UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA E OS POLIMORFISMOS NOS GENES *TNFA, IFNG, IL6 e IL10* ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax* NO MUNICÍPIO DO ITAITUBA, ESTADO DO PARÁ

Tamirys Simão Pimenta

Belém – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA E OS POLIMORFISMOS NOS GENES *TNFA, IFNG, IL6* e *IL10* ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax* NO MUNICÍPIO DO ITAITUBA, ESTADO DO PARÁ

Tamirys Simão Pimenta

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Neurociências e Biologia celular.

Orientador: Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.

Coorientador: Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado.

Belém – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pela autora

---

S588a Simão Pimenta, Tamirys

Análise Genômica Comparativa e os Polimorfismos nos Genes TNFA, IFNG, IL6 e IL10 associados à expressão de citocinas na infecção por Plasmodium vivax no município do Itaituba, Estado do Pará / Tamirys Simão Pimenta. — 2018 xx, 110 f. : il. color

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018. Orientação: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado.

1. Polimorfismos. 2. Citocinas. 3. *P. vivax*. 4. SNPs. 5. CNVs. I. Corrêa de Oliveira, Edivaldo Herculano , *orient.* II. Título

---

CDD 571.6

TAMIRYS SIMÃO PIMENTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador:

Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, IEC.

Banca Examinadora:

Dra. Tânia do Socorro Souza Chaves
Laboratório de Ensaios Clínicos em Malária, IEC.

Dra. Fernanda do Espírito Santo Sagica
Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, IEC.

Dr. Rafael Rodrigues Lima
Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, UFPA.

Dr. André Salim Khayat (Suplente)
Núcleo de Pesquisa em Oncologia, UNACON.

Belém – 2018

Feliz aquele que rejeita maus conselhos,
Segue o exemplo da sabedoria.
Esse homem é como uma árvore
Que cresce na beira de um riacho.
Ele dá bons frutos no tempo certo
E suas folhas não murcham.
E tudo o que este homem faz dá certo.

Salmo 1-41

Dedico este trabalho
Aos meus pais, Álvaro e Socorro Simão
E ao meu, marido Pablo Pimenta,
Que são tudo na minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por se fazer tão presente no meu dia-a-dia e por ter me dado à benção de alcançar mais este degrau na minha formação, bem como todas as imensuráveis vitórias ao longo da minha vida!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Edivaldo Herculano, por ter aceitado o desafio de me orientar neste final da minha vida cientifica, bem como pelo incentivo e ensinamentos. Nunca irei esquecer da confiança que me foi conferida! Junto a ele, agradeço também o meu coorientador, colega de trabalho, chefe e amigo, Dr. Ricardo Machado, a quem serei eternamente grata por, no momento mais difícil desta caminhada, ter me estendido à mão e me honrado com a oportunidade de desenvolver um projeto ao seu lado. Com ele aprendi lições de companheirismo, parceria e união. Sem estes dois grandes profissionais, mestres e exemplos eu não teria conseguido!

Agradeço ao meu ex-orientador e amigo, Dr. José Antônio Diniz, por me aceitar como aluna em 2008, quando a minha vida científica estava ainda se iniciando. De 2008 a 2016, foi com e graças a ele, que pude me formar como profissional e ao seu lado que juntei dois grandes troféus. Serei grata eternamente por toda paciência, incentivo e críticas que só me fizeram evoluir como ser humano. Sinto-me sortuda por ter conhecido e convivido com alguém de coração tão bom e pronto para ajudar. Esta vitória, apesar de todas as nossas dificuldades, não teria sido possível se você não estivesse entrado em minha vida. Obrigada por me conduzir até esta grande e imensurável vitória!

Aos pacientes de Itaituba que permitiram a realização desse estudo na esperança de que a doença seja mais compreendida e minimizando seus impactos.

A toda equipe do laboratório de Ensaios Clínicos em Malária, em especial, a minha querida chefa e amiga, Dra. Ana Maria Ventura, pela ajuda, incentivo, apoio e amizade.

A toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, em especial a Carolina Nassar Amorim, pela ajuda e apoio nas práticas e interpretação dos dados de aCGH.

A Dra. Luana Lima e a Dra. Maria Izabel de Jesus serei eternamente grata por disponibilizarem os insumos para desenvolvimento do projeto. Sem este apoio, nada teria sido possível!

A Dra. Ana Paula Rodrigues, pelo auxilio nas práticas das dosagens das citocinas, bem como pela paciência, disponibilidade e cuidado.

Ao colega de trabalho, Felipe Bonfim, pelo apoio e ajuda na realização das práticas moleculares bem como todos os ensinamentos e paciência. Foi graças a sua mão companheira que pude executar as práticas em tempo hábil. Serei grata eternamente!

Agradeço às minhas companheiras de trabalho e amigas, Rafaele Oliveira e Wanda Costa, por terem compartilhando momentos de alegria e de tristeza, me ajudando, me apoiando e comemorando comigo esta vitória.

A colega de trabalho Vera Cordeiro e a aluna Lethycya Ribeiro pelo apoio, ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo.

Ao meu marido, Pablo Pimenta, palavras serão poucas para agradecer por todo amor, apoio, acalento e ombro amigo. Ao seu lado encontrei um companheiro para vida toda e esta vitória não teria sido possível sem você!

Aos meus pais e irmãs, agradeço por tudo! Por tanto amor dispensado, por tanto cuidado e tantos momentos de felicidade que vocês me proporcionaram até hoje!

Aos membros das famílias Pina e Simão pelo amor incondicional e por me mostrar a importância e o valor de uma família!

Agradeço a todos os meus amigos por se fazerem tão presentes na minha vida, me oferecendo ombro amigo nos momentos difíceis e pela motivação ao longo da minha vida.

Agradeço em especial as minhas amigas Taíssa Araújo e Débora Fernandes que acompanharam de perto este momento e que, incansavelmente, ofereceram apoio, ensinamento e paciência. Levo a amizade de vocês por toda a minha vida.

Aos membros da banca, por terem aceitado colaborar com o trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, a Universidade Federal do Pará e ao Instituto Evandro Chagas por todo o suporte para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

TÍTULO	**PÁGINA**
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	21
1.1.1. MALÁRIA NO MUNDO	21
1.1.2. MALÁRIA NO BRASIL	22
1.1.3. MALÁRIA NA REGIÃO AMAZÔNICA	25
1.2. PATOGÊNESE DA MALÁRIA	28
1.2.1 CICLO BIOLÓGICO	28
1.2.1.1. A Infecção nos Hepatócito	30
1.2.1.2. A Infecção nos Eritrócitos	31
1.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS	32
1.2.3. FATORES ASSOCIADOS ÀS RECIDIVAS DA INFECÇÃO	35
1.2.4. RESPOSTA IMUNE	37
1.2.4.1. Resposta Imune na Fase Pré-Eritrocítica	38
1.2.4.2. Resposta Imune na Fase Eritrocítica	39
1.3. CITOCINAS	40
1.3.1. FATOR DE NECROSE TUMORAL	42
1.3.2. INTERFERON GAMA	43
1.3.3. INTERLEUCINA 6	44
1.3.4. INTERLEUCINA 10	45
1.4. POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS	46
1.4.1. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA TNF-α	47
1.4.2. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IFN-γ	48

1.4.3. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IL-6 49
1.4.4. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IL-10 50
1.5. VARIAÇÕES GENÉTICAS QUANTITATIVAS: CNVs 51
1.5.1. VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E AS DOENÇAS INFECCIOSAS 54
1.5.2. VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E A MALÁRIA 56
2. OBJETIVOS 58
2.1. OBJETIVO GERAL 58
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 58
3. MATERIAL E MÉTODOS 58
3.1. ÁREA DE ESTUDO 58
3.2. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA 61
3.3. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS 61
3.4. DOSAGEM DE CITOCINAS 61
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA 62
3.6. GENOTIPAGEM 63
3.7. HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM ARRAY 63
3.7.1. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO DNA GENÔMICO (gDNA) 63
3.7.2. MARCAÇÃO DOS gDNA 64
3.7.3. PURIFICAÇÃO DOS gDNA 64
3.7.4. PREPARAÇÃO PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO 64
3.7.5. HIBRIDIZAÇÃO 65
3.7.6. LAVAGEM DOS *MICROARRAYS* 65
3.7.7. ESCANEAMENTO E EXTRAÇÃO DOS DADOS 65
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 66
4. RESULTADOS 66
4.1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS E O NÚMERO DE EPISÓDIOS DE MALÁRIA 66
4.2. DETERMINAÇÃO DAS FREQUENCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS 68

4.3. EXPRESSÃO DAS CITOCINAS 69
4.4. CORRELAÇÃO ENTRE AS CITOCINAS E OS GENÓTIPOS 71
4.5. CORRELAÇÃO ENTRE AS CITOCINAS E A CARGA PARASITÁRIA 73
4.6. CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA E OS GENÓTIPOS 74
4.7. CORRELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE EPISÓDIOS DE MALÁRIA E AS CITOCINAS 76
4.8. ANÁLISE DAS CNVs 77
5. DISCUSSÃO 79
5.1. ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *P. vivax* 79
5.2. POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS E A INFECÇÃO PELO *P. vivax* 81
5.3. ANÁLISE DA FREQUENCIA DAS CNVs E SUA ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO *P. vivax* 85
6. CONCLUSÃO 88
7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA 89
ANEXO I 122
ANEXO II 125
ANEXO III 129

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição da malária nos países endêmicos. 21

Figura 2: Distribuição da malária no Brasil. 26

Figura 3: Ciclo Biológico do *P. vivax*. 30

Figura 4: Os diferentes mecanismos da variação no número de cópias afetando a expressão de um gene. 52

Figura 5: Diagrama da técnica de aCGH. 53

Figura 6: Esquema representativo do município de Itaituba: Área do Estudo. 59

Tabela 1: Parâmetros Demográficos e Hematológicos da população em estudo. 67

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica do SNP *TNFA* -308A>G, SNP *IFNG* +874T>A, SNP *IL6* -174 C>G, do haplótipo da *IL10* -1082 G>A, -819 C>T e -592 C>A, da população em estudo. 69

Figura 7: Expressão e correlação da citocina TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) em pg/mL entre os maláricos e controle endêmico. 70

Figura 8: Correlação do nível das citocinas TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) e os SNPs/Haplótipo dos genes *TNFA* (a), *IFNG* (b), *IL6* (c) e *IL10* (d). 72

Figura 9: Expressão e correlação da citocina TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) em pg/mL com a carga parasitária nos pacientes maláricos. 73

Figura 10: Correlação entre a carga parasitária nos pacientes maláricos e os SNPs/Haplótipo dos genes *TNFA* (a), *IFNG* (b), *IL6* (c) e *IL10* (d). 75

Figura 11: Análise comparativa entre a expressão das citocinas TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) em pg/mL com o grupo controle endêmico, malária primária e malária recorrente. 76

Tabela 3: Alterações envolvidas nas amostras positivas para *P. vivax*. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
aCGH	Hibridização genômica comparativa em *array*
AC	Acre
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AM	Amazonas
An	*Anopheles*
AP	Amapá
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
C	Citosina
CD	Grupamento de Diferenciação
CDC	*Center for Disease Control and Prevention*
CNVs	Variação no Número Cópias
CENP	Comitê de Ética e Pesquisa
CSP	Proteína Circunsporozoíta
DARC	Receptor de antígeno Duffy para quimiocinas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
fL	Fentolitros
G	Guanina
g	Força centrifuga
g/dL	Gramas por decilitro
gDNA	DNA genômico
GE	Gota Espessa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GO	Goiás

^{o}C	Graus *Celsius*
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IEC	Instituto Evandro Chagas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPA	Índice Parasitário Anual
kDa	Kilodaltons
Kb	Kilobase
KIRs	Receptores das células NK
>	Maior
<	Menor
≥	Maior ou Igual
MA	Maranhão
Mb	Megabases
µL	Microlitro
MIP-1α/CCL3L1	Proteína Inflamatória de Macrófago-1alfa
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MT	Mato Grosso
mL	Mililitro
NF-KB	Fator Nuclear Kappa Beta
NK	*Natural Killer*
PA	Pará
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase

pg	Picogramas
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
pH	Potencial Hidrogeniônico
P. Falciparum	*Plasmodium falciparum*
P. malariae	*Plasmodium malariae*
P. ovale	*Plasmodium ovale*
P. vivax	*Plasmodium vivax*
*Pv*DBP	Proteína do *P. vivax* de ligação de Duffy
*Pv*MSP-1_{19}	Proteína de superfície do merozoíto-1
*Pv*RBP	Proteínas de ligação aos Reticulócitos
P. knowlesi	*Plasmodium knowlesi*
%	Porcentagem
Km^2	Quilômetros quadrados
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
RO	Rondônia
RR	Roraima
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAc	RNA complementar
SIVEP-Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos
SSP	Sequência de *primers* específicos
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TCR	Receptor da Célula T
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento beta
Th	Células T *helper*

TLR	Receptores *Toll-Like*
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TO	Tocantins
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina
Tγδ	Linfócitos T gama delta
UI	Unidades Internacionais
VCM	Volume Corpuscular Médio
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VP	Vacúolo Parasitóforo

RESUMO

A malária é uma das mais importantes doenças transmitidas por vectores e que acomete grande parte da população mundial. O *P. vivax* é a espécie predominante nas Américas, representando 64% dos casos. A área endêmica da malária no Brasil compreende a Região Amazônica, responsável por 99% dos casos autóctones. Trabalhos anteriores demonstraram a alta prevalência da malária em garimpeiros na região Amazônica e a espécie mais frequente envolvida é o *P. vivax*. A resistência à malária faz parte da interação de diferentes fatores que regulam as relações entre o parasito e o hospedeiro. Essa interação é um fator determinante na resposta imune a infecção. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes de citocinas têm sido explorados em estudos de variação genética humana e tentam explicar a influência dessa variação na susceptibilidade as doenças infecciosas. As variações no número de cópias (CNVs) também podem afetar potencialmente a expressão dos genes de várias maneiras, contudo pouco se sabe sobre o papel dessa variação genética na adaptação humana frente à infecção pelo *P. vivax*. O estudo objetivou investigar se as alterações genômicas quantitativas e os SNPs nos genes TNFA-308*A*>*G*, IFNG+874*T*>*A*, IL6-174*C*>*G* e do haplótipo -1082/-592/-819 no gene IL10, associados à produção de citocinas podem influenciar na fisiopatogenia da malária vivax. O estudo selecionou 129 pacientes, a partir de 288 atendidos na cidade de Itaituba, estado do Pará, sendo 79 pacientes sem infecção para malária e 50 pacientes positivos para *P. vivax* e destes, 15 tinham infecção primária a malária e 35 pacientes relataram episódios anteriores a infecção. Foi determinada a carga parasitária pela gota espessa; os parâmetros hematológicos; as citocinas foram dosas por citometria de fluxo; a genotipagem dos SNPs foi feita por PCR-*SSP* e a variação no número de cópias foi determinada pela técnica do aCGH. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Bioestat e *Graph-pad prim*. Observados que ambos os grupos maláricos (primário e recorrente) apresentaram redução significativa no número de plaquetas; no grupo recorrente observamos aumento significativo na porcentagem de monócitos; não observamos diferenças significativas na frequência dos SNPs; não observamos associações dos SNPs com a infecção pelo *P. vivax*; observamos diferenças significativas nos níveis plasmáticas das citocinas entre os grupos; observamos

níveis significativamente maiores nos indivíduos com o haplótipo IL10*GCC/GCC* e correlação entre os níveis das citocinas IL-10, TNF-α e IL-6 e a carga parasitária; observamos um aumento significativo no nível das citocinas IFN-γ, IL-6 e IL-10 no grupo com malária primária em comparação ao controle endêmico, bem como um aumento significativo na expressão das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10 no grupo recorrente em comparação ao grupo controle, enquanto que a expressão da citocina IFN-γ foi significativamente maior no grupo primário em comparação com o grupo recorrente. Descrevemos pela primeira as alterações quantitativas no genoma dos pacientes infectados com *P. vivax* e identificamos 112 genes amplificados e 12 genes deletados na população em estudo, e, apesar das CNVs encontradas não incluírem nenhum gene relacionado com receptores ou fatores de resistência a malária vivax e nem estarem correlacionados com os dados clinico-patológicos da doença, observamos vários genes com alterações no número de cópias relacionados a outras doenças. Este estudo fornece dados adicionais sobre a resposta imune entre *P. vivax* e o hospedeiro e as alterações genômicas quantitativas no hospedeiro de uma área endêmica de garimpo.

Palavras-Chave: Polimorfismos; Citocinas; *P. vivax*; SNPs; CNVs.

