de 6% em uma população do Quênia e uma frequência entre 0,5 e 4% em caucasianos.

Da Silva (2004) estudou uma população de pacientes com *P. vivax* em Belém, Estado do Pará, buscando relacionar as manifestações clínicas, os níveis de TNF $\alpha$  e o alelo mutante TNF-308\*A. Não foi encontrada nenhuma associação entre a mutação e uma maior produção de TNF sérico. No entanto, a autora relata uma associação entre os níveis de TNF e as manifestações clínicas, como a febre, principal sintoma da malária, demonstrando a importância da citocina na patologia da doença.

Esse achado motivou o desenvolvimento deste estudo, que tentou investigar se os níveis de TNF- $\alpha$  e as manifestações clínicas mais graves da doença não poderiam estar associados com uma mutação no gene do IFN- $\gamma$  ou com os outros dois alelos mutantes do TNF- $\alpha$  e se a associação entre os níveis da citocina iria manter-se em relação a esses últimos polimorfismos citados.

De acordo com May *et al.* (2000) a presença dos alelos TNF-238\*A e TNF-376\*A podem influenciar no balanço Th1/Th2, através da maior ou menor expressão do TNF- $\alpha$ , afetando assim a expressão clínica da malária.

O TNF foi a primeira citocina estudada em busca de correlação entre o polimorfismo e a susceptibilidade à malária (Mazier *et al.*, 2000). Tais formas variantes demonstram que uma produção excessiva de TNF- $\alpha$  possui uma participação importante na patogenia da malária grave e principalmente da malária cerebral (McLeod *et al.*, 1995; Burt, 1999; Mazier *et al.*, 2000; Hajeer & Hutchinson, 2001; Torre *et al.*, 2002a).

### 1.6.2. Polimorfismos Relacionados ao Gene do IFN- $\gamma$

O IFN- $\gamma$  é uma citocina essencial na geração de uma resposta celular efetiva contra patógenos intracelulares (Bream *et al.*, 2000) e a variabilidade genética no gene do IFN- $\gamma$  não tem sido previamente associada com susceptibilidade a doenças infecciosas e parasitárias na população em geral (Rossouw *et al.*, 2003). Sua atividade biológica está sob regulação tanto em nível transcricional como também em nível pós-transcricional.

O gene do Interferon gama está localizado no cromossomo 12. Estudos já demonstraram que a região de repetição CA, seqüência microsatélite no primeiro íntron do gene do IFN $\gamma$  humano é polimórfica e estaria ligada com alterações na expressão do gene (Bream *et al.*, 2000; Rossouw *et al.*, 2003).

Cinco alelos desse microsatélite foram descritos, diferindo no número de repetições da região CA, variando de 11 a 15 repetições, que correspondem aos alelos designados de um a cinco. Indivíduos portadores do alelo dois (2), de doze repetições CA, apresentariam uma maior produção de IFN- $\gamma$  do que indivíduos com outra combinação de alelos (Pravica *et al.*, 2000).

Recentemente, um novo polimorfismo foi descrito no primeiro íntron deste gene. O SNP na ponta 5' da região de repetição CA está localizado na posição +874 a partir do sítio de início da tradução e é caracterizado pela mudança de adenina (A) para timina (T). Esse novo polimorfismo, portanto, pode ser relacionado ao aumento da expressão do gene do IFN- $\gamma$ , através de uma alteração no sítio de ligação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Pravica *et al.*, 2000).

O polimorfismo está ligado fortemente ligado com a presença do alelo Dois, de alta produção do IFN- $\gamma$  (Pravica *et al.*, 2000; Scola *et al.*, 2003; Halma *et al.*, 2004; Zambom *et al.*, 2005).



A correlação existente entre o alelo IFN+874\*T e a presença do alelo Dois, que corresponde a alta produção do IFN- $\gamma$ , foi demonstrada em um estudo no qual todos os indivíduos homocigotos para o alelo Dois também eram homocigotos para o alelo IFN+874\*T, os heterocigotos para o alelo Dois eram igualmente heterocigotos para os alelos IFN+874\*T/ IFN+874\*A e os indivíduos negativos para o alelo Dois foram homocigotos para o alelo IFN+874\*A (Pravica *et al.*, 2000).

Apesar de ser uma citocina importante na defesa do organismo contra a malária (Torre *et al.* 2002b), não se tem pesquisado a associação da doença com os polimorfismos do gene do IFN- $\gamma$ . Entretanto já se associou a presença da mutação com outras doenças infecciosas, principalmente tuberculose, e auto-imunes.

Lio *et al.* (2002) descrevem uma frequência significativamente menor do alelo IFN+874\*T em pacientes com tuberculose, concluindo que a ausência do alelo pode ser um fator de risco para desenvolver a doença. Henao *et al.* (2006) relatam uma associação do alelo com formas clínicas mais graves dessa mesma doença.

Bravo *et al.* (2003) sugerem uma relação entre o alelo mutante e um menor risco de contrair brucelose, visto que pacientes com a doença tinham comumente o alelo selvagem (IFN+874\*A).

Noutra investigação, o genótipo homocigoto T/T, ligado a uma elevada produção de IFN $\gamma$ , foi encontrado de forma reduzida em um grupo de pacientes da população italiana com tuberculose crônica (Scola *et al.*, 2003).

Halma, *et al.* (2004), que estudaram um grupo de pacientes com câncer, verificaram uma relação significativa entre o alelo dois (2) e uma maior sobrevivência dos pacientes, com maior produção de IFN- $\gamma$ .

Zambom *et al.* (2005) estudaram pacientes com *Helicobacter pylori* e concluíram que a presença de indivíduos homozigotos para o alelo IFN+874\*T, apresentam risco duas vezes maior de contrair a infecção por cepas com a ilha de virulência CagA.

## 1.7. JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença infecciosa que atinge milhões de pessoas por ano em todo o mundo, levando a muitos óbitos principalmente no continente africano. As duas espécies de *Plasmodium* que mais comumente acometem o homem, *P. vivax* e *P. falciparum*, possuem potenciais patogênicos variados.

Contudo, além do potencial patogênico do parasito, existem outros fatores, relacionados ao ambiente e ao hospedeiro que são importantes na resistência ou susceptibilidade a uma determinada doença.

A identificação de fatores ligados ao hospedeiro pode aumentar o entendimento das interações entre o parasito e o hospedeiro, assim como de mecanismos envolvidos na patologia e imunidade, e também pode contribuir para a elaboração de novas medidas de controle.

Nesse contexto, destacam-se os fatores envolvidos na regulação gênica da resposta imune, o que inclui os polimorfismos nos genes codificadores de moléculas envolvidas nessa resposta, como o MHC e outras, como as citocinas mediadoras da resposta imune e da inflamação. O TNF- $\alpha$  é uma das principais moléculas efetoras da resposta contra a malária, e ao lado do IFN- $\gamma$ , são potentes indutores da resposta celular e inflamatória.

Excluindo o alelo -308A do TNF $\alpha$ , que está ligado a maior risco de desenvolver malária grave e, principalmente, malária cerebral, os outros polimorfismos do TNF $\alpha$ , e o polimorfismo do IFN- $\gamma$ , ainda não foram amplamente estudados em relação à malária.

Esses estudos também são poucos no Brasil, principalmente na região da Amazônia Legal, que acumula mais de 90% dos casos de malária do país. O estado do Pará, inserido nessa região, possui um elevado número de casos da doença, embora os programas de controle tenham provocado uma redução na incidência, e seria de extrema utilidade as investigações sobre as relações entre parasitos e hospedeiros, elucidando processos patológicos e ajudando nas medidas de controle.

A malária por *P. vivax* foi escolhida pois o maior número de casos de malária na região são causados por essa espécie de *Plasmodium*. Aparentemente, devido a provocar uma patologia de menor gravidade o *P. vivax* conseguiu se adaptar melhor ao hospedeiro humano, levando a uma maior morbidade quase que em todo o mundo, com exceção da região sub-shaariana da África.

Assim, estudar os polimorfismos relacionados a componentes genéticos da resposta imune pode contribuir muito no que entendemos hoje sobre a regulação da resposta imune, e sua relação com a incidência ou com a evolução da doença.

## 1.8. OBJETIVOS

### 1.8.1. Objetivo Geral

Investigar a variabilidade genética relativa a três polimorfismos de nucleotídeo único presentes em genes de duas citocinas envolvidas na resposta imunológica (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) em uma amostra da população de Belém do Pará composta de 81 indivíduos infectados (primeira infecção) com o *Plasmodium vivax* e de 130 indivíduos sadios desta população, formando um grupo controle e investigar na amostra de indivíduos infectados uma possível associação entre esses polimorfismos e a gravidade da manifestação da malária.

### 1.8.2. Objetivos Específicos

Comparar as frequências genóticas e alélicas observadas entre o grupo de pacientes com malária e o grupo de indivíduos tomados como controle e verificar possíveis diferenças;

Padronizar no LGHM a técnica para a investigação de polimorfismos de eventos únicos através do uso da metodologia de discriminação alélica usando o sistema TaqMan para PCR em tempo real;

Caracterizar frequências genóticas e alélicas nas amostras investigadas e utilizar os dados obtidos nos testes estatísticos de associações;

Investigar possíveis associações entre a variabilidade genética observada para os polimorfismos estudados e a gravidade das manifestações clínicas da malária, utilizando-se dos parâmetros níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$ , intensidade da parasitemia e escores clínicos de sinais e sintomas da malária.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. A AMOSTRA INVESTIGADA

A amostra de estudo consistiu de oitenta e um (81) pacientes atendidos no Ambulatório/Laboratório de ensaios clínicos em malária do Instituto Evandro Chagas e cento e trinta (130) indivíduos controles selecionados aleatoriamente na população de Belém do Pará.

Todos os pacientes foram positivos para a infecção por *Plasmodium vivax* em exame de gota espessa eram primoinfectados (primeiro episódio da doença) e estavam doentes há no máximo três semanas. Mulheres grávidas, ou indivíduos com relato de outras doenças, infecciosas ou auto-imunes, e usuários de anti-inflamatórios ou corticosteróides, foram excluídos na seleção.

Todo paciente com resultado positivo para o *P. vivax* foi abordado e esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, e questionado sobre a vontade de participar. Diante da resposta positiva do paciente, o mesmo era esclarecido sobre as normas de estudo com seres humanos e assinou termo de consentimento voluntário para participar do estudo.

Os 130 indivíduos controle foram selecionados aleatoriamente em um banco de amostra do laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará. A amostra foi formada por 65 homens e 65 mulheres, todos não-aparentados e residentes na cidade de Belém – PA.

### 2.2. DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES INVESTIGADOS

De cada paciente, do total selecionado para participar do estudo, foram coletados dados referentes às manifestações clínicas da malária no dia do diagnóstico e coleta do sangue, considerado

como dia zero (D0), dados esses que foram utilizados para comparações entre a gravidade dos sinais e sintomas e as frequências alélicas dos polimorfismos investigados.

### **2.2.1. Parasitemia**

Os pacientes que participaram do estudo tiveram a intensidade da parasitemia mensurada pelo método da gota espessa, método utilizado para fazer o diagnóstico de malária por *P. vivax*, e o resultado correspondeu ao número de parasitos contidos em 1  $\mu$ L de sangue.

### **2.2.2. Sinais e Sintomas**

Quatorze sintomas (febre, calafrios, cefaléia, astenia, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarréia, anorexia, tosse, dispnéia e colúria) foram avaliados e para cada paciente foi dada uma graduação associada com a intensidade referida para esses sintomas.

Foi dada uma pontuação de acordo com a intensidade dos sintomas (zero para ausência do sintoma; um para sintoma com pouca intensidade; dois para sintoma moderado; três para sintoma forte e quatro para sintoma muito intenso) e a somatória desses pontos para cada sintoma referido apresentava a graduação do paciente no D0.

O mesmo sistema de pontos foi utilizado para os sinais (temperatura, palidez e icterícia) e os escores de sinais e sintomas foram somados para obter a graduação das manifestações clínicas da doença.

A temperatura auxiliar foi medida para cada paciente no momento da coleta de sangue para mensurar a febre, dado clínico importante relacionado com a malária.

### 2.2.3. Concentração Plasmática do TNF- $\alpha$

Uma alíquota do sangue de cada paciente foi utilizada para medir a concentração plasmática do TNF- $\alpha$  no D0. Os dados obtidos foram importantes tentar associar a presença dos polimorfismos do gene da citocina com uma maior produção do TNF- $\alpha$ .

A quantificação foi feita pelo método de imunoabsorção enzimática através do teste ELISA do tipo sanduíche e os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ mL).

### 2.3. EXTRAÇÃO DO DNA

O sangue periférico obtido de cada paciente foi utilizado para a extração do DNA através do método fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* (1989) e o DNA obtido foi, em seguida, quantificado e todas as amostras foram diluídas para uma mesma concentração (30 ng/ $\mu$ L) para serem utilizadas na amplificação dos fragmentos contendo os polimorfismos estudados.

### 2.4. TÉCNICA DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.

Foi utilizada a técnica de discriminação alélica pelo sistema TaqMan para PCR em tempo real. Foram empregados conjuntos de *primers* e sondas específicos para SNP e selecionados para funcionar utilizando condições universais de reação e de amplificação. Para os polimorfismos TNF-238 e TNF-376 foram utilizados os kits de identificação de número de identificação C\_\_\_2215707\_10 (*Validated* - Applied Biosystems) e C\_\_\_7514878\_20 (*Pre-made* - Applied

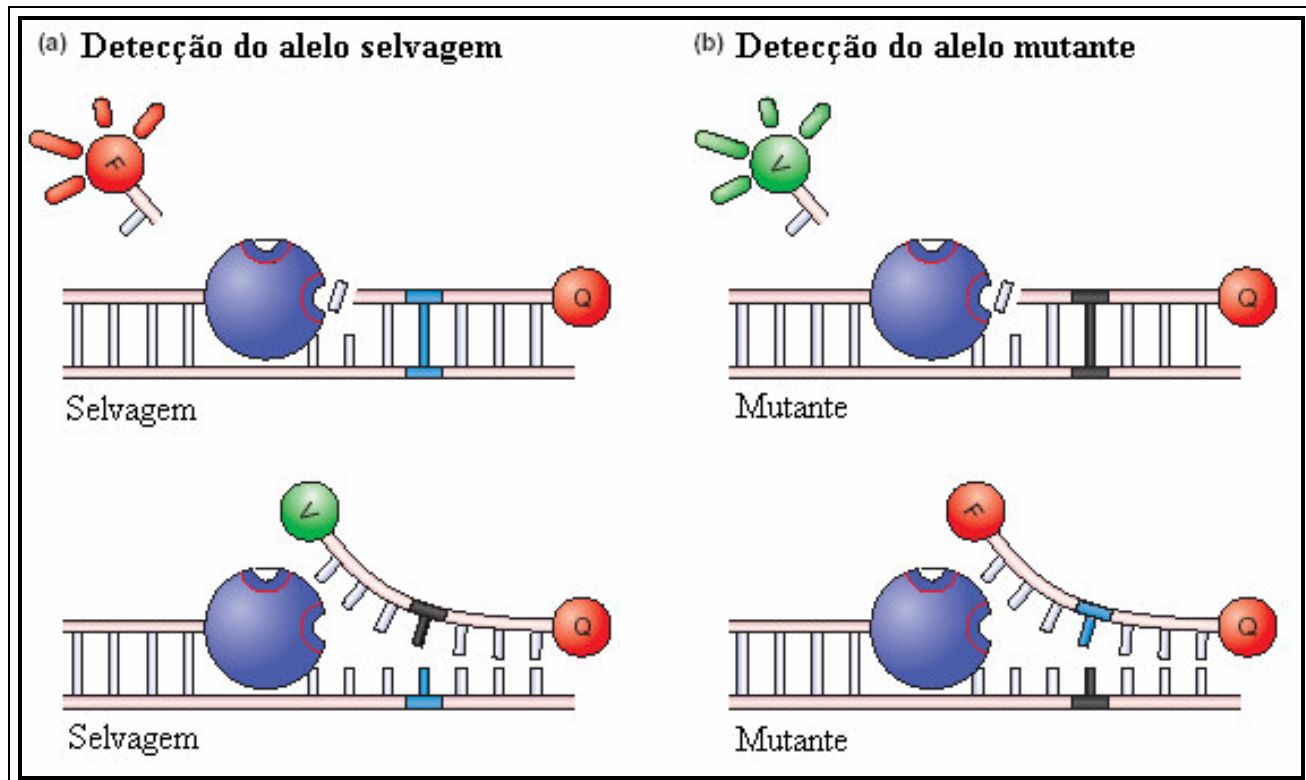
Biosystems) respectivamente. Para o polimorfismo IFN+874 o kit usado foi desenhado pelo serviço “*assays-by-design*” oferecido pela *Applied Biosystems*

A amplificação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), e a reação de amplificação foi realizada em duas etapas: 95°C por 10 minutos, seguida de 40 repetições de 92° C por quinze segundos e 60° C por um minuto.