ABSTRACT

In endemic areas of Asia, Oceania, Central and South America and in the horn of Africa *P. vivax* malaria is a major cause of morbidity with 35 million cases annually. In Brazil, the Amazon region concentrates almost all cases and infections registered countrywide, with more than three hundred thousand cases per year. Several evidences suggest that an exacerbated inflammatory response associated to density parasite is likely to aggravate the malaria symptoms. We assessed the haematological and immunological aspects, genetic alterations related to CNVs that could lead to phenotypic alterations, conferring resistance or susceptibility to malaria, as well the presence of polymorphisms in cytokine genes and their association with the infection in patients living in a gold-mining area in a gold-mining in the Brazilian Amazon Region, establishing patterns of immune response characteristic of primary malaria, recurrent malaria and endemic control. Six SNPs (*TNFA*-308G/A, *IFNG*+874T/A, *IL6*-174G/C, *IL10*-1082G/A, -819C/T, -592C/A) in four genes were determined; blood cell count was conducted on automatic analyzer; plasmatic cytokines IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ were quantified by flow cytometry and density parasite was estimated by thick blood films with confirmation by nested-PCR; the CNV was estimated by aCGH and association between copy number and phenotypes (parasite load, mean number of clinical infections of malaria and gender) was assessed. The statistical analyzes were performed by *Graph-pad* prism 6.0 and Bioestat 5.0. No significant association was found between SNPs and malaria infection; cytokine levels were higher in malaria group when compared to endemic control; production of IL-10 was higher in the presence of *GCC/GCC* haplotype; IFN-γ levels were correlated with previous malaria episodes; malaria patients showed lower platelet numbers, reduction on white blood cells count and an increased monocyte percentage; significant increase in the IL-6 and IL-10 plasmatic levels in both malaria groups; the primary malaria patients displayed the highest significant plasmatic IFN-γ levels; recurrent malaria patients displayed the highest significant plasmatic TNF-α; malaria infection demonstrated correlation between parasite density and TNF-α, IL-6 and IL-10 levels; a total of 112 amplified genes and 12 deleted genes were observed and the CNVs found did not include any gene related to receptors or vivax malaria resistance factors. There were no

statistically significant correlations between the clinical and pathological data (parasite load, mean number of clinical infections of malaria and gender) and the presence of CNVs in the patients studied. This study provides additional data on *Plasmodium*-host immune response and describes the quantitative changes in the human genome in *P. vivax* infection in an endemic area of *garimpo*.

Keywords: Polymorphisms; Cytokine; *P. vivax*; SNPs; CNVs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

1.1.1. MALÁRIA NO MUNDO

A malária é uma das mais importantes doenças transmitidas por vectores e que acomete grande parte da população mundial (Figura 1). Cerca de 216 milhões de casos de malária foram registrados em 2016 e 445 mil mortes (CDC, 2017). A maioria dos casos foram registrados na região africana (90%), seguido da região do sudeste asiático (3%) e da região do mediterrâneo oriental (2%). A incidência estimada da malaria teve redução de 18% globalmente de 76 para 63 casos para cada 1000 habitantes entre 2010 e 2016. A região do sudeste Asiático teve a maior redução (48%), seguido da região das Américas (22%) e região Africana (20%), segundo a organização mundial da saúde (OMS). Apesar dessas reduções, entre os anos de 2014 e 2016 aumentou significativamente a incidência de casos na região das Américas, bem como nas regiões do sudeste Asiático, Pacifico Ocidental e África do Sul (WHO, 2017).

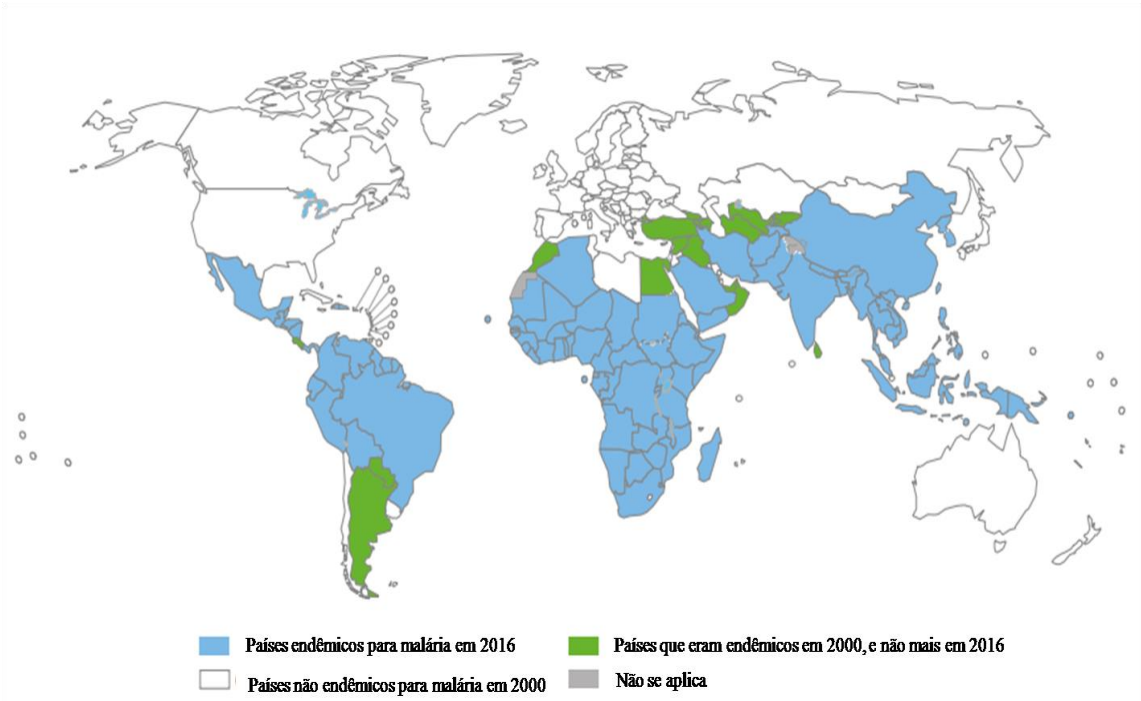

Figura 1: Distribuição da malária nos países endêmicos. Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

A malária é causada por parasitas do filo Apicomplexa, pertencentes ao gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Cinco espécies causam malária em humanos: *P. Falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (CDC, 2017). O *P. falciparum* é a espécie mais prevalente na África Subsaariana, apresentando 99% dos casos estimados em 2016. Fora da África, o *P. vivax* é a espécie predominante nas Américas, representando 64% dos casos, sendo superior ao registrado no sudeste asiático (30%) e na região do mediterrâneo Oriental (40%) (WHO, 2017).

A resistência às drogas desde o primeiro relatório em 1989 (Rieckmann *et al*., 1989; CDC, 2017) vem aumentando em todo o mundo, com registros no Sudeste Asiático (Indonésia, China, Tailândia, Papua Nova Guiné), na América do Sul (Amazônia brasileira e peruana e Colômbia), na África (Madagascar e Etiópia), no Paquistão e na Turquia (Khatoon et al., 2009; Price et al., 2014). Essa resistência parece estar relacionada a mutações no gene da resistência a múltiplos fármacos e variação no número de cópias do gene, devido à pressão seletiva pelo tratamento com drogas antimaláricas (Suwanarusk et al., 2008; Khim et al., 2014).

O *P. vivax* e *P. falciparum* são as principais espécies que causam malária em humanos (*P. malarie* é menos frequente), contudo, até os últimos anos, a maioria das pesquisas e financiamentos foram focados na prevenção, tratamento e controle do *P. falciparum*. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão expostas a riscos de infecção para ambas as espécies de parasitas (Gething et al., 2012; Gething et al., 2011). Muito embora o *P. falciparum* cause muitas mortes, especialmente na África subsaariana, onde *P. vivax* é mais raro, a predominância do *P. vivax* em algumas das maiores e mais povoadas regiões do mundo, juntamente com a sua agora comprovada associação com resultados graves e fatais, demonstra a importância de se reverter a negligência histórica desta infecção. Uma compreensão mais profunda da epidemiologia única deste parasita é necessária para o controle efetivo da malária (Howes et al., 2016).

1.1.2. MALÁRIA NO BRASIL

O Brasil é o maior país da América do Sul, com uma área de mais de 8,5 milhões de quilômetros quadrados e uma população total de mais de 200 milhões

de habitantes. Grande parte do seu território está localizada na zona tropical (dos quais quase 60% estão na região amazônica), com uma flora e fauna altamente diversificada e que abriga os mosquitos transmissores das infecções como febre amarela, dengue, chikungunya, zika vírus e malária (Barreto et al., 2011). A transmissão da malária é quase inteiramente restrita à região Amazônica. Nas últimas quatro décadas, o Brasil tem sido responsável por mais de 30% dos casos de malária nas Américas (WHO, 2017).

A história do controle da malária no Brasil obteve um relevante sucesso, bem como grandes desafios e barreiras. Até a primeira metade do século 20, a transmissão da malária ocorreu na maior parte do seu território, com cerca de 6 milhões de episódios por ano em uma população de 50 milhões de habitantes. O fortalecimento das ações de controle da doença através da campanha de erradicação da malária entre os anos de 1950-1960 proporcionou o controle da transmissão nas regiões sul e nordeste do país (Oliveira-Ferreira et al., 2010). No final da década de 1960, a incidência da malária caiu para menos de 53,000 casos por ano, quase todos na região norte (Griffing et al., 2015).

A incidência da malária flutuou no Brasil, com uma clara tendência crescente a partir do final da década de 1970. O baixo número de casos relatados na década de 1960 foi restringido a pequenas aldeias; esse cenário mudou no final da década de 1970 devido à migração massiva para a região amazônica promovida pelo governo federal durante a ditadura militar (Sampaio et al., 2015). O número de casos aumentou de 52 mil por ano na década de 1960 para 550 mil na década de 1980 a 1990, atingindo um pico de 637.470 em 1999, seguido de uma tendência decrescente a partir de 2008, e finalmente atingindo o menor número de casos nos últimos 35 anos em 2015, com um total de 142.314. Esta tendência também foi mostrada pelo índice parasitário anual (IPA) restrito às áreas de transmissão na região amazônica, que caiu de 35 casos por 1.000 pessoas por ano no início da década de 1990 para pouco acima de cinco em 2015. Está clara diminuição da incidência é resultado dos esforços no controle da doença implementados em partes, por iniciativa do governo federal, com o apoio de entidades locais (Griffing et al., 2015).

No entanto, apesar do sucesso relativo dos esforços de controle, a transmissão da malária ainda está em curso na região amazônica e os surtos a nível nacional foram registrados em 1999 e 2005, respectivamente. Uma variedade de fatores pode contribuir para o aumento do número de casos, incluindo os ambientais, a falta de condições sanitárias adequadas e o cenário socioeconômico e político instável. Especificamente, a falta de financiamento e gerenciamento relacionado às medidas de controle, a descentralização da responsabilidade pela condução da vigilância do nível federal ao município e a estação chuvosa mais intensa podem explicar a alta incidência observada neste período (Cohen et al., 2012).

A redução no número de casos de malária causados pelo *P. falciparum* a partir de 1990 foi proporcional a um aumento simultâneo e progressivo com os causados pelo *P. vivax*, que levou esta última espécie a se tornar predominante e responsável por mais de 90% dos episódios de malária em 2011. Razões por trás desta tendência inclui um marco importante na saúde pública, com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1988 resultou no melhor acesso ao diagnóstico e ao tratamento. A proporção de *P. vivax* aumentou ligeiramente acima de 50% em 1983 para cerca de 65% em 1995. Durante o segundo semestre da década de 1990, o Ministério da Saúde implementou o “Programa de Controle Intensificado da Malária”, expandindo e melhorando o diagnóstico e tratamento da doença com foco na redução do tempo de tratamento, resultando em cerca de 50% dos casos tratados dentro de 48 horas após a apresentação dos sintomas. A proporção de *P. vivax* atingiu 80% do total em 1999, com um aumento no número total de casos nesse ano (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Griffing et al., 2015).

Durante os seis anos seguintes, o número de casos diminuiu consideravelmente, com uma proporção decrescente de P. vivax atingindo 73% do total em 2005, coincidindo com a decisão do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) para mudar o tratamento de primeira linha para terapias combinadas de artemisinina após evidência de aumento da resistência do *P. falciparum* a quinina e doxiciclina (Alecrim et al., 2006). Entre 2005 e 2015, embora a população de risco tenha aumentado 13%, a incidência de malária diminuiu consideravelmente, como evidenciada pelas reduções no IPA (79,2%) e no número

total de casos (76,5%). Essa tendência foi acompanhada por um declínio ainda maior na proporção de *P. falciparum*, com predomínio de *P. vivax* aumentando progressivamente até atingir 88,4% em 2015 (Siqueira et al., 2016).

A proporção de recaídas de infecções por *P. vivax* é muitas vezes considerada como uma propriedade intrínseca dos parasitas da malária, que varia consideravelmente por região geográfica. Cepas tropicais recaíram mais do que cepas temperadas. No entanto, a proporção de recaída é também claramente uma função da carga parasitária e da resposta imune. A recaída comumente ocorre dentro de alguns meses após o tratamento de "malária primária" que pode reaparecer as formas assexuadas do parasita no sangue, até seis meses após o período de monitorização pós-terapêutica (White, 2011).

A "malária recorrente" pode surgir de reinfecções em áreas de transmissão ativa ou recrudescência, como resultado da falta de eficácia dos antimaláricos ou recaídas, que são o resultado da ativação das formas latentes no fígado, chamadas de hipnozoítos. Cada um deles requer estratégias de controle específicas, como o manejo de vetores, antimaláricos mais eficazes e tratamento, respectivamente. Estas características distintas, juntamente com uma incompleta compreensão dos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença criam desafios ainda maiores para o controle da transmissão (Siqueira et al., 2016).

1.1.3. MALÁRIA NA REGIÃO AMAZÔNICA

A área endêmica da malária no Brasil compreende a Região Amazônica, responsável por 99% dos casos autóctones incluindo os estados do Acre (AC), Amapá (AP), Amazonas (AM), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR), Tocantins (TO), parte do Maranhão (MA) e cinco municípios de Goiás (GO). Mesmo na área endêmica, o risco de contrair a doença não é uniforme e este é medido pelo IPA, que serve para classificar as áreas de transmissão em alto (≥ 50), médio (<50 e ≥10) e baixo risco (<10) de acordo com o número de casos para cada mil habitantes (Braz et al., 2013) (Figura 2).

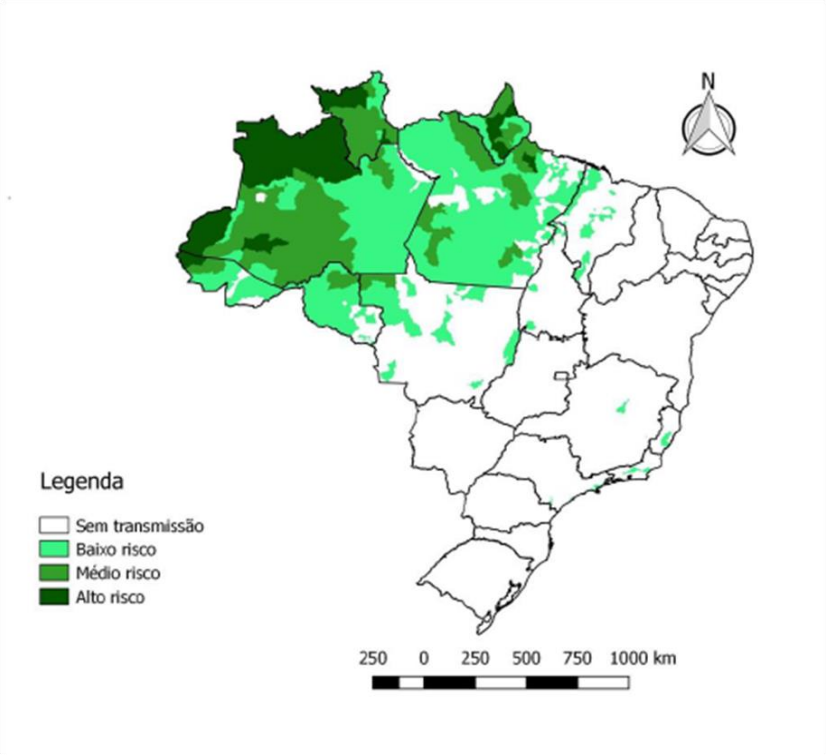

Figura 2: Distribuição da malária no Brasil. Fonte: Brasil, 2015.

Em 2016, houve redução dos casos autóctones em comparação com 2015, de 135.153 para 120.282. Na análise por Estado, o PA apresentou o maior aumento (8.893 para 13.854); seguido do AC (26.524 para 34.184). Apesar dos poucos casos autóctones na Região Extra-Amazônica, a doença não pode ser negligenciada diante do risco de reintrodução, agravado pelo fluxo migratório em áreas suscetíveis, bem como pela possibilidade de aumento da letalidade devido ao diagnóstico tardio e manejo clínico inadequado (SIVEP-Malária, 2017).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a Amazônia legal inteira possui 5.020.000 km², representando 59% do território brasileiro, distribuído por 775 municípios, onde viviam em 2010, segundo o censo demográfico, 25,5 milhões de pessoas. Entre os Estados da Amazônia Legal, o PA é o mais populoso, atingindo a marca de 7,5 milhões de habitantes. AM tem 3,4 milhões de habitantes, e MT, 3,0 milhões. O Estado menos populoso é o AP, com 669 mil habitantes (IBGE, 2010).

Um total de 60% dos casos de malária na América do Sul são oriundos da Amazônia brasileira. Esta região serve como uma importante fonte de casos e

surtos de malária importados e introduzidos na região extra-amazônica do Brasil, bem como em outros países (Arévalo-Herrera et al., 2012). Embora a transmissão da malária se concentre principalmente na Amazônia (99,5% dos casos brasileiros em 2013), a distribuição da doença nesta região não é homogênea. Entre os 808 municípios amazônicos, 37 municípios relataram 80,37% dos casos, cinco municípios (Cruzeiro do Sul (AC), Porto Velho (RO), Itaituba (PA), Eirunepé (AM) e Manaus (AM)) relataram 30,36 % dos casos e três deles, Cruzeiro do Sul, Porto Velho e Itaituba, relataram 21,48% do total de casos na Amazônia (de Pina-Costa et al., 2014).

A malária na Amazônia brasileira é classicamente sustentada por mosquitos do gênero *Anopheles* (*An*), entre os quais *An. darlingi* desempenha um papel único e, é a principal espécie na Amazônia. Diversas condições ambientais propiciam a transmissão, dentre elas: a abundância do vetor, temperatura acima de 16°C, baixas altitudes, alta umidade e frequência de chuvas, fatores estes favoráveis à sobrevivência do mosquito vetor. Somado a isso, condições ambientais, tais como desmatamento, abertura de estradas, colonização recente de áreas desmatadas e de exploração mineral também estão envolvidos na receptividade da região Amazônica para a disseminação da malária (Tauil, 2011).

Atividades de mineração têm sido reconhecidas, há muito tempo pelas autoridades de saúde no Brasil, como uma atividade que favorece a disseminação da malária (Cunha et al., 2001). Trabalhos anteriores demonstraram a alta prevalência da malaria em garimpeiros na região Amazônica (Ferreira et al., 2012; Barbieri e Sawyer, 2007; Coura et al., 2006), e a espécie mais frequente envolvida é o *P. vivax* (De Oliveira et al., 2013). A mineração contribui para a propagação da doença através das mudanças ecológicas associadas às operações de mineração por vários motivos, como: introdução de pessoas não imunes à malária para um contato direto com o vetor; criação de nichos ecológicos, pelos métodos de mineração, para reprodução, propagação e sobrevivência de mosquitos; garantia de muitos contatos repetidos entre os reservatórios humanos e o vetor devido as operações de mineração; os assentamentos mineiros em áreas remotas são muitas vezes inacessíveis à vigilância, diagnóstico e tratamento periódicos da saúde; e o contexto sociológico da mineração de ouro envolve a migração contínua de

pessoas infectadas, criando um reservatório móvel de hospedeiros humanos capaz de introduzir a doença, tanto dentro quanto fora do Brasil (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Singer e Castro, 2001). Este cenário cria uma importante barreira no controle e eliminação da malaria na região e estratégias ainda maiores devem ser tomadas a fim de minimizar os riscos da doença nessas áreas de garimpo.

1.2. PATOGÊNESE DA MALÁRIA

1.2.1 CICLO BIOLÓGICO

Cerca de 90% dos casos clínicos na malária é resultado da infecção pelas duas das espécies mais relevantes: *P. falciparum* ou *P. vivax*. A malária causada pelo *P. vivax* é a segunda mais importante em todo o mundo e é a mais prevalente nos continentes asiático e americano (WHO et al., 2015). Essa infecção é caracterizada por recidivas anos após a primeira infecção, uma vez que a forma latente, chamada hipnozoíto, que ocorre durante a fase hepática, é de difícil diagnóstico, permitindo assim a sobrevivência do parasito no hospedeiro por mais tempo (White, 2011).

A infecção começa com o vetor inoculando esporozoítos na pele do hospedeiro; os esporozoítos são móveis e migram para a circulação sanguínea até alcançar o fígado (Gueirard et al., 2010) (Figura 3). Sinnis e Coppi (2007) designou "estádio cutâneo" da infecção, uma vez que, após a inoculação, pode haver interação entre os esporozoítos e as células cutâneas locais, permitindo com que os esporozoítos permaneçam durante duas a três horas, talvez em folículos pilosos, dando origem a merozoítos.

Os esporozoítos, por sua vez, migram da pele para os hepatócitos e, em seguida, atravessam as células endoteliais iniciando assim o estádio hepático que pode passar despercebido clinicamente (Duffy et al., 2012). Alguns esporozoítos permanecem como hipnozoítos durante esta fase, e outros vão para a corrente sanguínea, desenvolvendo os merozoítos, iniciando o ciclo sanguíneo onde as manifestações clínicas da doença são apresentadas (Bartoloni e Zammarchi, 2012).

Os merozoítos liberados na circulação invadem os eritrócitos (fase eritrocítica), transformando-se em trofozoítos, que amadurecem e se dividem, gerando esquizontes. Os esquizontes amadurecidos rompem os eritrócitos e liberam merozoítos que invadem novos eritrócitos, e, após algumas gerações, se diferenciam em gametócitos. Estes, quando ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo, sofrem fusão e formam o oocineto, que penetra na parede intestinal formando os oocistos. Estes se dividem por esporogonia, originam esporozoítos, que se depositam na glândula salivar do mosquito para então iniciar um novo ciclo (Rénia e Goh, 2016).

A gravidade da doença durante o ciclo eritrocítico depende de vários fatores, como a localização de eritrócitos parasitados nos órgãos-alvo, a ação local e sistêmica dos antígenos do parasita, a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a regulação da resposta imune inata e adaptativa mediada por citocinas e quimiocinas, e ativação, recrutamento e infiltração de células inflamatórias (Schofield e Grau, 2005). Os sintomas da doença aparecem cerca de 10 a 15 dias após a inoculação pelo mosquito infectado e incluem inicialmente febre, dor de cabeça, tremores e vômitos; se não for tratada precocemente, e dependendo da espécie, a doença pode evoluir com anemia grave, acidose metabólica ou malária cerebral e até mesmo levar à morte (López et al., 2017).

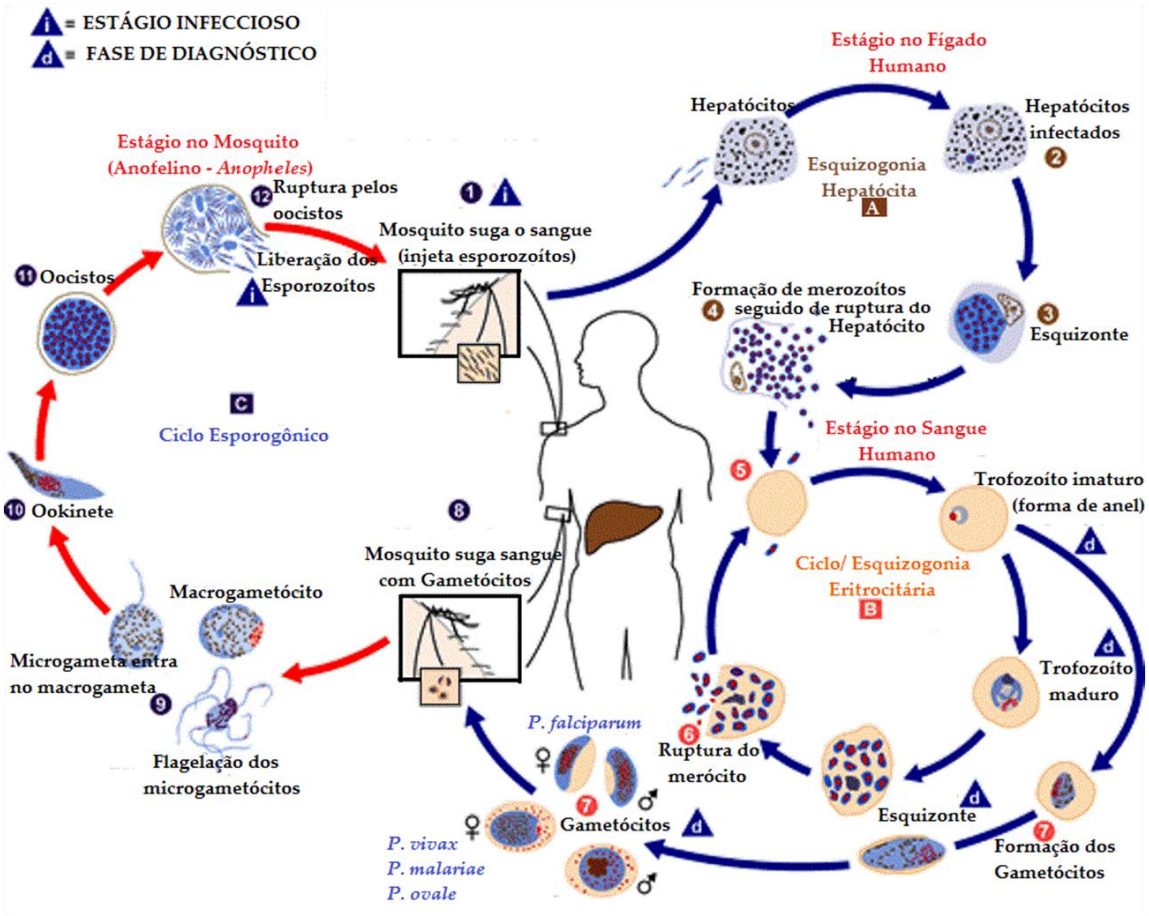

Figura 3: Ciclo Biológico do *P. vivax*. Fonte: Adaptado de CDC, 2016.

1.2.1.1. A Infecção nos Hepatócitos

A infecção nos hepatócitos é também chamada de fase pré-eritrocítica, altamente ativa, porém assintomática. O controle da infecção nesta fase evitaria o estádio sanguíneo sintomático da malária e por isto ele é alvo chave por várias razões: o número de hepatócitos infectados é extremamente baixo, na ordem de dezenas a centenas; o *P. vivax* (assim como as demais espécies que infectam o homem) demoram quase uma semana para completar o desenvolvimento nos hepatócitos, proporcionando assim tempo suficiente para a eliminação; e, ao contrário das hemácias infectadas, os hepatócitos infectados são capazes de apresentar antígenos parasitários a células imunes efetoras (Duffy et al., 2012).

No fígado, os esporozoítos atravessam a camada fenestrada de células endoteliais e de Kupffer para entrar no espaço de Disse (espaço entre os capilares sinusóides e os hepatócitos), e usando a sua proteína de superfície mais

abundante, chamada de proteína circumsporozoíta (CSP), bem como a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP) para reconhecer as células de Kupffer e passar através da célula dentro do vacúolo parasitóforo (PV) (Pradel e Frevert, 2001).

Neste momento, os esporozoítos sofrem transformações, com arredondamento da sua forma e expansão em tamanho. No interior dos hepatócitos o parasito se localiza adjacente ao núcleo e pode alterar a expressão de proteínas hospedeiras através da translocação da CSP através da membrana nuclear (Singh et al., 2007). Os esporozoítos sintetizam grandes quantidades de lipídios e ácidos nucléicos necessários para que aconteçam sucessivas divisões até formarem dezenas de milhares de merozoítos dentro de 6 a 7 dias (para as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos). Estes merozoítos emergem dos hepatócitos em pequenos bolsos chamados merosomas e entram na corrente sanguínea, marcando o fim da fase de pré-eritrocítica (Sturm et al., 2006).

1.2.1.2. A Infecção nos Eritrócitos

A infecção dos eritrócitos do hospedeiro é essencial para o desenvolvimento da doença, variando muito entre as diferentes espécies de *Plasmodium* e envolve um processo complexo e de vários passos com interação entre ligantes do parasita e receptores de ligação a célula hospedeira. As moléculas envolvidas na interação parasita-hospedeiro da espécie *P. falciparum* são bem caracterizadas (Cowman e Crabb, 2006), enquanto que a interação parasita-hospedeiro da espécie *P. vivax* ainda não são totalmente compreendidas (Prajapati e Singh, 2013).

Uma vez alcançando a corrente sanguínea, os merozoítos do *P. vivax* invadem primariamente hemácias jovens (reticulócitos) (Kitchen, 1938). Esta invasão é mediada pelo receptor expresso na sua superfície chamado receptor Duffy ou receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) (Horuk et al., 1993). Durante o processo de invasão, o receptor Duffy é reconhecido e ligado pela proteína de ligação ao antígeno Duffy (*Pv*DBP) no merozoíto do *P. vivax*. A *Pv*DBP é uma proteína de 140 kD, localizada numa organela do merozoítos, chamada de micronema (Fang et al, 1991; Adams et al., 1992) e é composta por cinco regiões com base em resíduos de cisteína conservados e a região II que confere aderência

ao receptor Duffy na superfície dos eritrócitos. A ausência de receptor Duffy, até então, conferia resistência à infecção por *P. vivax* (Miller et al., 1976), contudo há relatos de transmissão de *P. vivax* em pacientes negativos para o grupo sanguíneo Duffy, na África (Ryan et al., 2006; Mendes et al., 2011; Wurtz et al., 2011) e no Brasil (Cavasini et al., 2007a; Cavasini et al., 2007b; Carvalho et al., 2012). Outras proteínas estão envolvidas neste processo.

Além da *Pv*DBP, outras proteínas do *P. vivax* envolvidas no reconhecimento e na ligação com os reticulócitos já foram identificadas, no entanto, seus respectivos receptores em ainda não estão definidos. Estas proteínas incluem as proteínas de ligação aos reticulócitos (*Pv*RBP) e a proteína de superfície do merozoíto-1 (*Pv*MSP-1_{19}) (Galinski et al., 1992; Cantor et al., 2001; Rodriguez et al., 2002). A especificidade na ligação dos reticulócitos é conferida pela família RBP. Dois membros da família já foram caracterizados em *P. vivax* (*Pv*RBP-1 e *Pv*RBP-2), os demais membros já foram encontrados em outras espécies de *Plasmodium* de humanos, símios e roedores (Galinski et al., 1992; Keen et al., 1994; Rayner et al., 2000; Rayner et al., 2004) e suas principais funções são observadas durante o processo inicial de seleção/reconhecimento e invasão dos eritrócitos (Galinski et al., 1992).

1.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção por *P. vivax*, que tem sido muito negligenciada e erroneamente considerada “benigna” (Picot, 2006), está recebendo uma importância cada vez maior nos debates que se realizam sobre epidemiologia e controle da malária, resistência a drogas, patogênese e vacinas (Galinski e Barnwell, 2008).

A apresentação clínica da malária não grave costuma ser febre de início abrupto, dentro de um período de menos de 8 horas. Este aparecimento é justificado pela ruptura das hemácias infectadas, em consequência à produção de citocinas como interleucina (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferon gama (IFN-γ), que são associados aos quadros de calafrio, náusea e vômito (Anstey et al., 2009).

Apesar da parasitemia baixa no estágio sanguíneo em comparação com a infecção pelo *P. falciparum* (Baird, 2013a; Price et al., 2007), a infecção pelo *P.*

vivax causa morbidade significativa e já foi demonstrada associação com a malária grave e morte (Anstey et al., 2012; Quispe et al., 2014; Mahgoub et al., 2012).

As principais alterações associadas à malaria grave são acometimento do sistema nervoso central, a anemia grave, a insuficiência renal, disfunção pulmonar, o choque, trombocitopenia grave, a acidose metabólica e a disfunção hepática. No entanto, estas manifestações são observadas em apenas uma parcela dos indivíduos infectados, sendo esta diversidade justificada pela patogenicidade das cepas e fatores do hospedeiro como idade e características genéticas (Braga et al., 2004; Lacerda et al., 2008; Tanwar et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, para doenças graves, a anemia é a hemoglobina abaixo de 5 g/dL em crianças e menos de 7 g/dL em adultos. A anemia associada à malária é mais frequente e grave em crianças (Kaushik et al., 2012; Lanca et al., 2012) e mulheres grávidas (Douglas et al., 2012; Rijken et al., 2012) e tem sido mais frequentemente associada a infecções pelo *P. vivax*. Na Amazônia Brasileira, a frequência da anemia não severa é de 80% em crianças e adolescentes (Ventura et al., 1999; Fernandes et al., 2008). A etiologia da anemia é complexa e multifatorial em áreas endêmicas. Os principais fatores que influenciam são hemólise, coinfecção por helmintos intestinais, hemoglobinopatias, déficits nutricionais, resistência a drogas e gravidez (Carvalho et al., 2011; Williams et al., 1997; Rodriguez-Morales et al., 2006).

Uma vez infectados, os eritrócitos demoram cerca de 48 horas para romper e liberar os merozoítos na circulação sanguínea, tanto na infecção pelo *P. vivax* como *P. falciparum*. E, apesar do intervalo da parasitemia periférica nas infecções por *P. vivax* ser menor do que na infecção pelo *P. falciparum*, bem como a parasitemia > 2% de eritrócitos infectados ser rara (Trampuz et al., 2003), estudos sugerem que a morte prematura de reticulócitos infectados devido à infecção pelo *P. vivax* deve ser suficiente para levar a anemia extrema ao longo de vários meses prejudicando o fornecimento de glóbulos vermelhos maduros (Jakeman et al., 1999; Price et al., 2007).

Embora seja uma complicação frequente na malária, em 24 a 94% dos pacientes, a trombocitopenia por si só não é considerada como causa da morte. A trombocitopenia é definida como contagem de plaquetas < 150.000/μL, e

trombocitopenia grave como < 50.000/μL. A patogênese da trombocitopenia na malária é complexa e ainda não inteiramente compreendida (Lacerda et al., 2011). Uma das explicações para isso é a ativação da cascata de coagulação e a esplenomegalia (aumento do tamanho do baço relacionado à destruição das hemácias), causando maior consumo e destruição das plaquetas, respectivamente (Kochar et al., 2010).