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 12 µL contendo 6,25 µL de Mix universal para o sistema TaqMan (contendo tampão, referência passiva dye ROX, deoxinucleotídeos, uridina, uracil-N-glicosilase e DNA polimerase ampliTaq Gold – Applied Biosystems), 0,312 µL do conjunto *primer/sonda* (TaqMan SNP Genotyping Assay Mix) a 1X e 5,937 µL da amostra de DNA diluída em água.

A técnica de discriminação alélica consiste em utilizar um conjunto combinando de duas sondas marcadas com diferentes fluoróforos, uma complementar para cada um dos alelos (selvagem e mutante). A sonda se liga ao seu alelo específico e a fluorescência será lida para o alelo presente na amostra. Se os dois alelos estiverem presentes, são lidos os dois tipos de fluorescência (FIGURA 03).





**FIGURA 03:** Ilustração da detecção dos diferentes alelos utilizando uma sonda marcada com o fluoróforo FAM para a detecção do alelo selvagem (a) e uma sonda marcada com o fluoróforo VIC para a detecção do alelo mutante (b). Adaptado de Wilson *et al.* (2005).

## 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente as frequências genóticas foram determinadas por simples contagem e a comparação das frequências observadas foi realizada através do programa CLUMP 1.1 (Sham & Curtis, 1995). Para identificar as combinações alélicas presentes nas populações, suas respectivas frequências e para a determinação do equilíbrio de Hardy-Weimberg foi utilizado o programa ARLEQUIN 2.0 (Schnneider *et al.*, 2000). As análises de comparação do polimorfismo com os diversos parâmetros clínicos, níveis plasmáticos da citocina e intensidade da parasitemia foram feitas

utilizando o programa BIOESTAT 3.0 (Ayres *et al.*, 2004) e os testes de risco relativo (odds ratio) foram feitos utilizando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences* – Pacote estatístico para as ciências sociais) versão 8.0 para o sistema operacional Windows.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS

##### 3.1.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa

A tabela 02 apresenta as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo TNF-238 do gene TNF- $\alpha$ . Os dados obtidos demonstram que nenhum indivíduo apresentou o genótipo homozigoto mutante (AA) e que a frequência relativa dos heterozigotos foi aparentemente maior no grupo de pacientes (16%) do que no grupo tomado como controle (10%). A análise estatística dos resultados demonstrou que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ( $\chi^2=1,24$ ;  $p= 0,31$ ). As frequências alélicas observadas entre o grupo de pacientes (TNF-238\*A= 0,0802) e o grupo controle (TNF-238\*A= 0,0538) também se mostraram semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles ( $\chi^2= 0,006$ ;  $p= 0,22$ ).

**Tabela 01:** Frequências alélicas e genótípicas relativas ao polimorfismo TNF-238 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  entre pacientes e controles.

GENÓTIPO/ ALELO	PACIENTES (N=81)		CONTROLES (N=130)	
	N	FREQUÊNCIA	N	FREQUÊNCIA
GG	68	0,84	116	0,90
GA	13	0,16	14	0,10
AA	0		0	
TNF-238*G		0,9197		0,9461
TNF-238*A		0,0803		0,0539

A tabela 03 apresenta os dados relativos às frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo TNF-376 do gene TNF- $\alpha$ . Os dados obtidos demonstram que nenhum indivíduo apresentou o genótipo homozigoto mutante (AA) e que a frequência relativa dos heterozigotos foi maior no grupo controle (6%) do que no grupo de pacientes (5%). A análise estatística dos resultados demonstrou que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 0,13$ ;  $p = 0,75$ ). As frequências alélicas observadas entre o grupo de pacientes (TNF-376\*A= 0,0246) e o grupo controle (TNF-238\*A= 0,0307) também se mostraram semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles ( $\chi^2 = 0,0014$ ;  $p = 0,11$ ).

**Tabela 02:** Frequências alélicas e genotípicas relativas ao polimorfismo TNF-376 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  entre pacientes e controles.

GENÓTIPO/ ALELO	PACIENTES (N=81)		CONTROLES (N=130)	
	N	FREQUÊNCIA	N	FREQUÊNCIA
GG	77	0,95	122	0,94
GA	4	0,05	8	0,06
AA	0		0	
TNF-376*G		0,9753		0,9692
TNF-376*A		0,0247		0,0308

### 3.1.2. Interferon Gama

A tabela 04 apresenta os dados relativos às frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo IFN+874 do gene do IFN- $\gamma$ . Os dados obtidos demonstram que a frequência de indivíduos que apresentaram o genótipo homocigoto mutante (TT) foi maior no grupo controle (8%) do que no grupo de pacientes (7%) e que a frequência relativa dos heterocigotos foi maior no grupo de pacientes (37%) do que no grupo controle (36%). A análise estatística dos resultados demonstrou que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ( $\chi^2=0,019$ ;  $p=1,0$ ). As frequências alélicas observadas entre o grupo de pacientes (IFN+874\*T= 0,2592) e o grupo controle (IFN+874\*T=

0,2577) também se mostraram semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles ( $\chi^2=0,0$ ;  $p= 1,0$ ).

**Tabela 03:** Frequências alélicas e genóticas relativas ao polimorfismo IFN+874 no primeiro íntron do gene do IFN- $\gamma$  entre pacientes e controles.

GENÓTIPO/ ALELO	PACIENTES (N=81)		CONTROLES (N=130)	
	N	FREQUÊNCIA	N	FREQUÊNCIA
AA	45	0,56	73	0,56
AT	30	0,37	47	0,36
TT	06	0,07	10	0,08
IFN+874*A		0,7407		0,7423
IFN+874*T		0,2593		0,2577

### 3.2. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEIMBERG

Todos os sistemas genéticos investigados nesse estudo foram testados individualmente para o equilíbrio de Hardy-Weimberg nos grupos de pacientes e de indivíduos controle (Tabela 01). Foi observado que todos os sistemas investigados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weimberg ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 04:** Resultado do teste empregado para calcular o equilíbrio de Hardy-Weimberg.

Polimorfismo investigado	Pacientes		Controles	
	$\chi^2$	p valor	$\chi^2$	p valor
TNF-238	0,56	1,00	0,39	0,93
TNF-376	0,04	0,75	0,12	0,86
IFN+874	0,04	0,94	0,19	0,90

### 3.3. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

A proximidade entre os dois polimorfismos TNF-238 e TNF-376, ambos localizados na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , nos leva a esperar que eles estejam em desequilíbrio de ligação e que sejam herdados em conjunto, na forma de haplótipos. O mesmo não é esperado comparando-se esses polimorfismos do TNF- $\alpha$  com o polimorfismo IFN+874 do IFN- $\gamma$ , pois se encontram em cromossomos diferentes e o desequilíbrio ocorreria somente na presença de mistura interétnica recente e/ou de sub-estruturação populacional (Choudhry *et al.*, 2006).

Para testar essas hipóteses foi empregado o programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). Os resultados obtidos demonstram que não há desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo IFN+874 e os dois polimorfismos do TNF- $\alpha$ , TNF-238 ( $\chi^2 = 0,22$ ;  $p = 0,63$ ) e TNF-376 ( $\chi^2 = 0,05$ ;  $p = 0,93$ ) na amostra de pacientes. Entre os indivíduos controle também não foi observado desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo do IFN- $\gamma$  e os polimorfismos TNF-238 ( $\chi^2 = 0,26$ ;  $p = 0,6$ ) e TNF-376 ( $\chi^2 = 0,76$ ;  $p = 0,38$ ).

Foi observado um desequilíbrio de ligação significativo no grupo de pacientes entre os polimorfismos TNF-238 e TNF-376 ( $\chi^2 = 15,9$ ;  $p = 0,00007$ ). Porém isso não foi observado no grupo controle ( $\chi^2 = 0,02$ ;  $p = 0,87$ ), o que mostra que há um haplótipo mais representado, havendo a necessidade de estudos futuros que possam comprovar esse desequilíbrio de ligação. Talvez a doença esteja exercendo pressão seletiva nesses polimorfismos, ou talvez esse fato demonstre apenas um viés na amostragem devido o número pequeno de pacientes do estudo.