A insuficiência renal aguda é outra complicação relatada em pacientes com malaria vivax grave (Kaushik et al., 2012; Kochar et al., 2010; Jat et al., 2012), e definidos por apresentarem oligúria e níveis de creatinina acima de 3,0 mg/dL. Outros relatos demonstram pacientes graves com *P. falciparum* e *P. vivax* (Kochar et al., 2009; Andrade et al., 2010; Alexandre et al., 2010; Lacerda et al., 2012a; Kute et al., 2012), alguns necessitando de diálise e alguns evoluindo até a morte (Kochar et al., 2009; Sinha et al., 2013). A icterícia acompanhada da insuficiência renal é outra característica da malária grave. Adultos com malaria vivax que apresentam icterícia é mais comum que em infecções por *P. falciparum* (Kochar et al., 2010; Lanca et al., 2012). Além disso, em áreas endêmicas, outras doenças como leptospirose (Srinivas et al., 2007) e febre tifóide (Kumar e Katiyar, 1995) podem ocorrer em associação com a infecção pelo *P. vivax* causando síndromes ictéricas (Alexandre et al., 2010).

A acidose metabólica é outra alteração relatada na malária, sendo a maioria dos relatos associados à infecção pelo *P. falciparum* e muito pouco é mencionado na malária vivax (Lanca et al., 2012; Kochar et al., 2010; Tanwar et al., 2011), provavelmente devido ao fenômeno de citoaderência (que ocorre nas infecções pelo *P. falciparum*) dos glóbulos vermelhos infectados ao endotélio vascular de órgãos vitais, levando a oclusão vascular e hipoxemia (baixa de oxigênio no sangue). Há evidencias apenas *in vitro* de que hemácias infectadas com *P. vivax* são capazes de aderir às células endoteliais humanas do pulmão e células endoteliais cerebrais de primatas (Carvalho et al., 2010).

O comprometimento neurológico em pacientes infectados com malária é uma manifestação de alta mortalidade associada com diferentes apresentações clínicas. Consciência prejudicada ou coma, prostração com fraqueza generalizada de modo que o paciente não consegue caminhar ou sentar-se, falha na alimentação

e convulsões múltiplas (mais do que dois episódios em menos de 24h) são algumas das principais manifestações clínicas neurológicas da malária grave. Coma e lesão cerebral podem ter mecanismos patogênicos distintos de acordo para diferentes conjuntos de pacientes, ou seja, crianças e adultos, ou diferentes infecções pelo *P. vivax* e/ou *P. falciparum* (Lacerda et al., 2012a).

Na malária grave causada pelo *P. falciparum*, o coma é uma forma grave frequente que ocorre em quase metade dos pacientes e é um forte preditor de desfecho fatal, ocorrendo de forma semelhante em adultos e crianças (Dondorp et al., 2008; Yeo et al., 2007). Porém, na infecção pelo *P. vivax* o coma não é uma manifestação frequente (Lacerda et al., 2012a; Lampah et al., 2011) e as características patológicas do comprometimento neurológico ainda são mal caracterizadas (Anstey et al., 2009; Lacerda et al., 2012b).

1.2.3. FATORES ASSOCIADOS ÀS RECIDIVAS DA INFECÇÃO

A infecção pelo *P. vivax* ocorre em uma área geográfica ampla, estendendo-se para além dos limites da infecção pelo *P. falciparum*. Isto é devido às formas latentes do parasito no fígado humano (hipnozoítos), um refúgio seguro de um ataque imune durante longas estações frias sem o vetor. Para invadir os glóbulos vermelhos, o *P. vivax* depende do antígeno Duffy. Os indivíduos que não expressam este antígeno foram, portanto, considerados refratários à infecção por *P. vivax* (Livingstone, 1984), como em partes da África, onde é muito frequente o fenótipo negativo para o antígeno Duffy (Howes et al., 2011). Contudo, achados de infecções por *P. vivax* em pacientes negativos para Duffy aumentam a possibilidade de um mecanismo de invasão alternativo do parasito (Cavasini et al., 2007a; Ménard et al., 2010).

As recidivas da malária é a recorrência da parasitemia assexuada seguinte ao tratamento da doença, após ter sido constatada a sua negativação, em variado período de tempo (White, 2011). Isto pode ocorrer por (a) falha na terapêutica ou por não adesão ao tratamento (Pereira et al., 2011), ou por resistência do parasito às drogas utilizadas (Cui et al., 2015) ou por má qualidade do medicamento instituído (Nogueira et al., 2011) ou utilização de doses subterapêuticas das drogas antimaláricas (Duarte et al., 2001); (b) reativação das formas dormentes que

constituem o chamado reservatório de hipnozoíto da infecção, que transmite novas infecções sanguíneas e ataques clínicos, além de uma nova transmissão futura (White, 2011) e (c) exposição à nova infecção pelo mosquito vetor e o número de esporozoítos inoculados (Mueller et al., 2013; Hulden, 2011).

Recrudescência da malária ocorre quando as formas sanguíneas do parasito não são completamente erradicadas pelo tratamento e reexpandem o seu número após o declínio da concentração sérica das drogas. Ocorre com maior frequência na malária por *P. falciparum* e *P. vivax* e, raramente, pelo *P. malariae* (Baird, 2013b). As recaídas são definidas como o reaparecimento da parasitemia e das manifestações clínicas do paciente por uma reinvasão das hemácias pelos merozoítos provenientes de hipnozoítos dormentes no fígado. Acredita-se que podem surgir após 21 a 140 dias do tratamento com a cepa tropical e após 180 a 420 dias com a cepa temperada do parasito e sua principal causa é a falha no tratamento (White, 2011).

Baseado apenas na observação clínica é muito difícil distinguir recrudescência de recaída e recaída de reinfecção. Em algumas situações, o discernimento pode ser feito pela identificação de genótipo idêntico do parasito da recaída com a infecção primária. Contudo, a genotipagem dos parasitos da infecção inicial e da recaída não tem sido eficiente (Silvino et al., 2016; Araujo et al., 2012; Restrepo et al., 2011). A reinfecção pelo *P. vivax* é uma nova infecção adquirida por pacientes que tenham tratado de malária, após intervalo de tempo incompatível com a ocorrência de recrudescência ou recaída. Em análise genotípica, pode-se considerar como reinfecção, o achado de um parasito geneticamente diferente daquele causador da infecção primária. Como o tempo entre os episódios da malária se sobrepõe, mesmo com a análise genotípica, é também difícil à distinção precisa entre recaída e reinfecção (De Araujo et al., 2012; Markus, 2011).

Tem sido consenso que até 28 dias, quando ainda há droga circulante após o tratamento, as recidivas podem ser consideradas recrudescências. A partir de 29ª dia até mais de seis meses, podem ser consideradas recaídas, em caso de cepa tropical. As reinfecções, por sua vez, podem ocorrer a qualquer momento após a eliminação da droga do organismo (Silvino et al., 2016; Hanf et al., 2009). No Brasil, o PNCM faz a investigação sistemática das recidivas por meio da monitorização da

parasitemia, em tempos variados, após a finalização do tratamento medicamentoso. O PNCM estabelece como recrudescência, provável recaída e reinfecção pelo *P. vivax*, o ressurgimento da parasitemia nos intervalos de 7 a 28 dias, 29-60 dias e acima de 60 dias, respectivamente, após o início do tratamento da infecção primária, contudo esses pontos de corte podem resultar em classificação errônea dos pacientes (Brasil, 2009).

Um estudo de coorte realizado no Brasil analisou as informações registradas no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP-Malária), com objetivo de descrever a incidência e os fatores associados à recidiva de malária causada pelo *P. vivax* em Porto Velho, Rondônia. Foram demonstrados 23.365 casos de malária por *P. vivax* no município, sendo que 23% deles apresentaram recidiva no decorrer do ano 2009. A densidade de incidência de recidivas foi de 45,1 pacientes para cada 100 no ano, ocorrendo, principalmente, entre a 4ª e a 13ª semana após o início do tratamento (Simões et al., 2014). Em países como Tailândia e Papua Nova Guiné, a taxa de recidivas por *P. vivax* após tratamento com cloroquina e primaquina podem alcançar até 65% no decorrer de 30 a 180 dias de seguimento (Pukrittayakamee et al., 2000; Karunajeewa et al., 2008).

1.2.4. RESPOSTA IMUNE

A resistência a adquirir a malária faz parte da interação de diferentes fatores que regulam as relações entre parasito-hospedeiro. Essa interação é um fator determinante na resposta imune a infecção (Nahrevanian, 2006). A imunidade antimalárica depende de mecanismos fisiológicos inespecíficos e fatores genéticos que se opõem à implantação dos parasitos no organismo do hospedeiro, do desenvolvimento de imunidade adquirida humoral ou celular, que tendem a bloquear o parasito, acelerando sua destruição ou reduzindo a suscetibilidade do hospedeiro aos efeitos patogênicos desencadeados pela infecção (Stevenson e Riley, 2004; Langhorne et al., 2008).

Ao entrar em contato com o indivíduo, o *Plasmodium*, seja como esporozoito ou como merozoíto, passa a ser reconhecido pelo sistema imune primeiramente com a participação de células e fatores do sistema imune inato. Células dendríticas,

fagócitos, células *Natural Killer* (NK), linfócitos B e fatores solúveis, como proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são exemplos de componentes do sistema imune inato que participam ativamente do reconhecimento do parasito. A ação destes fatores promove a internalização do parasito e a liberação de citocinas e quimiocinas que potencializam a fagocitose e contribuem para ativação de células T auxiliares (T *helper*, Th). Depois, há ativação das células T *naïve* ou Th específicas através da interação entre o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II-antígeno e o receptor da célula T (TCR) e entre moléculas co-estimulatórias na superfície das células apresentadoras de antígenos e das células T com grupamento de diferenciação (CD) 4^+. As sucessivas exposições favorecem o desenvolvimento de células imunes de memória, T-$CD4^+$, T-$CD8^+$ e B, que contribuem para a abreviação dos sintomas, através do rápido controle da carga parasitária (Stevenson e Riley, 2004).

1.2.4.1. Resposta Imune na fase Pré-Eritrocítica

Após a inoculação dos esporozoíto na pele do hospedeiro, estes podem permanecer no local até seis horas (Yamauchi et al., 2007). As células apresentadoras de antígenos (APC) reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos ($PAMP_S$), como glicosilfosfatidilinositol (GPI), expostos na membrana do parasito e desencadeiam sinalização intracelular ativando células fagocíticas, como as células dendríticas que reconhecem o parasito por meio dos receptores *Toll-Like* (TLR) 1, 2 e 4. (Gazzinelli et al., 2014).

Durante este estágio, há a liberação de citocinas pelas células fagocíticas ativadas que atuam diferenciando as populações de linfócitos T, bem como ativando linfócitos B, que podem atuar inibindo a motilidade dos esporozoítos na derme ou no fígado (Vanderberg e Frevert, 2004), se ligando ao esporozoíto e facilitando a fagocitose por monócitos ou macrófagos no baço ou no fígado (Schwenk et al., 2011), bloqueando a invasão de esporozoítos nos hepatócitos, impedindo a ligação dele com os receptores nos hepatócitos e inibindo o desenvolvimento de esporozoítos dentro dos hepatócitos (Nudelman et al., 1989).

Os antígenos reconhecidos pelas APC são apresentados às células T citotóxicos $CD8^+$. Nesta fase, os mecanismos efetores específicos compreendem a

citotoxicidade direta nos hepatócitos infectados, já que expressam antígenos de MHC classe I (além dos antígenos MHC classe II), através da produção de citocinas, como IFN-γ, que induz a produção de óxido nítrico que destrói os parasitos no fígado (Liehl et al., 2015). Entretanto, a imunidade celular protetora não parece ser decorrência somente da estimulação de linfócitos T citotóxicos $CD8^+$, mas sim de um processo celular que depende do recrutamento de células estimuladas, como os linfócitos T gama delta (Tγδ), as células dendríticas, células NK e macrófagos e da interação destas com outras células (Doolan e Hoffman, 2000).

1.2.4.2. Resposta Imune na fase Eritrocítica

Os mecanismos humorais iniciam-se com as primeiras esquizogonias sanguíneas, quando uma grande quantidade de antígenos parasitários é lançada na circulação, desde corpos residuais dos merócitos até as glicoproteínas da superfície externa dos merozoítos, liberados depois da penetração nas hemácias. Durante esta fase aguda, é desencadeada uma potente resposta imune dirigida contra os diferentes estágios evolutivos do parasita. As hemácias parasitadas apresentam antígenos específicos do *Plasmodium* em sua membrana, podendo ser reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro. Durante sua permanência na corrente sanguínea, os esporozoítos induzem uma resposta imune resultando na produção de anticorpos dirigidos contra antígenos de sua superfície, como imunoglobulinas (Ig) G e IgM (Mueller et al., 2013).

A resposta imune protetora não é efetiva devido à estrutura dos antígenos parasitários e sua diversidade que dificultam a resposta imune influenciando a sobrevivência e a transmissão do parasita. A localização intracelular do parasita e ausência de moléculas de MHC na superfície do eritrócito proporciona um meio relativamente favorável ao crescimento do parasito, além da diversidade antigênica das cepas do *Plasmodium* ou de sofrerem variação antigênica durante a infecção demonstra a capacidade de escape do parasita à resposta imune (Herrera et al., 2007).

Os mecanismos envolvidos no efeito dos anticorpos protetores são a participação de anticorpos opsonizantes que promovem a fagocitose de eritrócitos

infectados e a participação de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3 no homem) os quais se ligam a monócitos promovendo a inibição do crescimento do parasito dentro da hemácia, ocorrendo, então, a atuação de citocinas, como TNF-α, liberadas pelos monócitos ativados, as quais impedem o desenvolvimento das formas sanguíneas dentro da célula hospedeira (Bouharoun-Tayoun et al., 1995).

Os mecanismos pelos quais os linfócitos T participam da destruição do parasito compreendem linfócitos T auxiliares $CD4^+$ que ativam os linfócitos B aumentando a resposta humoral e ativando macrófagos ou células NK, ou pela produção de citocinas capazes de agir sobre os esquizontes, no interior das hemácias (Langhorne et al., 2008). Os linfócitos T auxiliares $CD4^+$, linfócitos TNK, células NK, monócitos e neutrófilos podem ser essenciais na interação humoral/celular para a eliminação dos estágios sanguíneos. Tanto a produção de IFN-γ como de interleucinas (IL-4, IL-2, IL-5) e os radicais de oxigênio e nitrogênio produzidos pelos macrófagos ativados são os mediadores celulares que controlam a infecção pelo parasito (Seixas et al., 2002).

1.3. CITOCINAS

As citocinas são proteínas efetoras e reguladoras da resposta imunológica, possuem um peso molecular variando de 8 a 40 kilodaltons (kDa) e são secretados por células da imunidade natural e adquirida, sendo esta secreção um evento breve e autolimitado, ou seja, não são armazenadas como moléculas pré-formadas e sua síntese é iniciada por novas transcrições de genes. Estas moléculas iniciam suas ações por ligações de alta afinidade aos receptores de membrana específicos nas células alvo, iniciando dessa forma as cascatas de sinalização intracelular e podem atuar sobre as células que os secretam (ação autócrina), nas células próximas (ação parácrina), ou em alguns casos em células distantes (ação endócrina) (Gosain e Gamelli, 2005).

É comum que os diferentes tipos de células secretem a mesma citocina ou uma citocina única pode atuar em vários tipos celulares (pleiotropia). As citocinas são redundantes em sua atividade o seja, funções similares podem ser estimuladas por diferentes citocinas. Muitas vezes, elas são produzidas em cascata, uma vez que uma citocina estimula suas células alvo a produzir citocinas adicionais, como

também podem atuar de forma sinérgica ou antagônica. Estas proteínas são liberadas por muitas populações de células, mas os produtores predominantes são os linfócitos T auxiliares e macrófagos (Zhang e An, 2007).

Mosmann et al. (1986) descreveram pela primeira vez a classificação das citocinas em diferentes padrões de acordo com a sua função e uma divisão bastante comum é o paradigma Th 1/Th 2 e com posterior descoberta da Th 17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Conforme descrito, os três subtipos de linfócitos TCD4$^+$ apresentam diferentes padrões de produção de citocinas e possuem papéis distintos na resposta imunológica. Linfócitos Th1 produzem grandes quantidades de IL-2, que induz proliferação de LT (incluindo os próprios Linfócitos T CD4$^+$ de maneira autócrina) e também induz a proliferação e aumenta a capacidade citotóxica dos Linfócitos T CD8$^+$ (Mosmann et al., 1986).

A outra citocina produzida em grandes quantidades pelos linfócitos Th1 é o INF-γ, uma citocina muito importante na ativação de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos e células dendríticas com patógenos intracelulares, desencadeiam a produção de anticorpos e ativam o sistema complemento que contribui com a opsonização das partículas a serem fagocitadas (Parkin e Cohen, 2001). Linfócitos Th2 secretam IL4, IL5, IL6 e IL10 direcionando para uma defesa humoral, estimulando a produção de anticorpos contra antígenos extracelulares e também inibem as funções das células fagocíticas (Parkin e Cohen, 2001; Bradley, 2003). Os linfócitos Th17 liberam IL-17 e IL-22 (Tesmer et al., 2008) que são responsáveis por uma resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos, potentes indutoras da inflamação (Mesquita et al., 2009; Chen et al., 2007), e estimulando citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF-α, induzem a diferenciação das células B em plamócitos e células de memória, bem como ativam células NK (Korn et al., 2007; Leonard e Spolski, 2005).

Outra classificação adotada para classificar as citocinas é considerando-se a sua participação nos processos inflamatórios. Assim elas são subdivididas em pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As pró-inflamatórias que são produzidas por macrófagos ativados e são rapidamente induzidas frente à infecção como TNF-α, IL-1 e IL-6 e estão envolvidas na patogênese de várias doenças. As citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunoregulatórias que controlam a resposta

inflamatória das citocinas pró-inflamatórias. Um exemplo são IL-4, IL-13 e a IL-10, que inibem a atividade fagocítica dos macrófagos. Entretanto, algumas citocinas possuem efeitos pleiotrópicos e esta classificação deveria ser analisada de forma cuidadosa, como por exemplo, fator de transformação do crescimento (TGF) beta (β) e IL-6 que podem atuar como moléculas pró- ou anti-inflamatórias (Zhang et al, 2007).

1.3.1. FATOR DE NECROSE TUMORAL

O TNF é uma proteína de 17 kDa, identificada como uma substância sérica (fator) que causava necrose tumoral, agora conhecido como o resultado da inflamação e trombose de vasos sanguíneos tumorais. O TNF também é chamado de TNF-α para distingui-lo do TNF-β intimamente relacionado, e também denominado linfotoxina. O TNF é produzido por uma variedade de células incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células NK, neutrófilos e microglias (Abbas et al., 2015).

Esta citocina participa ativamente da resposta mediada por células promovendo o extravasamento de neutrófilos, linfócitos e monócitos aumentando a adesão às células endoteliais; controlando a ativação dos linfócitos T e a expressão de moléculas de MHC e de receptores para adesinas na superfície de diversas células; induzindo apoptose em vários tipos celulares, bem como a síntese de várias outras citocina pró-inflamatórias (como IL-1 e IL-6) e regulando a produção de IL-12 pelos macrófagos (Malaguarnera e Musumeci, 2002; Gimenez et al., 2003). A produção e liberação do TNF-α é estimulada especialmente na fase eritrocítica da malária, por estímulo de GPIs derivados do parasito (Gimenez et al., 2003) e os altos níveis plasmáticos dessa citocina estão associados com a forte resposta de células do tipo Th1 e aumento da gravidade da doença, especialmente da anemia e a malária cerebral (Day et al., 1999; Nussenblatt et al., 2001; Gourley et al., 2002; Hunt e Grau, 2003; Mackintosh et al, 2004).

Estudos anteriores demonstraram níveis plasmáticos de TNF-α elevados no sangue de pacientes com malária por *P. falciparum* e isto, foi associado à elevada parasitemia (maiores ou iguais a 5% de hemácias infectadas) (Ringwald et al.,1991), bem como em um estudo semelhante realizado com crianças na ilha de

São Tomé, na África, também foi observado níveis elevados de TNF-α tanto em crianças com sinais clínicos mais brandos do que as com quadro grave (malaria cerebral) (Baptista et al., 1997). Na infecção pelo *P. vivax*, foi demonstrado em um estudo na Colômbia, que indivíduos com parasitemia moderada apresentaram altos níveis das citocinas TNF-α e IFN-γ (Praba-Egge et al., 2003), bem como foi demonstrado por Andrade et al. (2010), em um estudo em Rondônia, região Amazônica, que indivíduos com infecção grave pelo *P. vivax* apresentaram níveis plasmáticos elevados de tanto de TNF-α como de IFN-γ.

1.3.2. INTERFERON GAMA

O IFN-γ é uma citocina de peso molecular de 45 kDa e tem ação em vários tipos de células, em particular as envolvidas na imunidade, tanto inata quanto adaptativa, e inflamação. As células produtoras de IFN-γ de particular relevância para a malária incluem linfócitos T $CD4^+$, T $CD8^+$ e Tγδ e células NK (Hunt et al., 2014).

O IFN-γ é um mediador das respostas imunes inflamatórias induzidas, principalmente, pela IL-12. A secreção de IFN-γ por células imunes do sistema inato e adaptativo é essencial para o controle de patógenos. A infecção pelo *Plasmodium* induz a produção de IFN-γ de uma variedade de subconjuntos de células imunes inatas e adaptativas em diferentes estágios do ciclo de vida. Estudos em camundongos demonstraram que as células NK são uma das primeiras fontes de IFN-γ durante o estágio do fígado (Miller et al., 2014), bem como o estágio sanguíneo (De Souza et al., 1997), da malária. Células NK humanas também foram mostradas produzindo rapidamente IFN-γ após incubação com hemácias infectadas *in vitro* com *P. falciparum* (Artavanis-Tsakonas e Riley, 2002).

Durante a imunidade inata e adaptativa, ambos os linfócitos NKT quanto os linfócitos Tγδ podem contribuir para a produção de IFN-γ durante a infecção pelo *Plasmodium*. Os estudos demonstraram uma proporção significativa de linfócitos Tγδ de seres humanos infectados com *P. falciparum* (50%) secreta IFN-γ (Hviid et al., 2001), enquanto que os linfócitos NKT em camundongos secretam IFN-γ em resposta a esporozoítos e parasitas da fase hepática (Pied et al., 2000).

Um estudo com mulheres grávidas infectadas com *P. falciparum* demonstrou que, apesar do papel no controle da infecção, os níveis de IFN-γ (assim como do TNF) foram observados elevados tanto nas grávidas que apresentaram malária não complicada como nas que apresentaram o quadro grave de malária cerebral em comparação com o grupo controle. Os autores explicam isto se baseando na produção desequilibrada das citocinas inflamatórias que podem contribuir para a anemia intensa na malária e maior carga parasitária associada à malária cerebral. Apesar dos níveis elevados do IFN-γ em ambos os grupos em comparação ao controle, o nível desta citocina foi maior nas grávidas com malária não complicada do que nas que apresentaram o quadro grave (Nasr et al., 2014).

Esta diferença demonstra a importância de uma resposta imune precoce ao IFN-γ como determinante crucial no resultado da infecção e evolução do paciente, como também demonstrado em estudos anteriores (De Souza et a., 1997; Bostrom et al., 2012). Miller et al. (2014) reforçaram esses achados, demonstrando em camundongos este efeito inibitório do IFN-γ no desenvolvimento do parasita (*Plasmodium yoelii*) na fase hepática que se estende e influencia no início do crescimento do parasita no estágio sanguíneo.

1.3.3. INTERLEUCINA 6

A IL-6 é outra importante citocina nas respostas inflamatórias agudas que têm ambos os efeitos locais e sistêmicos. Ela induz a síntese de uma variedade de outros mediadores inflamatórios no fígado, estimula a produção de neutrófilos na medula óssea e promove a diferenciação de células T produtoras de IL-17. A IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e outras células em resposta aos PAMPs e em resposta a IL-1 e TNF-α (Abbas et al., 2015) e já foi associada aos quadros febris da malaria (Clark e Chaudhri, 1988).

Estudos anteriores demonstraram níveis séricos elevados de IL-6 na infecção pelo *P. falciparum* e associados à gravidade da doença (Wenisch et al., 1999; Kern et al., 1989). Lyke et al. (2004) também demonstrou em seu estudo com crianças africanas com malaria grave causada pelo *P. falciparum*, níveis sérios elevados de IL-6, o que não foi observado nos casos não graves. Day et al. (1999)

em seu estudo realizado com adultos no Vietnã, que apresentaram malária severa causada pelo *P. falciparum*, demonstraram que há uma forte correlação entre as citocinas IL-16 e IL-10 no agravamento da doença. Os autores demonstraram que os pacientes que apresentaram altos níveis de IL-6 e baixos ou a não produção de IL-10, ou vice-versa, evoluíram de maneira fatal a malária. Portanto, o balanço entre as duas citocinas é importante para o controle da evolução clínica da doença, como sugeriram os autores.

Em um estudo recente na região Amazônica, cidade de Porto Velho, Rondônia, foram demonstrados níveis elevados de IL-6, bem como, IL-17, IL-12p40, e TNF-α em indivíduos infectados com *P. vivax*. Contudo, diferenças significativas só foram observadas entre os grupos infectados e controle na expressão das citocinas IL-6 e IL-17 (Hojo-Souza et al., 2017). Chaves et al. (2016) em seu estudo também na região Amazônica, em Manaus, demonstraram um aumento significativo de IL-6, bem como, TNF-α, IL-4 e IL-10, em indivíduos com infecção primária e recorrente causada pelo *P. vivax*. Além disto, os autores demonstraram também que indivíduos com malaria recorrente apresentaram níveis mais elevados de IL-6, IL-10 e IL-4 que os indivíduos com a infecção primária. Costa et al. (2014) em seu estudo realizado numa área endêmica do estado do Amazonas, avaliaram a produção de citocinas frente à infecção pelo *P. vivax* e demonstraram níveis séricos elevados de IL-6, bem como IL-10, e a sua associação com o aumento da parasitemia.

1.3.4. INTERLEUCINA 10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida tardiamente por células Th2, células T $CD8^+$, monócitos e linfócitos B ativados. Em processos infecciosos causados por *P. falciparum*, ocorre um aumento na produção de IL-10 quando a parasitemia está elevada (Nussenblatt et al., 2001). Em virtude da sua capacidade de inibir a produção de citocinas, a IL-10 regula a produção de importantes citocinas, como IFN-γ e IL-12 (Prakash et al., 2006).

Na infecção pelo *P. vivax*, estudos têm demonstrado associação da IL-10 com sinais clínicos e carga parasitária, como o estudo realizado na Turquia que demonstrou que a carga parasitária elevada esteve associada com níveis

aumentados de IL-10 e IL-12 e níveis elevados de IL-6 e IL-10 também foram relacionados com quadros febris da doença (Zeyrek et al., 2006). Seoh et al. (2003) demonstraram em seu estudo realizado na Coreia do Sul, que indivíduos com infecção pelo *P. vivax* e hiperpirexia apresentavam níveis séricos elevados de IL-6, IFN-γ e IL-10 e este aumento da IL-10 foi explicado ser um balanço da resposta imune de ambas citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IFN-γ).

No Brasil, um estudo realizado na região Amazônica (Belém e Paragominas) demonstrou que indivíduos infectados por *P. vivax* os níveis séricos da citocina IL-10 estavam significativamente elevados, enquanto que em indivíduos infectados por *P. falciparum* os níveis dessa citocina foram baixos. Também foi demonstrado que indivíduos anêmicos infectados por *P. falciparum* apresentaram níveis elevados de IL-12 e IL-10, enquanto que os indivíduos não anêmicos apresentaram níveis elevados de TNF-α. Entretanto, nenhuma correlação foi observada entre os níveis das citocinas e a anemia em indivíduos infectados por *P. vivax* (Fernandes et al., 2008).

Outro estudo realizado com indivíduos de Belém demonstrou associação entre a carga parasitária e os níveis séricos da citocina IL-10 e embora tenha sido observado que no grupo de primo-infectados com *P. vivax* a concentração de IL-10 tenha sido maior que nos grupos de indivíduos que relataram exposição recorrente, essa diferença não foi significativa, sugerindo que a reexposição ao *P. vivax* não influenciou na produção de IL-10, nesta população em estudo (Medina et al., 2011).

1.4. POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS

Os marcadores genéticos, como os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), são uma ferramenta valiosa para avaliar o risco e progressão das doenças infecciosas (Faik et al., 2009). Os SNPs nas regiões reguladoras dos genes de citocinas são amplamente distribuídos em muitas populações e podem afetar a transcrição dessas proteínas bem como no seu nível de produção (Visentainer et al., 2008).

Uma vez que a população brasileira compõe um grupo geneticamente heterogêneo (Carvalho-Silva et al., 2001) e a distribuição dos SNPs nos genes não ocorre de maneira homogênea e depende da área estudada (Furini et al., 2016a),

um número cada vez maior de estudos vem objetivando identificar os SNPs localizados em regiões reguladoras dos genes, bem como de que forma eles podem influenciar na susceptibilidade ou na evolução de uma determinada doença (Feitosa et al., 2016; Cassiano et al., 2015; Freitas et al., 2015; Queiroz et al., 2012).

1.4.1. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA TNF-α

O gene da citocina TNF-α está localizado na região 6p21.3 do cromossomo 6, apresenta comprimento de aproximadamente 3 kilobase (Kb) e contem quatro éxons (Nedwin et al., 1985). Vários SNPs já foram descritos na região promotora deste gene, sendo os três mais comuns localizados nas posições *TNFA*-308G>A, *TNFA*-238G>A e *TNFA*-376G>A, caracterizados pela mudança de uma guanina (G) por uma adenina (A), interferindo na ligação de fatores de transcrição, que afetam a expressão do gene e implicando em maiores ou menores níveis plasmáticos de TNF-α (Hajeer e Hutchinson, 2001).

Recente estudo realizado na República do Congo, com 310 indivíduos, observou associação dos SNPs *TNFA*-308G>A, *TNFA*-244G>A e *TNFA*-238G>A com a parasitemia alta e a malária não complicada na infecção pelo *P. falciparum*. Eles observaram também associação positiva entre o alelo -244**A* e -238**A* e a parasitemia (Nguyen et al., 2017). Outro estudo recente realizado na Nigéria, com 782 crianças, demonstrou associação significativa do SNP *TNFA*-238G>A com susceptibilidade a malária grave. Indivíduos com quadro assintomático e com malária não complicada, que tinham o genótipo TNF-238*GG*, tiveram maior risco de desenvolver malária cerebral. Contudo, não foram observadas associações significativas entre o SNP *TNFA*-308G>A e a infecção pelo *P. falciparum* (Olaniyan et al., 2016).

No Brasil, também têm sido demonstradas associações entre esses SNPs e a infecção pelo *P. vivax*. Um estudo recente realizado no município de Goianésia do Pará com 141 indivíduos, descreveu a frequência alélica dos três SNPs, *TNFA*-308G>A, *TNFA*-238G>A e *TNFA* -1031T>C e nenhum deles foi associado com a malária causada pelo *P. vivax* (Furini et al., 2016a). Sortica et al. (2012) demonstraram em seu estudo realizado com a população de Belém, que o haplótipo *TATGG* formado pelos SNPs no gene do *TNFA* na posições -1031/-863/-857/-308/-

238 foi associado a infecção pelo *P. vivax*. Mendonça et al (2014) analisaram a população de Rondônia e descreveram a frequência do SNP *TNFA*-308G>A em indivíduos não infectados com *P. vivax* (2,60%), em indivíduos infectados assintomáticos (0,96%) e em indivíduos com malária não complicada (1,32%), contudo não observaram associação entre o SNP e a susceptibilidade a malária.

1.4.2. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IFN-γ

IFN-γ atua como uma citocina reguladora da apresentação de antígenos, proliferação, diferenciação dos linfócitos e desempenha um papel modulador na resposta imune a citocinas anti-inflamatórias (McCall e Sauerwein, 2010). O IFN-γ humano é codificado por um único gene contendo quatro éxons e três íntrons, localizado na região 12q24.1 do cromossomo 12 (Trent et al., 1982). O fator nuclear kappa beta (NF-κB) desempenha um papel crucial nas respostas imunes e inflamatórias, através da regulação de vários genes envolvidos na síntese de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, enzimas induzíveis e apoptose (Tripathi e Aggarwal, 2006). O promotor e as regiões intrônicas provavelmente interagem na sinalização extracelular, resultando na ativação do NF-κB promovendo a transcrição do *IFNG* (MacMurray et al., 2014).

O SNP *IFNG*+874T>A está localizado na região de ligação do NF-κB o que influencia na transcrição do gene e consequentemente produção da citocina IFN-γ (Pravica et al., 2000). Medina et al. (2011) em seu estudo na população de Belém, observaram que a concentração sérica do IFN-γ foi menor nos indivíduos que apresentaram genótipo *IFNG*+874*AA* em comparação aqueles que tinham o alelo +874**T.* Apesar dessa diferença, nenhuma associação foi observada entre os genótipos e a carga parasitária indicando que este SNP *IFNG*+874T>A não afeta a parasitemia na malária vivax, nesta população.

O estudo em Goianésia do Pará demonstrou a frequência do alelo mutante +874**A* (67,3%) (Furini et al., 2016a) semelhante àquelas observadas em outros estudos na população da região Amazônica (Medina et al., 2011; Pereira et al., 2015). Em seu outro estudo analisando a influência dos SNPs na produção de anticorpos contra proteínas de superfície do *P. vivax,* Furini et al. (2016b), demonstraram que o alelo +874**T* estava associado a maior produção de

anticorpos IgG, bem como os indivíduos que apresentaram genótipo +874*TT* em comparação aos outros genótipos, porém, essas diferenças não foram significantes.

O SNP *IFNG*+874T>A também é alvo de pesquisas com outras doenças. Estudo anterior realizado com 318 indivíduos no estado do Pará observou que o alelo mutante +874**A* foi mais frequente em pacientes infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, sugerindo que a presença do alelo predispõe a tuberculose (Vallinoto et al., 2010). Conde et al. (2013) em seu estudo realizado com indivíduos de Belém, analisaram a presença do SNP +874T>A em pacientes com hepatite B crônica. Os resultados demonstraram que o alelo mutante +874**A* foi frequente tanto nos indivíduos saudáveis quanto nos que tinham hepatite B e, portanto, nenhuma associação foi observada quanto ao risco de infecção crônica pelo vírus. Dois estudos de meta-analise estratificado por etnia (Asiáticos e Caucasianos), demonstraram associação com o SNP +874T>A e o maior o risco de desenvolver leucemia (Wu et al., 2016), e doenças relacionadas ao vírus da hepatite B, especialmente doenças hepáticas (Su et al., 2015), em Asiáticos.