#### 3.4. TESTE DE RISCO RELATIVO (*ODDS RATIO*)

Para testar se a presença dos polimorfismos representaria maior risco relativo para o desenvolvimento da malária foi empregado o teste de regressão logística pelo programa SPSS, comparando indivíduos controle (sem malária) e os pacientes (com malária) e a presença dos alelos de risco. O resultado observado demonstra que a presença dos alelos mutantes IFN+874 (OR = 0,99), TNF-238 (OR = 0,94) ou TNF-376 (OR = 1,04) não representa risco para manifestações mais graves da doença ( $p = 0,53$ ).

Em seguida realizamos a análise utilizando a combinação alélica AA dos polimorfismos TNF-238 e TNF-376 respectivamente. Este haplótipo foi escolhido porque se encontra em desequilíbrio de ligação entre os pacientes, mas não entre os indivíduos tomados como controle. Esse haplótipo foi usado no teste de regressão logística contra as variáveis clínicas parasitemia, temperatura auxiliar, escores clínicos e níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$ , para avaliar se os portadores dessa combinação teriam risco aumentado para ter manifestações mais graves da malária.

O resultado do teste mostrou que, de acordo com o *odds ratio*, não existe risco relativo maior para os pacientes portadores do haplótipo AA, dos polimorfismos TNF-238 e TNF-376, em



relação a parasitemia (OR = 1,0002; p = 0,052), temperatura auxiliar (OR = 0,17; p = 0,13), escores clínicos (OR = 0,84; p = 0,12) ou níveis de TNF- $\alpha$  (OR = 0,98; p = 0,67).

Para avaliar melhor os nossos resultados, realizamos o teste de *odds ratio* com a parasitemia e os níveis de TNF- $\alpha$  em forma dicotômica. Para o TNF- $\alpha$  os valores acima de 3.000 pg/mL recebeu a graduação um (1) e valores abaixo de 3.000 pg/mL receberam a graduação zero (0); Para a parasitemia, qualquer paciente com parasitemia acima de 30.000 recebeu a graduação um (1), parasitemia alta, e os pacientes com graduação abaixo de 30.000 receberam a graduação zero (0), parasitemia não-alta, sendo que esses parâmetros foram escolhidos aleatoriamente na tentativa de categorizar os dados e dividir os pacientes para tentar obter um melhor resultado do teste de regressão múltipla. O resultado foi relevante para a intensidade da parasitemia, pois o resultado mostrou que os portadores do haplótipo AA tinham um risco 7,5 vezes maior (OR = 7,54) de ter uma parasitemia alta, entretanto esse resultado também não se mostrou significativo (p = 0,09).

### 3.5. RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DA PARASITEMIA, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA, NÍVEIS PLASMÁTICOS DO TNF- $\alpha$ E OS POLIMORFISMOS GENÉTICOS.

A tabela 05 apresenta as médias, desvio e erro padrão dos dados clínicos (escores de sintomas e sinais, temperatura auxiliar), da intensidade da parasitemia e dos níveis plasmáticos da citocina TNF- $\alpha$  na população de pacientes infectados pelo *P. vivax*.

Os dados foram obtidos na investigação de Da Silva (2204) em nosso laboratório e utilizando a mesma população de pacientes, e foram feitas algumas comparações entre esses parâmetros, e também entre eles e os polimorfismos investigados.

**Tabela 05:** Valores de média, desvio e erro padrão da parasitemia, dados clínicos e níveis séricos de TNF- $\alpha$ .

	<b>Parasitemia</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Clínica</b>	<b>Nível do TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>Média</b>	9174,69	37,55	20,67	51,23
<b>Desvio</b>	9170,67	1,33	8,08	92,75
<b>Erro Padrão</b>	1006,61	0,15	0,89	10,18

### 3.5.1. Comparação entre manifestações clínicas e parasitemia

A comparação entre os escores clínicos (sinais e sintomas) e os níveis de parasitemia não mostrou diferença significativa, levando a conclusão de que a quantidade de parasitos não influenciou diretamente nas manifestações clínicas da doença.

### 3.5.2. Comparação entre parasitemia e níveis de TNF- $\alpha$

De acordo com o coeficiente de Spearman ( $r_s$ ) houve uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e a intensidade da parasitemia ( $r_s = 0,33$ ;  $p < 0,01$ ), de forma que níveis altos de parasitemia foram acompanhados de níveis elevados também da citocina.

### **3.5.3. Comparação entre os níveis de TNF- $\alpha$ e a temperatura**

Nos pacientes onde os níveis plasmáticos de citocina eram elevados, a temperatura auxiliar também estava aumentada, indicando uma correlação positiva entre esse parâmetros ( $r_s = 0,3$ ;  $p < 0,01$ ), de forma que a febre acompanhou os níveis de TNF- $\alpha$ .

### **3.5.4. Comparação entre os escores clínicos e os níveis de TNF- $\alpha$**

A comparação entre esses parâmetros demonstrou que os escores clínicos aumentavam a medida que os níveis da citocina também o faziam, de forma que conforme os níveis de TNF- $\alpha$  eram elevados os sinais e sintomas também eram mais evidentes.

### **3.5.5. Comparação entre os polimorfismos, parasitemia, dados clínicos e os níveis de TNF- $\alpha$ .**

#### **3.5.5.1. Polimorfismos do TNF- $\alpha$**

Em comparação com a concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , para o polimorfismo TNF-238 os resultados mostraram que os pacientes heterozigotos apresentavam maior concentração média da citocina (53,02 pg/ mL) do que os homozigotos normais (50,89 pg/ mL), enquanto que para o polimorfismo TNF-376 os índices foram maiores nos pacientes homozigotos normais (53,05 pg/ mL) do que nos heterozigotos (16,16 pg/ mL). As análises estatísticas demonstraram que a diferença entre homozigotos e heterozigotos em relação ao polimorfismo TNF-376 não é estatisticamente significativa ( $p = 0,44$ ), assim como a diferença para o polimorfismo TNF-238 ( $p = 0,94$ ).

Em relação à intensidade da parasitemia, os resultados demonstraram que a média dos valores de parasitemia foram maiores nos indivíduos heterozigotos (10.142,86/  $\mu$ L de sangue e 14.250  $\mu$ L de sangue) do que nos indivíduos homozigotos normais (9.288,97 $\mu$ L de sangue e 8.911,04  $\mu$ L de sangue) para os polimorfismos TNF-238 e TNF-376 respectivamente. Entretanto essas diferenças não se mostraram estatisticamente significantes ( $p = 0,79$ ;  $p = 0,42$ ).

Em relação à somatória dos escores clínicos, a média dos valores foi maior nos indivíduos homozigotos normais (4,23 e 4,25) do que nos heterozigotos (3,85 e 2,75) para os polimorfismos TNF-238 e TNF-376 respectivamente. As análises estatísticas mostraram a diferença foi estatisticamente significativa para o polimorfismo TNF-376 ( $p = 0,0017$ ) e para o polimorfismo TNF-238 a diferença não foi significativa ( $p = 0,38$ ).

Esses resultados demonstram que aparentemente o polimorfismo TNF-376 parece estar relacionado com menores valores na média dos escores clínicos.

A presença dos diferentes alelos não está relacionada com a os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e com a intensidade da parasitemia para os dois polimorfismos e, especificamente para o polimorfismo TNF-238, a presença do alelo mutante não mostrou relação com as manifestações clínicas da doença.

### 3.5.5.2. Polimorfismo do IFN- $\gamma$

Em relação aos escores clínicos foi observado que os pacientes homocigotos para a mutação (TT) tiveram, em média, menor valor na somatória dos escores de sinais e sintomas do que os homocigotos normais ou heterocigotos, entretanto estas diferenças não se mostraram significativas após as análises estatísticas.

Através do teste *t* de student testamos a relação dos polimorfismos com a intensidade da parasitemia, e foi observada uma diferença significativa quando comparados os genótipos AA e TT, com os indivíduos homocigotos mutantes apresentando níveis significativamente menores de parasitemia ( $p = 0,04$ ). As diferenças em relação aos demais genótipos não foram significantes.

Esses resultados demonstram que os diferentes tipos alélicos do IFN- $\gamma$  não participam diretamente da resposta clínica do paciente frente ao parasito, mas que a presença da mutação homocigótica TT interferiu de forma significativa na intensidade da parasitemia, induzindo a sua diminuição nos pacientes portadores desse genótipo.

## 3.6. ANÁLISE DAS COMBINAÇÕES ALÉLICAS

### 3.6.1. Combinações alélicas entre os três sistemas genéticos

Nesse trabalho foram investigados três sistemas genéticos que, quando analisados em conjunto apresentaram oito combinações diferentes (para os polimorfismos A+874T do IFN- $\gamma$ , G-238A e G-376A do TNF- $\alpha$  respectivamente) nos grupos de pacientes e controles, conforme consta na tabela 04.

**Tabela 06:** Frequência das combinações alélicas encontradas no grupo de pacientes e controles

COMBINAÇÕES ALÉLICAS		GRUPOS	
		Pacientes (%)	Controles (%)
1	AAA	1,95	0,30
2	AAG	4,88	4,05
3	AGG	67,23	68,44
4	TAA	0,54	—
5	TAG	0,67	1,05
6	TGG	24,73	23,39
7	AGA	—	1,44
8	TGA	—	1,33

A frequência da combinação um (AAA) foi maior no grupo de pacientes (1,95%) do que no grupo de indivíduos controle (0,3%) e, entre todas as combinações, a mais frequente nos dois grupos foi a três (AGG) com frequência de 67,23% e 68,44% respectivamente.

A combinação seis também teve uma frequência destacada nos grupos de pacientes e de indivíduos considerados controles (24,73% e 23,39% respectivamente) e as combinações quatro e cinco, entre os pacientes, e um, entre o grupo controle, tiveram as menores frequências com menos de 1%.

A combinação quatro (TAA) estava presente apenas no grupo de pacientes e as combinações sete e oito (AGA e TGA respectivamente) foram encontradas apenas no grupo de indivíduos controle.

As análises estatísticas demonstram que não houve diferença significativa quando comparadas todas as combinações entre os dois grupos distintos ( $\chi^2 = 9,18$ ;  $p = 0,22$ ) e que quando a comparação envolveu apenas as duas combinações de maior frequência (três e seis) também não foi observada nenhuma diferença significativa ( $\chi^2 = 0,097$ ;  $p = 0,71$ ). Ao compararmos as combinações AGG (três alelos normais) e TAA (três alelos mutantes), as diferenças observadas também não foram significativas ( $\chi^2 = 1,43$ ;  $p = 0,384$ ).

### 3.6.2. Combinações alélicas entre os dois sistemas do TNF- $\alpha$

Considerando apenas os dois polimorfismos do gene do TNF- $\alpha$  observamos a ocorrência de quatro combinações diferentes (para os polimorfismos TNF-238 e TNF-376 respectivamente) entre os grupos de pacientes e controles, conforme dados da tabela 05.

**Tabela 07:** Combinações alélicas entre os dois polimorfismos do gene do TNF- $\alpha$ .

COMBINAÇÕES ALÉLICAS		GRUPOS	
		Pacientes (%)	Controles (%)
1	AA	2,46	0,22
2	AG	5,55	5,16
3	GA	—	2,85
4	GG	91,97	91,76

A combinação um (AA) foi mais frequente no grupo de pacientes (2,46%) do que no grupo tomado como controle (0,22%). A combinação quatro (GG) foi a mais frequente nos dois grupos

investigados, mas também se apresentou mais elevada no grupo de pacientes do que no grupo controle (91,97% e 91,76% respectivamente).

As análises estatísticas demonstraram que as diferenças encontradas entre os grupos foram estatisticamente significativas ao compararmos todas as combinações, dos polimorfismos do gene do TNF- $\alpha$ , entre os dois grupos ( $\chi^2 = 9,31$ ;  $p = 0,02$ ). Quando comparamos apenas as combinações GG (dois alelos normais) e AA (dois alelos mutantes) as diferenças observadas entre os grupos não foram estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 4,57$ ;  $p = 0,07$ ). Ao compararmos apenas as duas combinações de maior frequência (dois e quatro) o resultado também não demonstrou significância ( $\chi^2 = 0,025$ ;  $p = 0,835$ ).



#### 4. DISCUSSÃO

A malária é ainda hoje uma das mais importantes doenças do mundo no que se refere a mortalidade e a morbidade dos pacientes. A maioria dos casos da doença no Brasil se concentra na região da Amazônia Legal. A patologia provocada pelo *P. vivax* é comumente branda e de curso febril, porém ultimamente casos graves da doença foram relatados, com acometimentos pulmonares, renais e até mesmo a ocorrência incomum casos de malária cerebral e casos fatais de malária.

No presente estudo nós procuramos investigar a presença de três polimorfismos genéticos relativos a duas importantes citocinas na resposta imune, o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  e identificar uma possível associação entre esses polimorfismos e a gravidade das manifestações clínicas da malária causada por *P. vivax*.

Em relação aos dois polimorfismos relacionados com o gene do TNF- $\alpha$  (TNF-238 e TNF-376) as frequências dos alelos selvagem e mutante foram semelhantes nos grupos de pacientes e controles, não permitindo associar os alelos TNF-238\*A e TNF-376\*A com a ocorrência da doença.

Os estudos que buscam relacionar a resistência ou a ocorrência de uma determinada doença com polimorfismos de genes envolvidos na resposta imune estão se tornando comuns e atraindo interesse com o objetivo de tentar esclarecer até que ponto as alterações genéticas podem influenciar nas manifestações ou mesmo na evolução clínica de uma doença.

Porém esses estudos permanecem inconsistentes, principalmente no que diz respeito as citocinas, em relação a muitas doenças, entre elas a malária, pois alguns dos estudos feitos não conseguem associar a doença com as mutações e nem com maiores ou menores níveis sanguíneos de uma determinada citocina. (Mihailova *et al.*, 2005)

Santos *et al.* (2002) investigaram a relação dos polimorfismos do TNF- $\alpha$  com a hanseníase e encontraram uma forte associação da doença com o alelo TNF-308\*A, mas não com o alelo TNF-238\*A. Resultado semelhante foi obtido por Wu *et al.* (2002) estudando um grupo de pacientes com carcinoma gástrico associado com o vírus de Epstein-Barr (EPV). Moraes (2005) também investigou o polimorfismo G-308A em relação à hanseníase e encontrou uma frequência maior do alelo TNF-308\*A entre os pacientes com as formas clínicas menos graves, mostrando que o alelo pode estar relacionado com uma maior proteção contra as formas clínicas graves da doença.

Mombo *et al.* (2003) indicaram que o alelo TNF-238\*A parece estar associado com proteção contra formas clínicas da malária, citando também a associação do alelo com a anemia grave em estudos realizados em Gâmbia, e dessa forma concluíram que a presença do alelo pode favorecer uma infecção assintomática ou sub-clínica e pode levar gradualmente a manifestação da anemia grave.

Segundo McGuire *et al.* (1999) o alelo TNF-238\*A está relacionado com a anemia grave, mas não com a malária cerebral, mesma conclusão de Gourley *et al.* (2002). May *et al.* (2000) também expõem que o alelo está associado com a anemia grave, porém defendem que o TNF-238\*A pode conferir proteção contra a malária cerebral.

Segundo Hill *et al.* (1996), dois estudos foram realizados na África ligando o alelo TNF-238\*A e a anemia grave em pacientes com malária, e que a gravidade da anemia pode estar relacionada com uma maior produção constitutiva de TNF- $\alpha$ .

O alelo TNF-376\*A já foi associado com susceptibilidade à malária grave em crianças africanas (Kwiatkowski, 2000) e com o risco de desenvolver malária cerebral em indivíduos do Quênia e Gâmbia (May *et al.* 2000; Hajeer & Huychinson, 2001). Gourley *et al.* (2002) também citam que o alelo TNF-376\*A, juntamente com o TNF-238\*A, está associado com a malária grave, particularmente a malária cerebral.

Knight *et al.* (1999) relatam que o polimorfismo TNF-376 atua como um fator de risco independente para a malária cerebral e está associado com uma maior susceptibilidade à essa complicação. Esse mesmo estudo cita que o polimorfismo parece induzir um aumento na produção da citocina.

Da Silva (2004) investigou a presença de outro polimorfismo do TNF- $\alpha$  no mesmo grupo de pacientes desse estudo e também não encontrou associação entre o alelo mutante, TNF-308\*A e a malária. Entretanto, como já foi citado anteriormente, outros autores já associaram a doença, especialmente a anemia grave ou a malária cerebral, com esses três alelos mutantes do gene do TNF- $\alpha$ . Esse estudo fez importantes conclusões sobre a influência do TNF- $\alpha$  na malária, correlacionando a citocina com os níveis de parasitemia e com as manifestações clínicas da doença, de forma que pacientes que apresentavam sintomas mais evidentes e que tinham maiores níveis de parasitemia também apresentaram os maiores níveis plasmáticos da citocina.