1.4.3. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IL-6

Outra citocina que participa da resposta imune a malária é a IL-6. Esta citocina é secretada pelas células endoteliais e em resposta aos antígenos apresentados em resposta à infecção pelo *P. vivax*. Os níveis séricos da IL-6 são elevados nesta infecção, sugerindo que esta citocina tem um efeito importante no controle da parasitemia (Seoh et al., 2003). O gene que codifica esta citocina está localizado na região 7p15.3 do cromossomo 7. Trabalhos recentes têm demonstrado que o SNP na posição -174G>C, onde há troca de base G para C (citosina), está associado a várias condições clínicas como sepse (Lorente et al., 2016), diabetes tipo II (Lu et al., 2017) e síndrome mielodisplásica (grupo de doenças hematológicas) (Bestach et al., 2017).

Na malária, esta citocina é um importante mediador na fase aguda da doença (Clark e Chaudhri, 1988). Em um estudo realizado no estado do Mato Grosso, que analisou pacientes sintomáticos infectados com *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie* e infecções mistas, não observou associação entre o SNP *IL6*-174G>C e os

sintomas da malária (Domingues et al., 2016). Sortica et al. (2014), em seu estudo realizado na população de Belém, analisaram o nível de parasitemia e número de gametócitos em 167 pacientes infectados com *P. vivax*. Os autores demonstraram que o genótipo -174*GG* estava associado a altos níveis de IL-6 (quase o dobro) em comparação com o genótipo -174*CC*, sugerindo um efeito supressor do alelo C sobre a produção de IL-6. Além disto, demonstrou também que os pacientes portadores do alelo -174**C* apresentaram maior parasitemia e maior gravidade clínica da malária. Os autores justificam que a troca de base de G para C demonstra claramente ausência de controle da infecção e agravamento do quadro clínico, demonstrando a importância do papel deste polimorfismo na malaria vivax.

Mendonça et al. (2014) em seu estudo realizado Rondônia, contudo, não demonstraram associação do SNP *IL6*-174*G>C* com os grupos clínicos estudados (indivíduos não infectados, indivíduos infectados assintomáticos e indivíduos com malária não complicada) na infecção pelo *P. vivax.* Isto demonstra que os SNPs apresentam diferentes papéis na malária vivax, dependendo da área endêmica em estudo.

1.4.4. POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA IL-10

Os diferentes polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 demonstraram influenciar a susceptibilidade e o curso de várias doenças (Adedoja et al., 2018; Manolova et al., 2018; Shahbazi et al., 2017). O gene *IL10* humano está localizado na região 1q31-32 do cromossomo 1, local geneticamente ligado à susceptibilidade a uma série de doenças. Os polimorfismos no gene da *IL10* foram identificados e incluem mais de 27 sítios polimórficos só na região promotora (Eskdale et al., 1998). Embora a maioria dos SNP esteja em desequilíbrio de ligação, ele é razoável supor que alguns podem desempenhar papéis biológicos na regulação da expressão da IL-10 (Iyer e Cheng, 2012).

Três SNP em particular foram relatados por desempenhar um importante papel causal na regulação da atividade do promotor do gene da IL-10. Estes SNPs situados nas posições -1082, -819 e -592 em relação ao local de início da tradução (Turner et al., 1997). As variantes -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação e, portanto, são herdadas em conjunto. Assim, existem três grandes haplótipos em -

1082, -819 e -592 (*GCC*, *ACC* e *ATA*), correspondendo a elevada, moderada e baixa produção de IL-10, respectivamente (Eskdale et al., 1998).

Medina et al. (2011) avaliaram amostras de 132 pacientes do estado do Pará diagnosticados com *P. vivax* e observaram que o genótipo mutante *IL10*-1082*AA* apresentou maior frequência na população estudada, porém sem associações com produção da IL-10. Furini et al. (2016a) em seu estudo com a população de Goianésia do Pará, avaliaram a presença dos SNPs *IL10*-592*C>A* e *IL10*-819*C>T* em indivíduos infectados com *P. vivax* e não observaram associação entre a frequência alélica e/ou genotípica com a susceptibilidade ou resistência a malária. Entretanto, outro estudo, no estado do Amazonas, revelou associação entre o polimorfismo *IL10*-1082A>G e indivíduos infectados as espécies de *Plasmodium* (*P. vivax* e/ou *P. falciparum*) e observou redução do risco a malária (Da Silva-Santos et al., 2012).

Outros estudos analisando a infecção pelo *P. falciparum* demonstram diferentes resultados. No Quênia demonstrou-se que os polimorfismos -1082A>G, -819 C>T e -592C>A estavam associados à redução dos níveis plasmáticos de IL-10 e ao desenvolvimento de anemia aguda em crianças com *P. falciparum* (Ouma et al., 2008). Wilson et al. (2005) demonstraram associação entre o haplótipo de cinco SNPs no gene IL10 (+4949*G*, +919*C*, -627*G*, -1117*C*, -3585*T*) e a resistência contra a malária cerebral e anemia grave em estudo realizado na Gâmbia, África Ocidental, com crianças infectadas com *P. falciparum*.

Essas variações de resultados demonstram que as populações humanas apresentam diferenças na susceptibilidade as doenças e a base dessa susceptibilidade diferencial é, em parte, determinada geneticamente (Bidwell et al., 2001; Hill, 2006). Associações significativas entre os polimorfismos e as doenças sustentam o papel inquestionável destes SNPs na resposta imune, que por sua vez influenciam o resultado do estabelecimento e evolução de uma doença.

1.5. VARIAÇÕES GENÉTICAS QUANTITATIVAS: CNVs

Os SNPs, polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs) e polimorfismos de proteínas são tipos de variação genética humana e muitas ferramentas atuais para a compreensão da evolução baseiam-se nestas variantes.

No entanto, pouco se sabe sobre o papel de outras formas de variação genética na adaptação humana, como as variações no número de cópias (CNVs). As CNVs são uma forma de variação estrutural definida pelo ganho ou perda de material genômico (Iafrate et al., 2004) e são comuns entre indivíduos saudáveis (Mills et al., 2011). Na verdade, duas pessoas serão diferentes em número de cópias em 0,78% de seus genomas em média (Conrad et al., 2010).

As CNVs podem potencialmente afetar a expressão dos genes de várias maneiras. Alguns exemplos são: aumentando a cópia de um gene (duplicações) que resulta em níveis aumentados de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (RNAm) e, consequentemente níveis aumentados de proteína; também podem criar novos genes pela fusão de dois genes (deleção); alterar a distância de um gene e o elemento regulador; ou alterar o número de éxons codificadores de proteína dentro de um gene (Hollox e Hoh, 2014) (Figura 4).

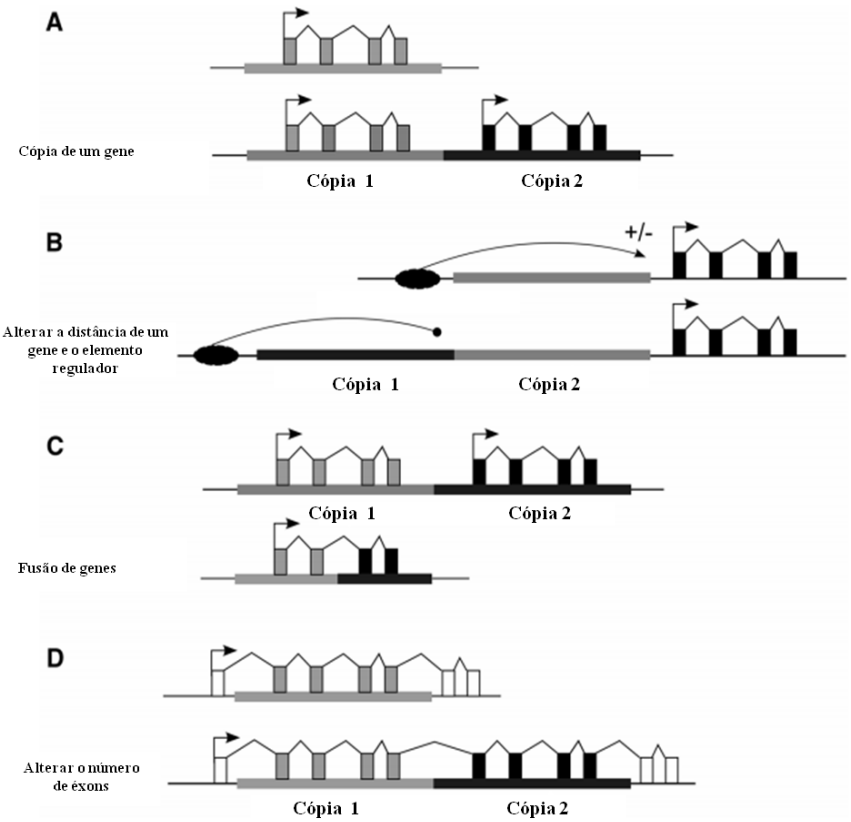

Figura 4: Os diferentes mecanismos da variação no número de cópias afetando a expressão de um gene. Fonte: Adaptado de Hollox e Hoh, 2014.

Os microarranjos de DNA, ou *microarrays*, vem sendo utilizados em estudos tanto de CNVs como de expressão gênica. Esta metodologia permite identificar CNVs a partir da seleção de genes de interesse e, de uma sequência, são desenhadas uma ou mais sondas (*probes*), que nada mais são do que moléculas de DNA de fita simples que servem para detectar a presença/expressão do gene alvo. As sondas são imobilizadas em lâminas, ou em chips, formando vários pontos, que ficam fixados formando um grupo sondas com uma mesma sequência gênica (Figura 5). Atualmente, em um chip tradicional pode-se encontrar representações de praticamente todos os genes do genoma de uma série de organismos, como de humanos, ratos, camundongos e *Drosophila melanogaster* (Guindalini e Tufik, 2007). A técnica se baseia na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucléicos e no fato das sondas apresentarem sequências similares às dos genes de interesse, e complementares às do DNA do genoma de interesse, ou ao cDNA, se for utilizado um array de análise de expressão (Dalma-Weiszhausz et al., 2006).

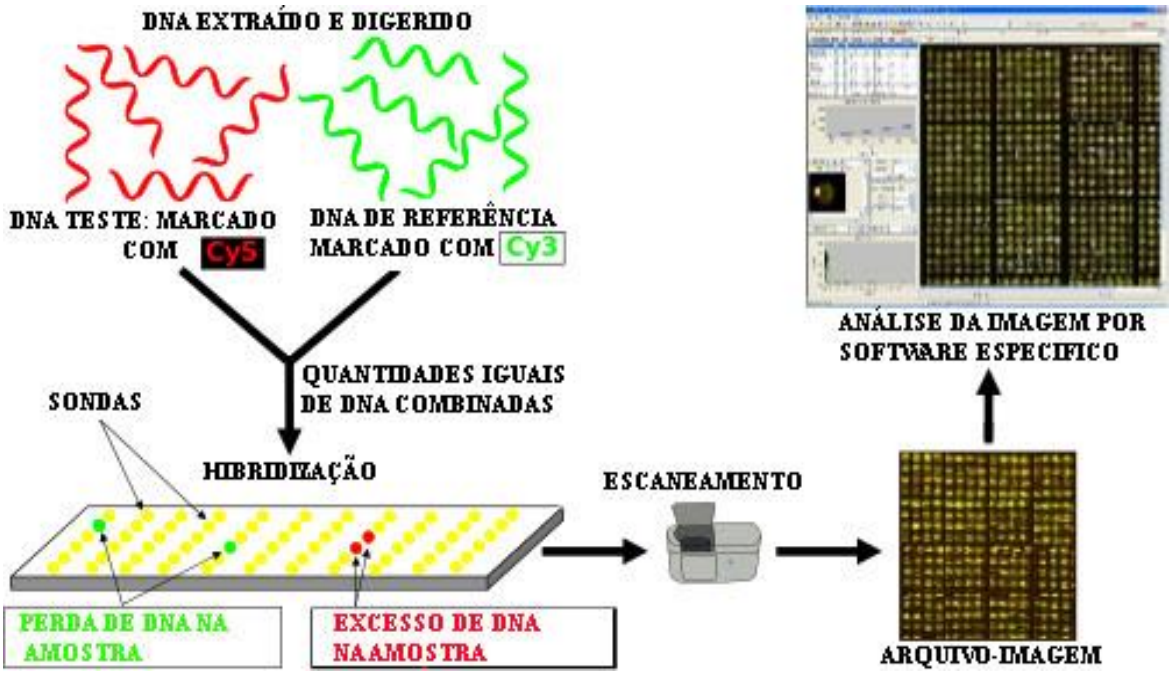

Figura 5: Diagrama da técnica de aCGH. O DNA de interesse (amostra) e o DNA de referência são marcados por fluorocromos diferentes e co-hibridizados em um microarranjo. Quantidades iguais de ambos os DNAs são representados por amarelo (normalidade), enquanto uma maior intensidade de vermelho ou verde significa ganho ou perda de segmentos no DNA da amostra em relação ao DNA de referência. Fonte: Primária.

A grande maioria dos estudos utilizando *microarrays* vem sendo aplicada na demonstração de padrões específicos de variação no número de cópias ou de expressão gênica que caracterizam diferentes tipos de câncer, prediz prognóstico e até respostas a terapias específicas (Ren et al., 2018; Kumar et al., 2017; Araújo et al., 2016). Entretanto, a eficiência dessas análises tem sido evidenciada em diversas áreas, como demonstrado por um estudo recente realizado em pacientes com esquizofrenia no Canadá, de descendência Europeia, que investigou as CNVs que poderiam estar associadas ao risco clínico da doença. Os resultados revelaram que 7,1% dos indivíduos tiveram alguma CNV detectada e identificaram, também, uma deleção de 280kb na região 3p26.1do cromossomo 3, que sobrepõe os genes *SUMF1* e *ITPR1* em um participante com esquizofrenia que não foi relatado anteriormente na literatura (Lowther et al., 2017). Cheng et al. (2017) detectaram 41 genes diferencialmente expressos em pacientes com infarto agudo no miocárdio, e que, portanto, foram sugeridos como fator que predispõe a doença.

Somando-se a isto, estudos vêm sendo realizados a fim de identificar CNVs que contribuem para a susceptibilidade do hospedeiro a doenças infecciosas. Por serem multifatoriais, ou seja, com variação genética e ambiental contribuindo para diferentes susceptibilidades e/ou resistências às infecções (Chapman e Hill, 2012), os estudos de associação genômica têm tido sucesso limitado na identificação de alelos que afetam a susceptibilidade a essas doenças. Fatores como tamanho amostral e heterogeneidade dentro de uma mesma população, são os principais pontos que podem inferir no resultado de estudos que investigam susceptibilidade genética a infecções (Furini et al., 2016a; Hoffmann et al., 2002).

1.5.1. VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E AS DOENÇAS INFECCIOSAS

As CNVs são causadas por alterações no DNA que resultam em alterações no número de cópias de um segmento de DNA específico maior do que 1 kb. A localização do gene codificador de uma proteína dentro da região da CNV (que é frequentemente observada em humanos) pode afetar a dosagem e/ou a estrutura desse gene. Consequentemente, as CNVs podem influenciar significativamente os fenótipos e contribuir para a variação individual na resposta a fármacos, resposta

imune, resistência a doenças ou susceptibilidade (Conrad et al., 2010; Stankiewicz e Lupski, 2010).

Um excelente exemplo de variação genética e o papel importante que exerce em vários fenótipos clínicos são relacionados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) e a susceptibilidade a infecção, o tempo até o desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e os níveis de carga viral em latência clínica (Shea et al., 2013).

Neste tema, vários estudos relataram que as CNVs detectadas no gene da proteína inflamatória de macrófago-1α (MIP-1α/CCL3L1) está fortemente ligada à susceptibilidade ao HIV-1 e a redução no número de cópias da *CCL3L1* na população está associado ao aumento do risco de infecção pelo HIV-1 (Kuhn et al., 2007; Shostakovich-Koretskaya et al., 2009; Huik et al., 2010). Um estudo de meta-análise analisou nove estudos com 2434 casos e 4029 controles. Os resultados mostraram que indivíduos com menor número de cópias do gene da *CCL3L1* na população ancestral geográfica seriam mais suscetíveis à infecção pelo HIV-1 (Liu et al., 2010).

Outro estudo realizado por Pelak et al. (2011) avaliou CNVs localizadas na região do gene que codifica os receptores expressos na superfície dessas células NK (KIRs). A CNV localizada na região genômica que codifica esses receptores afetam especificamente os genes *KIR3DS1* e *KIR3DL1*, que codificam dois tipos de receptores KIR que interagem com o antígeno leucocitário humano B (HLA-B). O estudo demonstrou que o aumento no número de cópias do gene *KIR3DS1*, bem como o aumento do número de cópias do gene *KIR3DL1* na presença do gene *KIR3DS1*, esteve associado à menor carga viral em indivíduos com ascendência Europeia, assim como o aumento no número de cópias.

Muitos estudos também apoiam a ideia de que a susceptibilidade genética do hospedeiro desempenha um papel importante na determinação do resultado da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB). Um recente estudo, com chineses, investigou as CNVs do receptor TLR-7 e a sua associação com a susceptibilidade à infecção crônica pelo VHB e demonstrou que o número reduzido de cópias *TLR*7 é um fator de risco para infecção crônica pelo VHB, mas não está associado a etapas posteriores da progressão da doença (cirrose e câncer) (Li et al., 2017).