Foi observado desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do TNF- $\alpha$ , TNF-238 e TNF-376, apenas no grupo de pacientes e não no grupo de indivíduos do grupo controle, e por isso esses dois sistemas foram utilizados em um teste de regressão para medir se a presença do haplótipo AA (os dois alelos mutantes) poderia significar maior risco de desenvolver malária com manifestações clínicas mais graves, entretanto os resultados não foram significantes. Os alelos isoladamente demonstraram um papel mais relacionado a proteção contra a doença, entretanto como os valores também não foram significativos não permitem nenhuma conclusão substancial.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o alelo TNF-376\*A parece estar relacionado com uma menor intensidade das manifestações clínicas da malária, mas os níveis da parasitemia e a concentração plasmática do TNF- $\alpha$  não sofrem qualquer alteração na presença dos alelos TNF-376\*A e TNF-238\*A. A presença desse último alelo também não influencia a

manifestação da doença. Entretanto, apesar de importantes, esses resultados precisam ser confirmados por estudos que utilizem uma amostragem maior, visto a pequena quantidade de indivíduos heterozigotos e a ausência de indivíduos homozigotos para a mutação que observamos nessa investigação.

Mas todas essas observações, em conjunto, demonstram a importância do TNF- $\alpha$  e que sua influência sobre a ocorrência ou a gravidade de uma doença pode estar relacionada com a ocorrência de um ou mais polimorfismos além dos estudados aqui, ou mesmo de uma associação entre uma ou mais dessas mutações em conjunto.

Situação semelhante ocorre em relação ao polimorfismo do gene do IFN- $\gamma$ . A frequência dos alelos IFN+874\*A e IFN+874\*T foram semelhantes nos grupos de pacientes e de controles, e assim não foi possível associar a ocorrência do alelo mutante e a ocorrência ou gravidade das manifestações clínicas da malária.

Entretanto, foi possível fazer uma associação positiva entre a mutação homozigótica TT e uma diminuição significativa da parasitemia, comparado com indivíduos portadores do genótipo homozigoto selvagem (AA).

Como essa mutação parece estar relacionada com uma maior produção de IFN- $\gamma$  e o alelo mutante IFN+874\*T está fortemente relacionado com o alelo de 12 repetições do microsatélite (região de repetição CA) que também está ligado a uma maior produção da citocina, esses dados podem ajudar a comprovar a atuação do IFN- $\gamma$  na eliminação do parasito do organismo, influenciando na diminuição da intensidade da parasitemia.

Porém ainda não existem estudos consistentes que comprovem a ligação do polimorfismo com uma maior expressão do gene do IFN- $\gamma$  e apesar de não haverem estudos investigando a associação dessa mutação com a malária, outros estudos relatam uma associação do

polimorfismo com outras doenças, como a tuberculose, e assim ainda não podemos ter uma idéia precisa sobre o efeito do polimorfismo sobre a função da citocina (Lio *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2005; Tsiavou *et al.*, 2005).

Assim, apesar do presente estudo não demonstrar associação entre os polimorfismos estudados e a malária, os dados aqui encontrados podem contribuir como mais uma peça para montar um complexo quebra-cabeça, auxiliando na tentativa de elucidar os mecanismos da resposta imune contra a doença e, em conjunto com futuros estudos, ajudar a esclarecer como as mutações genéticas dessas citocinas podem influenciar a evolução clínica da malária assim como de outras doenças infecciosas.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que não foi encontrada na amostra investigada nenhuma associação entre os polimorfismos estudados e a malária.

A investigação das associações com o polimorfismo IFN+874 mostrou que indivíduos homozigóticos para a mutação tiveram menores densidades de parasitemia, o que pode ajudar a comprovar o importante papel dessa citocina na resposta imune contra o *Plasmodium* e na proteção contra formas clínicas mais graves da malária.

O polimorfismo TNF-238 não influenciou nos níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$ , nas manifestações clínicas e nem na intensidade da parasitemia nos pacientes com malária, enquanto que os resultados demonstraram que o polimorfismo TNF-376 não influencia na parasitemia e nem nos níveis plasmáticos da citocina, mas parece estar relacionado com menor intensidade dos sintomas da doença.

Foi observado um significativo desequilíbrio de ligação entre os dois sistemas do TNF- $\alpha$ , mas a presença da combinação alélica AA (TNF-238 e TNF-376) não influenciou no risco relativo para desenvolver formas clínicas mais graves da malária.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, M.; LACERDA, M.; ARCANJO, A. R.; BRAGA, W.; ALECRIM, W.; ALECRIM, M. G. Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária vivax em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38 (Supl. I): 303, 2005.
- AMÉRICO, A. P. L.; MARTINS, A. G.; GUZZO JUNIOR, P. S. A experiência do Pará com os programas de controle da incidência da malária. Monografia (Especialização em Saúde Pública). **Universidade do Estado do Pará**. 2005. 57p.
- ANGULO, I.; FRESNO, M.; Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, 9 (6): 1145-1152, 2002.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin. Exp. Immunol.** 133: 145-152, 2003.
- AYRES, M; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; Dos SANTOS, A. S. BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade civil Mamirauá/CNPq, 2004.
- BAPTISTA, J. L.; VANHAM, M. W.; WÉRY, M.; MARCK, E. V. Cytokine levels during mild and cerebral falciparum malaria in children living in a mesoendemic área. **Tropical medicine and international health**, 2: 673-679, 1997.
- BASTÜRK, B.; YAVASÇAUGLU, I.; VURUSKAN, H.; GÖRAL, G.; OKTAY, B.; ORAL, M H. B. Cytokine gene polymorphisms at potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. **Cytokine**. 30: 41-45, 2005.

- BÉRTOLI, M.; MOITINHO, M. L. R. Malária no estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**. **34 (1)**: 43-47, 2001.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Vol II. Brasília, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de prevenção e controle de Malária**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2003.
- BRAVO, M. J.; COLMENERO, M. DE D.; ALONSO, A.; CABALLERO, A. Polymorphisms of the interferon gamma and interleukin 10 genes in human brucellosis. **European journal of immunogenetics**, **30**: 433-435, 2003.
- BREAM, J. H.; CARRINGTON, M.; O'TOOLE, S.; DEAN, M.; GERRARD, B.; SHIN, H. D.; KOSAC, D.; MODI, W.; YOUNG, H. A.; SMITH, M. W. Polymorphisms of the human IFNG gene noncoding regions. **Immunogenetics**. **51**: 50-58, 2000.
- BROWN, G. V.; BECK, H-P.; MOLYNEUX, M.; MARSH, K. Molecular approaches to epidemiology and clinical aspects of malaria. **Parasitology Today**. **16**: 448-451, 2000.
- BURT, R. A. Genetics of the host response to malaria. **International Journal for parasitology**. **29**: 973-979, 1999.
- CABANTOUS, S.; POUDIOUGOU, B.; TRAORE, A.; KEITA, M.; CISSE, M. B.; DOUMBO, O.; DESSEIN, A. J.; MARQUET, S. Evidence that interferon- $\gamma$  plays a protective role during cerebral malaria. **The journal of infectious diseases** **192**: 854-860, 2005.
- CHOUDHRY, S.; COLYLE, N. E.; TANG, H.; SALARI, K.; LIND, D.; CLARK, S. L.; TSAI, H-J.; NAQVI, M.; PHONG, A.; UNG, N.; MATAALLANA, H.; AVILA, P. C.; CASAL, J.; TORRES, A.; NAZARIO, S.; CASTRO, R.; BATTLE, N. C.; PEREZ-STABLE, E. J.; KWOK, P-Y.; SHEPPARD, D.; SHRIVER, M. D.; RODRIGUEZ-CINTRON, W.; RISCH, N.; ZIV, E.;



BURCHARD, E. G. Population stratification confounds genetic association studies among latinos. **Human genetics**, **118**: 652-664, 2006.

CRAIG, A.; HASTINGS, I.; PAIN, A.; ROBERTS, D. J. Genetics and malaria – more questions than answers. **TRENDS in parasitology**. **17(2)**: 55-56, 2001.

Da SILVA, I. B. A. Malária Vivax: Manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas com o fator de necrose tumoral alfa. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários). **Universidade Federal do Pará**. 2004. 155 p.

DAI, C-Y.; CHUANG, W-L.; CHANG, W-Y.; CHEN, S-C.; LEE, L-P.; HSIEH, M-Y.; HOU, N-J.; LIN, Z-Y.; HSIEH, M-Y.; WANG, L-Y.; YU, M-L. Polymorphisms in the interferon- $\gamma$  gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-dose interferon- $\alpha$  and ribavirin. **Antiviral research**, **67**: 93-97, 2005.

DAY, N. P. J.; HIEN, T. T.; SCHOLLAARDT, T.; LOC, P. P.; CHUONG, L. V.; CHAU, T. T. H.; MAI, T. H.; PHU, N. H.; SINH, D. X.; WHITE, N. J.; HO, M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. **The journal of infectious diseases**, **180**: 1288-1297, 1999.

DE OLIVEIRA, M. M.; DA SILVA, J. C. S.; COSTA, J. F.; AMIM, L. H.; LOREDO, C. C. S.; MELO, H.; QUEIROZ, L. F.; MELLO, F. C. Q.; LAPA E SILVA, J. R.; KRITSKI, A. F.; SANTOS, A. R. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the TNF- $\alpha$  (-238/ -308) gene among TB and non TB patients: susceptibility markers of TB occurrence? **Jornal brasileiro de pneumologia**, **30 (4)**: 461-467, 2004.

DELORON, P.; CHOUGNET, C.; LEPERS, J. P.; TALLET, S.; COULANGES, P. Protective value of elevated levels of gamma interferon in serum against exoerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Clinical Microbiology**. **29(9)**: 1757-1760, 1991.

- DOOLAN, D. L.; HOFFMAN, S. L. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. **The journal of immunology**, **165**: 1453-1462, 2000.
- FERREIRA, M. S. Malária: conceito, etiologia e ciclo evolutivo. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2ª ed. Vol. 2. São Paulo: Atheneu, 2002. p.1280 a 1284.
- GENTILE, D. A.; DOYLE, W. J.; ZEEVI, A.; HOWE-ADAMS, J.; KAPADIA, S.; TRECKI, J.; SKONER, D. P. Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with respiratory syncytial virus infection. **Human immunology**. **64**: 338-344, 2003.
- GIMENEZ, F.; LAGERIE, S. B. DE.; FERNANDEZ, C.; PINO, P.; MAZIER, D. Tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of cerebral malaria. **Cellular and molecular life sciences**, **60**: 1623-1635, 2003.
- GONZÁLEZ, S.; RODRIGO, L.; MARTÍNEZ-BORRA, LOPÉZ-VÁZQUEZ, A.; FUENTES, D.; NIÑO, P.; CADAHÍA, V.; SARO, C.; DIEGUEZ, A.; LÓPEZ-LARREA, C. TNF- $\alpha$ -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF $\alpha$  production and inflammatory activity in crohn's patients with fistulizing disease. **The American Journal of Gastroenterology**. **98(5)**: 1101-1106, 2003.
- GOURLEY, I. S.; KURTIS, J. D.; KAMOUN, M.; AMON, J. J.; DUFFY, P. E. Profound bias in the interferon- $\gamma$  and interleukin-6 allele frequencies in western Kenya, where severe malarial anemia is common in children. **The journal of infectious diseases**, **186**: 1007-1012, 2002.
- HAJJER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF $\alpha$  production and disease. **Human Immunology**. **62**: 1191-1199, 2001.
- HALMA, M. A. T.; WHEELHOUSE, N. M.; BARBER, M. D.; POWELL, J. J.; FEARON, K. C. H.; ROSS, J. A. Interferon- $\gamma$  polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer. **Human Immunology**. **65**: 1405-1408, 2004.

- HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. **The Lancet Infectious Disease**. **4**: 327-336, 2004.
- HEDDINI, A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. **International Journal of Parasitology**. **32**: 1587-1598, 2002.
- HENAO, M. I.; MONTES, C.; PARÍS, S. C.; GARCÍA, L. F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, **86**: 11-19, 2006.
- HILL, A. V. S.; RUWENDE, C.; McGUIRE, W.; BELLAMY, R.; COLEMAN, E.; ALI, S.; LOKE, H.; CORRAH, T.; SNOW, R.; MARSH, K.; GREENWOOD, B.; McADAM, K. J. W. P.; WHITTLE, H. C.; KWIATKOWSKI, D. Association of the TNF-238 promoter polymorphism with susceptibility to tuberculosis and malaria in Africa. **Human Immunology**. **47(1-2)**: 118, 1996.
- HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **The international journal of biochemistry & cell biology**, **37**: 700-706, 2005.
- KIRUNPETCHARAT, C.; FINKELMAN, F.; CLARK, I. A.; GOOD, M. F. Malaria parasite-specific th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. **Parasite immunology**, **21**: 319-329, 1999.
- HUNT, N. H.; GRAU, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **TRENDS in immunology**. **24(9)**: 491-499, 2003.
- JANG, W. H.; YANG, Y-I.; YEA, S. S.; LEE, Y. L.; CHUN, J. H.; KIM, H-I.; KIM, M. S.; PAIK, K-H. The -238 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. **Cancer Letters**. **166**: 41-46, 2001.

- JOHNSON, V. J.; YUCESSOY, B.; LUSTER, M. I. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. **Cytokine**, **27**: 135-141, 2004.
- KARUNAWEEERA, N. D; WIJESEKERA, S. K.; WANASEKERA, D.; MENDIS, K. M.; CARTER, R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **TRENDS in parasitology**, **19 (4)**: 188-193, 2003.
- KELSO, A. Cytokines: Principles and prospects. **Immunology and Cell Biology**, **76**: 300-317, 1998.
- KNIGHT, J. C.; UDALOVA, I.; HILL, A. V. S.; GREENWOOD, B. M.; PESHU, N.; MARSH, K.; KWIATKOWSKI, D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. **Nature genetics**, **22**: 145-150, 1999.
- KWIATKOWSKI, D. Genetic susceptibility to malaria getting complex. **Current Opinion in Genetics & Development**. **10**: 320-324, 2000.
- LAWN, S. D.; KRISHNA, S.; JARVIS, J. N.; JOET, T.; MACALLAN, D. C. Case reports: pernicious complications of benign tertian malaria. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, **97**: 551-553, 2003.
- LIO, D.; MARINO, V.; SERAUTO, A.; GIOIA, V.; SCOLA, L.; CRIVELLO, A.; FORTE, G. I.; COLONNA-ROMANO, G.; CANDORE, G.; CARUSO, C. Genotype frequencies of the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- $\gamma$  gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. **European journal of immunogenetics**, **29**: 371-374, 2002.
- LUTY, A. J. F.; LELL, B.; SCHMIDT-OTT, R.; LEHMAN, L. G.; LUCKNER, D.; GREVE, B.; MATOUSEK, P.; HERBICH, K.; SCHMID, D.; MIGOT-NABIAS, F.; DELORON, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; KREMSNER, P. G. Interferon- $\gamma$  responses are associated with resistance

to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young african children. **The journal of infectious diseases**, **179**: 980-988, 1999.

MACKINTOSH, C. L.; BEESON, J. G.; MARSH, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. **TRENDS in Parasitology**. **20 (12)**: 597-603, 2004.

MAGUIRE, J. D.; SUMAWINATA, I. W.; MASBAR, S.; LAKSANA, B.; PRODJODIPURO, P.; SUSANTI, I.; SISMAI, P.; MAHMUD, N.; BANGS, M. J.; BAIRD, J. K. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in south Sumatra, Indonésia. **Lancet**. **360**: 58-60, 2002.

MALAGUARNERA, L.; MUSUMECI, S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **THE LANCET infectious disease**. **2**: 472-478, 2002.

MARSH, K.; SNOW, R. W. Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, **352**: 1385-1394, 1997.

MARTÍNEZ, A.; RUBIO, A.; URCELAY, E.; FERNADEZ-ARQUERO, M.; HERAS, V. DE LAS.; ARROYO, R.; VILLOSLADA, P.; MONTALBÁN, X.; CONCHA, E. G. DE LA. TNF-376 marks susceptibility to MS in the spanish population, a replication study. **Neurology**, **62**: 809-810, 2004.

MAY, J.; LELL, B.; LUTY, A. J. F.; MEYER, C. G.; KREMSNER, P. G. Plasma interleukin-10: Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  ratio is associated with tnf promoter variants and predicts malarial complications. **The journal of infectious diseases**, **182**: 1570-1573, 2000.

MAZIER, D.; NITCHEU, J.; IDRISSE-BOUBOU, M. Cerebral malaria and immunogenetics. **Parasite Immunology**. **22**: 613-623, 2000.

McGUIRE, W.; KNIGHT, J. C.; HILL, A. V. S.; ALLSOPP, E. M. C.; GREENWOOD, B. M.; KWIATKOWSKI, D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. **The journal of infectious diseases**, **179**: 287-290, 1999.