Budzko et al. (2016) analisaram 421 genes humanos que codificam proteínas que interagem com as proteínas de vírus da hepatite C (VHC) ou com o RNA genômico e demonstram que 19 dos 421 genes candidatos estão localizados em regiões com CNVs. Para todos esses genes, os números de cópias foram determinados para populações Europeias, Asiáticas e Africanas. Dos 19 genes, os autores demonstram que 4, *IGLL1*, *MLLT*4, *PDPK1*e *PPP1R13L,* para os quais o número de cópias variou de 1 a 6, estão envolvidos na interação hospedeiro-vírus, identificando assim novos fatores genéticos que podem ser alvo de investigações futuras.

1.5.2. VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E A MALÁRIA

Uma melhor compreensão dos fatores associados à imunidade e à proteção contra a malária pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas e outras terapias. É amplamente reconhecido que a malária exerceu uma forte seleção genética no genoma humano (Kwiatkowski et al., 2015) e desde a primeira hipótese proposta por Haldane em 1940, de que as mutações que levavam ao traço da célula falciforme (hemoglobina S), nas populações do sul da Europa e da África, ocasionaram à proteção contra a malária, o estudo das CNVs em associação com a infecção vem sendo explorado (Gonçalves et al., 2017; Deng et al., 2017; Sepúlveda et al., 2017).

Um exemplo bem conhecido de CNVs afetando a susceptibilidade a malária é a dos genes de uma proteína chamada α-globina. A molécula da hemoglobina é uma proteína globular composta por quatro globinas associadas a grupos heme, complexo formado por um átomo de ferro em uma estrutura porfirinica. As subunidades da hemoglobina (α-globina e β-globina) são codificadas por um pequeno grupo de genes que são expressos sequencialmente durante o desenvolvimento. Os genes *HBA1*(α^1) e *HBA2* (α^2) fornecem instruções para produzir α-globina. Estes dois genes estão localizados próximos entre si na região 16p13.3 no braço curto do cromossomo 16, conhecido como locus de α-globina (Antonarakis et al., 1985). Nos seres humanos, os genes α^1 e α^2 são duplicados e, dessa forma, um indivíduo normal possui quatro genes α ativos, dois em cada cromossomo (α^1 α^2 / α^1 α^2) (Higgs et al., 1989). Os homozigotos para os alelos de

deleção da α-globina (duas cópias por genoma diploide) têm α+-talassemia e os indivíduos com uma ou duas cópias de duplicações apresentam-se sem fenótipo clínico (Harteveld e Higgs 2010).

Outro enforque dado para a investigação das CNVs é em relação à interação parasito-hospedeiro. Os parasitas da malária estão expostos a uma forte seleção da resposta imune humana e ao tratamento com medicamentos antimaláricos. Eles têm genomas relativamente pequenos 23 megabases (Mb), genética haplóide, e podem ser cultivados e geneticamente manipulados no laboratório, de modo a fornecer um organismo eucariota útil para investigar o papel funcional das CNVs (Carlton, 2003). No Brasil, um recente estudo caracterizou o perfil genético de ambos os marcadores nos genes mais comuns associados à resistência aos fármacos em isolados de *P. falciparum* e *P. vivax*, com amostras de três regiões do Brasil (Mato Grosso, Rondônia e Amapá). Todas as amostras analisadas de *P. falciparum* apresentaram apenas uma cópia dos genes *pfmdr1* ou *pfgch1*. Para os isolados de *P. vivax* foi encontrada múltiplas cópias do gene *pvmdr1* em 20% dos isolados, porém não houve associação com a parasitemia ou idade (Costa et al., 2017).

Considerando que a perspectiva parasitária da malária tem sido intensamente investigada, especialmente no que diz respeito à resposta e resistência a fármacos, o lado do hospedeiro recebeu até agora menos atenção. O estudo das CNVs em genes humanos relacionados à doença poderia explicar algumas das discrepâncias entre os estudos de associação genética (Geraghty et al., 2002), uma vez que alguns dos genes candidatos identificados ocorrem como cópias múltiplas. Além disto, até o momento, para muitos genes relacionados à função imune, ainda não se obteve resultados claros e uniformes (Van Braeckel-Budimir et al., 2017; Wilson et al., 2016; Mwakalinga et al., 2012). Portanto, uma análise conjunta das CNVs e dos SNPs pode esclarecer a genética da interação hospedeiro-parasita durante a patogênese da malária e dar uma resposta clara sobre a questão de qual SNP ou CNV influenciam a expressão gênica em uma população e como essa população lida com a doença.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar se as alterações genômicas quantitativas e os polimorfismos de nucleotídeos únicos nos genes *TNFA* (*rs1800629*), *IFNG* (*rs2430561*), *IL6*(*rs1800795*) e *IL10* (*rs1800896*, *rs1800871, rs1800872*) associados à produção de citocinas podem influenciar na fisiopatogenia da malária *vivax*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar os parâmetros hematológicos e demográficos na população em estudo e identificar as associações recorrentes entre estes parâmetros e o número de episódios de malária;
- Estimar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs *TNFA*-308G>A, *IFNG*+874T>A, *IL6*-174G>C e do haplótipo-1082/-592/-819 no gene *IL10*;
- Comparar os níveis de expressão das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 nos pacientes e nos controles endêmicos;
- Identificar as associações entre os níveis das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-10 e os SNPs *TNFA*-308G>A, *IFNG*+874T>A, *IL6*-174G>C e o haplótipo -1082/-592/-819 no gene *IL10* nas amostras investigadas;
- Identificar as associações entre os níveis das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 e a carga parasitária nas amostras investigadas;
- Identificar as associações entre os SNPs *TNFA*-308G>A, *IFNG*+874T>A, *IL6*-174G>C e do haplótipo -1082/-592/-819 no gene *IL10* e a carga parasitária nas amostras investigadas;
- Identificar as associações entre o número de episódios de malária e os níveis das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10;
- Determinar a frequência das CNVs na população em estudo e analisar sua correlação com a infecção pelo *P. vivax*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

Estudo transversal foi realizado a partir de amostras do município de Itaituba (04º16'34'' S; 55º59'01'' W), pertencente ao Estado do Pará, norte do Brasil (Figura 6). O município está localizado na parte mais sudoeste do estado e possui IPA de alto risco para transmissão de malária (102,0 casos de malária/1.000 habitantes). Itaituba possui uma população de 98.485 habitantes de acordo a estimativa do censo 2016, uma área da unidade territorial (km²) segundo censo de 2015 de 62.042,320 e a densidade demográfica (habitantes/km²) de 1,57. A cidade é o décimo quinto município mais populoso do estado, possuindo o décimo terceiro maior produto interno bruto do Pará e é conhecido como “cidade pepita” devido à intensa atividade de mineração de ouro no Vale do Rio Tapajós (Brasil, 2016).

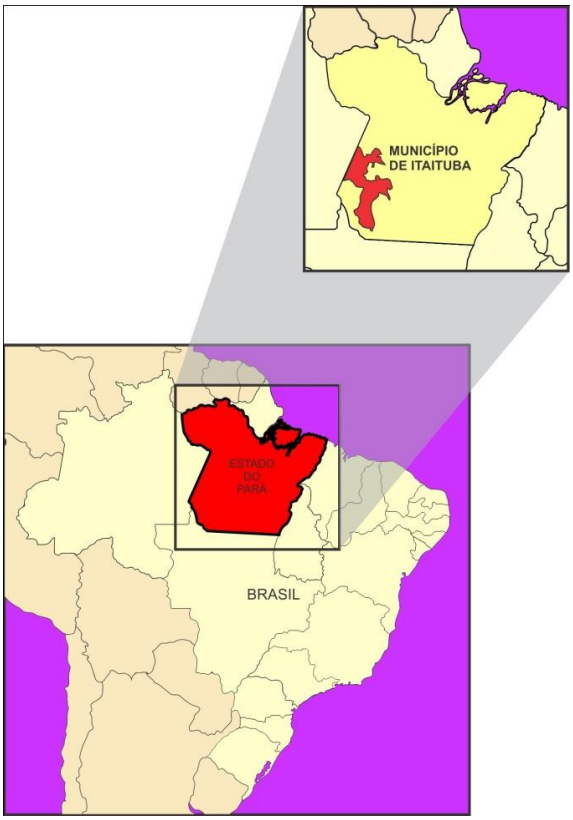

Figura 6: Esquema representativo do município de Itaituba: Área do Estudo. Fonte: Laboratório de geoprocessamento, Instituto Evandro Chagas (IEC).

O clima de Itaituba é quente e úmido, com temperatura superior a dezoito graus em todos os meses do ano e chuvas abundantes durante a maior parte do ano, com uma pequena estação seca, geralmente nos meses de inverno. A

temperatura média anual é de 26,7 ºC, sendo que a média do mês mais quente, outubro, é de 27,7 ºC, e a do mês frio, fevereiro, de 25,7 ºC. A precipitação média anual é de 2.189,2 milímetros, sendo que março é o mês mais chuvoso (327,3 milímetros) e julho o mais seco (46,1 milímetros). O tempo médio de insolação é de 2.000 horas por ano e a umidade do ar é relativamente elevada em todos os meses do ano, com médias acima de 80% (Brasil, 2016).

Na cidade de Itaituba circulam moradores, visitantes, comerciantes e garimpeiros. Em decorrência dos mais de 240 garimpos e acampamentos agregados ao município, apresenta um fluxo populacional intenso, com movimento frequência de catraias, barcos e lanchas que transportam passageiros de um lado para outro, numa relação que envolve comércio, turismo, vida social e compras, mas, que também favorece a disseminação de doenças transmissíveis. Atualmente o município oferece a maior casuística de malária do Estado do Pará e no ano de 2016 foram registrados 1.645 casos de malária, sendo 1.204 casos por *P. vivax*, 393 casos por *P. falciparum* e 48 notificações de infecções mistas por estas duas espécies (Brasil, 2016).

A seleção dos pacientes foi realizada a partir do atendimento dos mesmos no principal Posto de Notificação de Malária do município, localizado no Hospital Regional do Tapajós, no período de janeiro a dezembro de 2016. Os pacientes atendidos no posto eram convidados a participar do estudo por meio de uma ficha clínico-epidemiológica (Anexo I) e assinavam junto a ele um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

Foram excluídos do estudo pacientes com doença crônica/neurodegenerativa, com coinfecções com geohelmintos, grávidas e indivíduos com infecções mistas (com mais de uma espécie de *Plasmodium*) e dos 288 pacientes atendidos, foram incluídos no estudo 129, sendo: 79 pacientes não maláricos, referidos no estudo como “controle endêmico” e 50 pacientes positivos para *P. vivax*, referidos como “malárico”, sendo que destes: 15 eram pacientes com infecção primária a malária, referidos como “malária primária” e 35 pacientes com relatos de episódios anteriores a infecção nos últimos anos, referidos como “malária recorrente”. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do IEC, Pará. Nº CEP/IEC 1.219.346/2015.

3.2. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

A pesquisa de parasitos foi realizada por microscopistas especializados do IEC, por meio do exame parasitoscópico, pela técnica da gota espessa (GE). Uma amostra de sangue foi obtida pela punção da polpa digital do paciente. As preparações sanguíneas foram coradas pelo Método de Walker, utilizando-se o corante Giemsa. A leitura foi realizada em microscópio ótico, determinando-se o número de parasitos por mm^3 de sangue. As amostras positivas foram confirmadas por Nested-PCR (Snounou et al., 1993), antes dos pacientes iniciarem o tratamento. A papa de hemácias e o soro estavam armazenados em tubo *eppendorf* a -70ºC.

Com os dados da parasitemia disponíveis das 50 amostras positivas, a média de parasitos foi de 10.910,40 parasitos/mm^3, sendo no grupo malária primária foi de 7.585 parasitos/mm^3 e no grupo malária recorrente foi 12.335 parasitos/mm^3. Todos os pacientes diagnosticados foram tratados segundo o Regime Terapêutico Brasileiro com cloroquina por 3 dias e primaquina de por 7 a 14 dias (Brasil, 2010).

3.3. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

As contagens e a interpretação dos resultados de células sanguíneas foram realizadas em um analizador automático Pentra 120 Retic (ABX Diagnostics®), conforme instruções do fabricante, para avaliação dos seguintes parâmetros hematológicos: contagem de eritrócitos (homem 4.5 – 6.5 x 10^6/µL; mulher 3.9 – 5.6 x 10^6/µL), hemoglobina (homem≥ 13 g/dL; mulher ≥ 12g/dL), hematócrito (homem 38 – 50%;mulher 36 – 47%), leucócitos (valor normal 4 – 10 x 10^3/µL), linfócitos (valor normal 1 – 3.8 x 10^3/µL), neutrófilos(valor normal 1.5 – 6.8 x 10^3/µL), monócitos (valor normal 200 – 800/µL), eosinófilos (valor normal 40 – 400/µL) e plaquetas (valor normal 150 – 400 x 10^3/µL).

3.4. DOSAGEM DE CITOCINAS

A técnica de citometria de fluxo avaliou a expressão das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10, a partir dos soros dos pacientes e indivíduos não maláricos do município do Itaituba/PA, segundo protocolo descrito por Kellar e Douglass (2003).

Para tanto, foram utilizados os kits *Cytometric Bead Array* (CBA) *Human TNF-α Flex Set*, *Human IFN-γ Flex set*, *Human IL-6 Flex Set* e *Human IL-10 Flex Set* (BD Biosciences, USA) e as etapas realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Foram analisados 25µL das amostras por citômetro de fluxo FACsCanto™ II (Becton Dickinson, San José, CA, EUA), previamente calibrado com "Setup beads", incubadas com isotiocianato de fluoresceína e ficoeritrina. A curva padrão foi realizada para cada citocina e analisada no FACSDiva Software (Becton Dickinson, San José, CA, EUA). Para cada citocina foram quantificados os valores brutos de média de intensidade de fluorescência. Os resultados foram expressos em pg/mL em comparação com a curva padrão. Foram considerados 300 eventos para cada citocina.

3.5. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir das amostras de sangue total utilizando o kit de extração/purificação Easy DNA™ (Invitrogen, Califórnia, USA) e as etapas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Em 280µL de sangue foram adicionados 450 µL de solução de lise (Solução A) e a mistura homogeneizada no agitador. Após incubação a 65ºC por seis minutos em banho-maria, foram adicionados 650µL de clorofórmio. Realizou-se homogeneização em agitador até a mistura apresentar coloração "achocolatada". Em seguida, adicionaram-se 150µL de solução de precipitação (Solução B) e homogeneizou-se no agitador até a mistura ficar homogênea. Realizou-se a centrifugação da amostra a 20.000g por dez minutos e transferência do sobrenadante para micro tubo de 1,5µL. Foi então adicionado 1mL de etanol 100% gelado e a mistura foi homogeneizada por inversões suaves e deixada por dez minutos a temperatura ambiente. Após isto, a mistura foi centrifugada a 20.000g por cinco minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e adicionou-se 1mL de etanol 70% gelado. Após a nova centrifugação a 20.000g por dois minutos, o sobrenadante foi removido por inversão e deixou-se o tubo secando em temperatura ambiente antes de ressuspender o DNA em 100 µL de água livre de nucleasse. A quantidade e a pureza do DNA foram verificadas após eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.6. GENOTIPAGEM

Os SNPs para *TNFA* -308G>A, *IFNG* +874T>A, *IL6* -174G>C e *IL10* -1082A>G, -819C>T e -592C>A foram identificados utilizando a técnica de genotipagem pela reação em cadeira da polimerase (PCR) utilizando sequência de *primers* específicos (SSP) determinados pelo kit Cytgen (OneLambda; Canoga Park, CA) e as etapas realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti^{TM} (Applied Biosystems, USA), usando Taq polimerase (5UI/mL). Condições do ciclo: um ciclo de 96º (130 segundos) e um de 63º (60 segundos); seguido de nove ciclos de 96º (10 segundos) e de 59º (50 segundos); e por fim vinte ciclos de 96º (10 segundos), 59º (50 segundos) e 72º (30 segundos). A interpretação do resultado foi realizada seguindo *worksheet* do kit (Anexo III).

3.7. HIBRIDIZAÇÃO GENOMICA COMPARATIVA EM ARRAY (aCGH)

Com o intuito de analisar a ocorrência de alterações no número de cópias que pudessem envolver genes relacionados com a suscetibilidade à malária, seis pacientes positivos para malária e dois negativos foram analisados pela tecnologia de aCGH. Para isso, foi utilizada a matriz SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Array Bundle, 4x180K (Agilent Technologies, CA, USA). Essa matriz contém cerca de 120.000 sondas para identificação de CNVs e 60.000 SNPs. Os procedimentos da técnica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

3.7.1. DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO DNA GENÔMICO (gDNA)

O gDNA extraído foi concentrado a 1µg em 20,2µl de água ultra-pura, posteriormente exposto a ação das enzimas *Alu I* e *Rsa I* para a formação de fragmentos de 200 a 500pb. Esta etapa também foi realizada com o gDNA de referência (Human Reference DNA Male ou Female, Agilent Technologies, CA, USA), disponibilizado no kit *SureTag Complete DNA Labeling*: Em cada tubo contendo o gDNA diluído, foi adicionado 5,8µL do *Digestion Master Mix*, composto de água ultra-pura, tampão de Restrição Enzimática 10X, albumina bovina e das enzimas *Alu I* e *Rsa I*. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas e logo em seguida a 65ºC, por 20 minutos.