- McLEOD, R.; BUSCHMAN, E.; ARBUCKLE, D.; SKAMENE, E. Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. **Current Opinion in Immunology**. **7**: 539-552, 1995.
- De MELO, L.; SANTANA, R. C.; GASPAR, G. G.; DA FONSECA, B. A. L. Estudo epidemiológico dos casos de malária atendidos no HC-USP Ribeirão Preto de 1998 a 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38 (Supl. I): 365, 2005.
- MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **American journal of tropical medicine and hygiene**, **64 (1-2)S**: 97-106, 2001.
- MIHAILOVA, S.; IVANOVA, M.; MIHAYLOVA, A.; QUIN, L.; MOKOVA, O.; NAUMOVA, E. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. **Journal of neuroimmunology**, **168**: 138-143, 2005.
- MODIANO, D.; LUONI, G.; SIRIMA, B S.; LANFRANCOTTI, A.; PETRARCA, V.; CRUCIANI, F.; SIMPORÉ, J.; CIMINELLI, M.; FOGLIETTA, E.; GRISANTI, P.; BIANCO, I.; MODIANO, G.; COLUZZI, M. The lower susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria or Fulani of Burkina faso (West África) is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. **95**: 149-152, 2001.
- MOMBO, L-E.; NTOUMI, F.; BISSEYE, C.; OSSARI, S.; LU, C. H.; NAGEL, R. L.; KRISHNAMOORTHY, R. Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in gabonese schoolchildren. **American journal or tropical medicine and hygiene**, **68 (2)**: 186-190, 2003.
- MORAES, M. F. **Estudo de seis polimorfismos em genes relacionados as sistema immune em pacientes com hanseníase no Estado do Pará**. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2005. 76p.

MORROT, A.; ZAVALA, F. Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells as seen in immunity to malaria.

**Immunological reviews**, **201**: 291-303, 2004.

NACHER, M.; SINGHASIVANON, P.; GAY, F.; SILACHAMROON, U.; LOOAREESUWAN, S.

Case-control studies on host factors in severe malaria. **TRENDS in immunology**. **17(6)**: 253-254, 2001.

NUSSEMBLAT, V.; MUKASA, G.; METZGER, A.; NDEEZI, G.; GARRET, E.; SEMBA, R. D.

Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, **8 (6)**: 1164-1170, 2001.

OPDAL, S. H.; OPSTAD, A.; VEGE, A.; ROGNUM, T. O. IL-10 gene polymorphisms are associated

with infectious cause of sudden infant death. **Human Immunology**. **64**: 1183-1189, 2003.

PLEBANSKI, M.; HILL, A. V. S. The immunology of malaria infection. **Current opinion in**

**immunology**, **12**: 437-441, 2000.

POUNIOTIS, D. S.; PROUDFOOT, O.; MINIGO, G.; HANLEY, J. L.; PLEBANSKI, M. Malaria

parasite interactions with the human host. **J. Postgrad. Med.**, **50 (1)**: 30-34, 2004.

PRAVICA, V.; PERREY, C.; STEVENS, A.; LEE, J-H.; HUTCHINSON, I. V. A single nucleotide

polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production. **Human Immunology**. **61**: 863-866, 2000.

RICHARDS, A. L. Tumour necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria.

**International Journal of Parasitology**. **27(10)**: 1251-1263, 1997.

RILEY, E. M.; WAHL, S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria.

**Parasite immunology**, **28**: 35-49, 2006.

- RINGWALD, P.; PEYRON, F.; VUILLEZ, J. P.; TOUZE, J. E.; LE BRAS, J.; DELORON, P. Levels of cytokines in plasma during *Plasmodium falciparum* malaria attacks. **Journal of clinical microbiology**, **29 (9)**: 2076-2078, 1991.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. M.; CRUZ-ROBLES, D.; HERNÁNDEZ-PACHECO, G.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; MURGUÍA, L. E.; GRANADOS, J.; REYES, P. A.; VARGAS-ALARCÓN, G. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. **Immunology Letters**. **4093**: 1-6, 2004.
- ROSSOUW, M.; NEL, H. J.; COOKE, G. S.; VAN HELDEN, P. D.; HOAL, E. G. Association between tuberculosis and a polymorphic NFkB binding site in the interferon  $\gamma$  gene. **The lancet**. **361**: 1871, 2003.
- SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, **415**: 680-685, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York , Cold Spring Harbor press, 1989. 1626p.
- SANTOS, A. R.; SUFFYS, P. N.; VANDERBORGHT, P. R.; MORAES, M. O.; VIEIRA, L. M. M.; CABELLO, P. H.; BAKKER, A. M.; MATOS, A. J.; HUIZINGA, T. W. J.; OTTENHOFF, T. H. M.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphism in leprosy. **The journal of infectious Diseases**, **186**: 1687-1691, 2002.
- SCHNEIDER, S., KUEFFER, J.M., ROESSLIE, D., EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.0: A software for population genetic data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, 2000.
- SCOLA, L.; CRIVELLO, A.; MARINO, V.; GIOIA, V.; SERAUTO, A.; CANDORE, G.; COLONNA-ROMANO, G.; CARUSO, C.; LIO, D. IL-10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms in a sample



of sicilian patientes affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy.

**Mechanisms of Ageing and development. 124:** 569-572, 2003.

SCOPEL, K. K. G.; FONTES, C. J. F.; NUNES, A. C.; HORTA, M. F.; BRAGA, E. M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic áreas (Apiacas – Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. **Acta Tropica. 90:** 61-64, 2004.

SELVARAJ, P.; SRIRAM, U.; KURIAN, M.; REETHA, A. M.; NARAYANAN. Tumour necrosis factor alpha (-238 e -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. **Tuberculosis. 81:** 335-341, 2001.

SHAM, P. C.; CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Annals of Human genetics, 59:** 97-105, 1995.

SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Sistema de vigilância epidemiológica em malária (SIVEP-MALÁRIA): relatório de resumo epidemiológico.** SESP. Belém: 2005.

STEVENSON, M. M.; ZAVALA, F. The immunology of malaria infections. **Parasite immunology, 28:** 1-4, 2006.

SU, Z.; STEVENSON, M. M. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Infection and immunity, 68 (8):** 4399-4406, 2000.

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria. **CAMJ. 170(11):** 1693-1702, 2004.

TORRE, D.; SPERANZA, F.; MARTEGANI, R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **THE LANCET infectious disease 2:** 719-720, 2002a.

TORRE, D.; SPERANZA, F.; GIOLA, M.; MATTEELLI, A.; TAMBINI, R.; BIONDI, G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and diagnostic laboratory immunology, 9 (2):** 348-351, 2002b.

- TOSTA, C. E.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Malária. In: **Bogliolo, Patologia**. Brasileiro Filho, G. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1250-1262.
- TRAMPUZ, A.; JEREB, M.; MUZLOVIC, I.; PRABHU, R. M. Clinical review: severe malaria. **Critical care**, **7**: 315-323, 2003.
- TSIAVOU, A.; HATZIAGELAKI, E.; CHAIDAROGLOU, A.; KONIAVITOU, K.; DEGIANNIS, D.; RAPTIS, S. A. Correlation between intracellular interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN- $\gamma$  gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). **Cytokine**, **31**: 135-141, 2005.
- WENISCH, C.; PARSCHALK, B.; NARZT, E.; LOOAREESUWAN, S.; GRANINGER, W. Elevated serum levels of IL-10 and IFN- $\gamma$  in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical Immunology and Immunopathology**. **74**: 115-117, 1995.
- WILSON, P. E.; ALKER, A. P.; MESHNICK, S. R. Real time PCR methods for monitoring antimalarial drug resistance. **Trends in parasitology**, **21**: 278-283, 2005.
- WIRZ, S. A.; MORALE, M. C.; MARCHETTI, B.; BARR, A. M.; SOTGIU, S.; ROSATI, G.; PUGLIATTI, M.; SANNA, M. V.; GILIBERTO, O.; BARTFAI, T.; CONTI, B. High frequency of TNF alleles -238 e -376A in individuals from northern Sardinia. **Cytokine**. **26**: 149-154, 2004.
- WU, M-S.; HUANG, S-P.; CHANG, Y-T.; SHUN, C-T.; CHANG, M-C.; LIN, M-T.; WANG, H-P.; LIN, J-T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr Virus – associated gastric carcinoma. **The journal of infectious diseases**, **185**: 106-109, 2002.
- ZAMBON, C-F.; BASSO, D.; NAVAGLIA, F.; BELLUCO, C.; FALDA, A.; FOGAR, P.; GRECO, E.; GALLO, N.; RUGGE, M.; MARIO, F.; PLEBANI, M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. **Cytokine**. **29**: 141-152, 2005.