3.7.2. MARCAÇÃO DOS gDNA

Para a marcação dos gDNAs foi utilizado o corante fluorescente *Cy5-dUTP* para as amostras a serem avaliadas e *Cy3-dUTP* para o gDNA de referência. Para isto foram adicionados 5µL de um *primer* randômico à mistura. Os tubos contendo o gDNA foram incubados a 95°C por 3 minutos, e depois em gelo por 5 minutos.

Posteriormente foram acrescentados 21µL do Labeling Master Mix, composto por água ultra-pura, Tampão de Reativação 5x, 10x dNTPs (nucleotídeos do DNA), *Cy3-dUTP* ou *Cy5-dUTP* e Exo-Klenow (uma DNA polimerase). Logo após, as misturas foram incubadas a 37^0C por 2 horas, e posteriormente a 65^0C, durante 10 minutos.

3.7.3. PURIFICAÇÃO DOS gDNA

Após a marcação, o material foi purificado. Para isto, 430µL de 1x do tampão TE (pH 8.0) foram adicionados em cada amostra, estas foram transferidas para colunas de purificação para serem centrifugadas a 14000g por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e mais 480µL de 1x TE (pH 8.0) foram adicionados.

Após a segunda centrifugação, a coluna foi invertida em novo tubo coletor de 2mL e centrifugada a 1000xg para obtenção do material purificado. Este foi quantificado em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) para a medição das concentrações do gDNA e dos marcadores, que foram utilizados, junto com a medição do volume final da amostra, para a estipulação dos valores de atividade específica dos marcadores e rendimento do processo de marcação.

Estes valores indicaram o funcionamento das etapas anteriores e definiram a escolha dos pares de amostras (gDNA de referência e teste) que foram formados (os valores entre estes devem ser semelhantes).

3.7.4. PREPARAÇÃO PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO

Antes do processo de hibridização as amostras foram pré-tratadas com a adição de 71µL do *Hybridization Master Mix* (composto de tampão de hibridização, agente de bloqueio 10x concentrado e Cot-1 DNA) em cada amostra (gDNA de referência + gDNA da amostra testada).

Essa mistura foi incubada a 95ºC por 3 minutos e imediatamente transferida para um banho-maria a 37ºC, por 30 minutos. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 1 minuto a 6000g e então pronto para a hibridização. Após as etapas anteriores, o volume final da mistura foi de 110µL.

3.7.5. HIBRIDIZAÇÃO

O processo de hibridização seguiu as seguintes etapas: Em uma lamínula específica, foi adicionado 100µl da solução em cada um dos poços. A lâmina de *microarray* foi encaixada sobre a lamínula e o conjunto formado (lâmina e lamínula) foi fixado a uma base de fixação. Manualmente foi ajustada uma braçadeira para manter o conjunto bem fixado. O conjunto foi movido verticalmente para que o líquido se espalhasse uniformemente sobre cada *array* e para evitar a formação de possíveis bolhas de ar. O conjunto foi acoplado em uma câmara de hibridização e mantido a 65ºC por 24 horas, com uma rotação de 20rpm.

3.7.6. LAVAGEM DOS *MICROARRAYS*

A lavagem dos *microarrays* foi feita de forma a minimizar a exposição do gDNA marcado ao ozônio. Primeiramente, o conjunto lâmina/lamínula foi retirado da base de fixação e mergulhado em tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer* 1) para ajudar na dissociação. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo novamente tampão de lavagem 1 sob agitação com magneto, por 5 minutos. Tanto a dissociação como a primeira lavagem foram feitas à temperatura ambiente. As lâminas foram então transferidas para uma terceira cuba contendo o tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer* 2), em agitação com magneto, à temperatura de 37ºC. Finalmente, as lâminas foram cobertas com uma lamínula protetora de ozônio e encaixadas em um estojo para dar seguimento à etapa seguinte.

3.7.7. ESCANEAMENTO E EXTRAÇÃO DOS DADOS

Os estojos com os *microarrays* foram devidamente encaixados em cassetes do *Agilent Microarray Scanner* (PN G2565BA). O controle e obtenção das imagens foram feitos com o uso do *Feature Extraction software*, v10.10 qual extrai imagens com a extensão TIFF.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise da expressão das citocinas, o nível de significância foi obtido pela comparação entre as concentrações de citocinas dos pacientes e indivíduos não maláricos, assim como a análise de associação entre os SNPs e o haplótipo com a densidade e entre o nível das citocinas com os SNPs e com o haplótipo foram estimadas pelo teste não paramétrico U de *Mann-Whitney*; a análise de existência de correlação entre os níveis das citocinas e a carga parasitária foi estimada pelo teste não paramétrico de correlação de *Spearman*, utilizando o programa *Graph-pad prism* 6.0 (Grapgpad software, Inc, San Diego, CA); a análise de existência de correlação entre os grupos, controle endêmica, malária primária e malária recorrente, foi realizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de Dunn´s. Em todas as correlações, foram considerados estatisticamente significantes valores de $p< 0.05$.

Para análise dos polimorfismos, as frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os pacientes maláricos controle endêmico e as significâncias dos desvios foram verificadas a partir do teste-G e do teste do qui-quadrado de Pearson, respectivamente, bem como foi também testado se as frequências genotípicas obtidas diferem das esperadas segundo o teorema de Hardy e Weinberg, através do método de Guo e Thompson (1992), utilizando o programa Bioestat® versão 5.0. Em todas as correlações, foram considerados estatisticamente significantes valores de $p< 0.05$.

Os resultados das CNVs obtidos foram levantados em termos de frequência por simples contagem. Posteriormente foram avaliados quanto à existência de associação com os dados clínico-patológicos como sexo, parasitemia e recorrência da malária, a partir do teste Exato de Fisher utilizando o do programa Bioestat® versão 5.0. Em todas as correlações, foram considerados estatisticamente significantes valores de $p< 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS E O NÚMERO DE EPISÓDIOS DE MALÁRIA

Os parâmetros hematológicos e demográficos da população em estudo estão representados na tabela 1. Foi observado frequência maior de homens e idade média de 35,13 ± 13,23 e a análise dos dados não demonstrou diferenças significativas quanto à idade, contagem de hemácias, na concentração da hemoglobina, na porcentagem do volume dos glóbulos vermelhos (hematócrito), na porcentagem de linfócitos e de neutrófilos na população em estudo. Ambos os grupos, malária primária e malária recorrente, apresentaram redução significativa no número de plaquetas em comparação ao controle endêmico ($p < 0,001$) e no grupo malária recorrente observamos aumento significativo na porcentagem de monócitos ($p = 0,0158$).

Tabela 1: Parâmetros Demográficos e Hematológicos da população em estudo.

Parâmetros Hematológicos e Demográficos	Controle Endêmico (n=79)	Malária Primária (n=15)	Malária Recorrente (n=35)	*p* valor*
Idade (anos), Média (Desvio Padrão)	36,63 (14,50)	32,0 (12,14)	33,11 (10,11)	0,3722
Homem/Mulher (%)	59/41	80/20	74/26	
Carga Parasitária (parasitos/mm^3)	-	7.585	12.335	
Número de Episódios de Malária [a b]	-	-	3,0 (2,0-5,0)	
Parâmetros Hematológicos [b]				
Hemácias x $10^3/mm^3$	4.800 (4.495-5.280)	4.770 (4.450-5.425)	4.800 (4.265-5.145)	0,4163
Hemoglobina (g/dL)	14,3 (13,3-15,6)	13,30 (13,00-15,50)	14,0 (12,05-15,0)	0,1809
Hematócrito (%)	43,0 (40,0-47,0)	42,0 (38,0-45,3)	42,0 (36,4-45,0)	0,1368
Plaquetas x $10^3/mm^3$	199,0 (148,0-236,0)	94,0 (63,0-116,0) [c]	101,0 (78,0-139,5) [c]	< 0,001
Leucócitos x $10^3/mm^3$	5,7 (4,55-6,90)	4,2 (3,4-5,3) [c]	5,6 (4,05-6,90)	0,0074
Linfócitos (%)	38,0 (28,0-45,0)	34,0 (25,5-40,0)	30,0 (19,5-43,0)	0,0648
Monócitos (%)	2,0 (1,5-2,5)	2,0 (2,0-3,0)	3,0 (2,0-3,0) [c]	0,0158
Neutrófilos (%)	55,0 (47,0-67,5)	60,0 (53,0-69,0)	59,0 (47,5-72,0)	0,3116

a Os pacientes em estudo relataram o número de episódios anteriores de malária.
b Dados expressos como mediana and intervalo interquartil (IQR25-IQR75).
c Diferença significativa em comparação ao Controle Endêmico.
*Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's.

4.2. DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Como sumarizado na tabela 2 foram avaliados os SNPs *TNFA* -308G>A, *IFNG* +874T>A, *IL6* -174G>C, *IL10* -1082A>G, *IL10* -819C>T, *IL10* -592C>A e do haplótipo *IL10*-1082A>G, -819C>T e -592C>A na população em estudo e todos estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg ($p > 0,05$).

Para o SNP *TNFA* -308G>A, o genótipo mais frequente nos maláricos foi o *GG* (70%) e o alelo mais frequente foi o **G* (85%), assim como nos controles endêmicos foi de 81,01% e 89,87%, respectivamente, sem ter sido observado diferenças significativas entre os grupos.

Para o SNP *IFNG* +874 T>A, o genótipo mais frequente nos maláricos foi o *TA* (54%) e o alelo mais frequente foi o **A* (67%). No controle endêmico o genótipo mais frequente foi *AA* (51,90%) e o alelo mais frequente foi o **A* (72,78%).

Para o SNP *IL6* -174 G>C o genótipo mais frequente nos maláricos foi o *CG* (32%) e o alelo mais frequente foi o **G* (82%), assim como foi observado nos controles endêmicos foi de 59,50% e 77,21%, respectivamente.

Para o haplótipo da *IL10* -1082A>G, -819C>T e -592C>A o genótipo mais frequente nos maláricos foi o GCC/GCC (96%), assim como foi observado nos controles endêmicos (87,34%).

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica do SNP *TNFA* -308G>A, SNP *IFNG* +874T>A, SNP *IL6* -174 G>C, do haplótipo da *IL10* -1082 A>G, -819 C>T e -592 C>A, da população em estudo.

Genótipos e Alelos	Maláricos (%) n=50	Controles (%) n=79	p^a	OR (95% CI)	p^b
TNFA -308					
GG	35 (70)	64 (81,01)	0,1767	0,5469	0,2192
GA	15 (30)	14 (17,72)		(0,2395-1,2489)	
AA	0 (0)	01 (1,27)			
G	85 (85)	142 (89,87)	0,2408	0,6385	0,3288
A	15 (15)	16 (10,13)		(0,3004-1,3571)	
IFNG +874					
AA	20 (40)	41 (51,90)	0,3250	1,0880	0,9586
TA	27 (54)	32 (40,51)		(0,5349-2,2130)	
TT	03 (6)	06 (7,59)			
A	67 (67)	114 (72,78)	0,3783	0,7836	0,4584
T	33 (33)	44 (27,84)		(0,4553-1,3486)	
IL6 -174					
GG	33 (66)	47 (59,50)	0,5686	1,3217	0,5785
CG	16 (32)	28 (35,44)		(0,6320-2,7637)	
CC	01 (2)	04 (5,06)			
G	82 (82)	122 (77,21)	0,3543	1,3443	0,4452
C	18 (18)	36 (22,78)		(0,7151-2,5271)	
IL10 -1082/-819/-592					
GCC/ACC	01 (2)	06 (7,59)	0,1504	3,4783	0,1808
GCC/GCC	48(96)	69 (87,34)		(0,7293-16,5899)	
GCC/ATA	0 (0)	01 (1,27)			
ACC/ATA	0 (0)	03 (3,80)			
ATA/ATA	01 (2)	0 (0)			

p^a: Comparação entre os dois grupos (teste G e teste qui-quadrado, respectivamente); p^b: Odds radio.

4.3. EXPRESSÃO DAS CITOCINAS

Com a finalidade de avaliar a participação das citocinas na resposta imune à infecção pelo *P. vivax* avaliou-se as concentrações das mesmas entre os grupos maláricos e controle endêmico (Figura 7a-d). As concentrações séricas das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 foram analisadas em soro dos pacientes e expressas em pg/mL.

A média da concentração da citocina TNF-α nos maláricos foi de 3,54 ± 3,99 enquanto que no controle endêmico a média foi de 1,86± 2,67. Nível de significância foi de p = 0,0192 (Figura 7a). A média da concentração da citocina IFN-γ foi de 13,80 ± 41,52 nos maláricos enquanto que a média no controle endêmico foi de 4,48 ± 17,93. Nível de significância foi de p = 0,0010 (Figura 7b). A média da concentração da citocina IL-6 foi de 217,62 ± 534,91 nos maláricos, enquanto que a média no controle endêmico foi de 9,67 ± 16,69. Nível de significância foi de p < 0,001 (Figura 7c). A média da concentração da citocina IL-10 foi significativamente maior nos maláricos, 1.030,44 ± 2.290,77, enquanto que a média no controle endêmico foi de 2,22 ± 5,20. Nível de significância foi de p < 0,001 (Figura 7d).

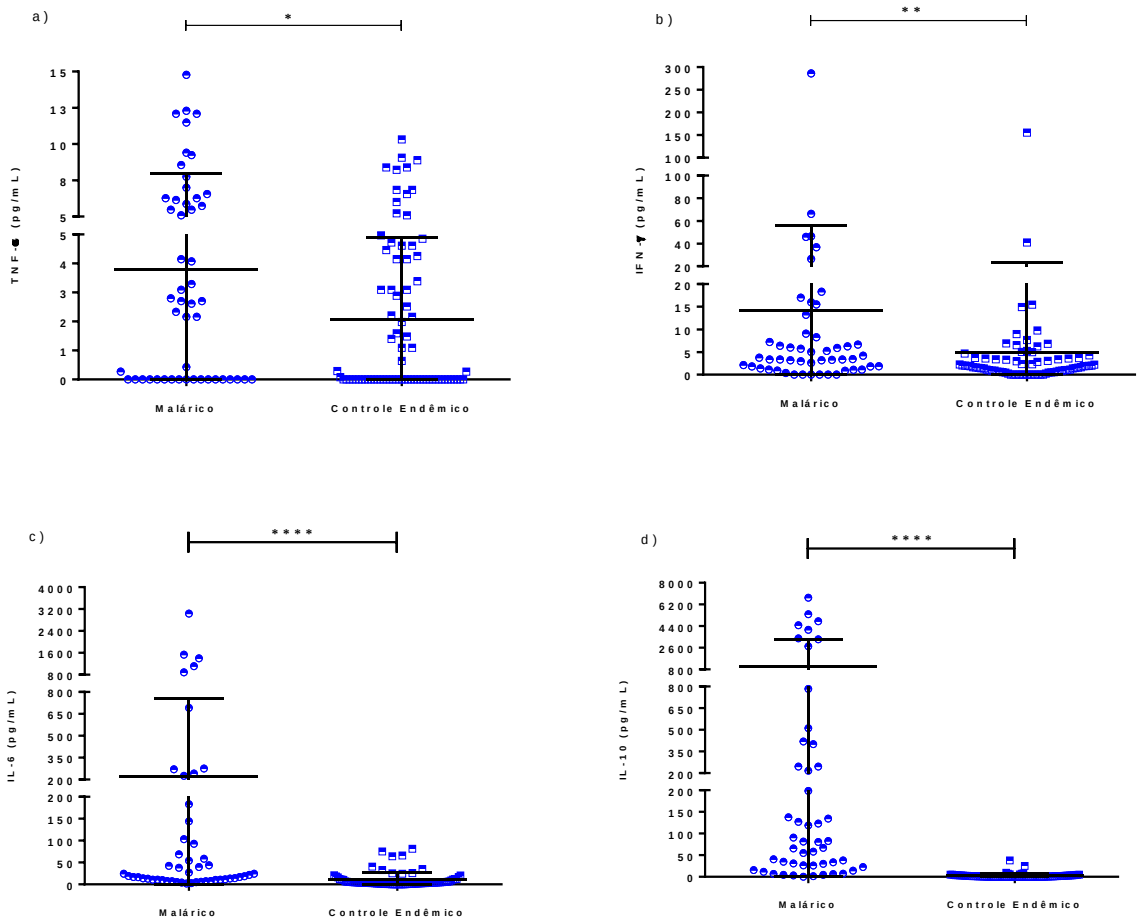

Figura 7: Expressão e correlação da citocina TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) em pg/mL entre os maláricos e o controle endêmico. Foi realizado o teste não paramétrico de U de Mann-Whitney. As diferenças significativas foram estimadas pela média dos valores em cada grupo, sendo considerados significativos àqueles onde p<0,05, onde * p < 0,05; ** p = 0,001; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

4.4. CORRELAÇÃO ENTRE AS CITOCINAS E OS GENÓTIPOS

Com intuito de verificar se os SNPs *TNFA*, *IFNG*, *IL6* e o haplótipo da *IL10* influenciam na expressão das respectivas citocinas, a mediana das suas concentrações séricas foi comparada entre os grupos de indivíduos homozigotos selvagem, homozigotos mutantes e heterozigotos, a partir do teste estatístico Mann-Whitney U-test (Figura 8a-d).

Ao correlacionarmos o SNP *TNFA* -308 G>A e a expressão do TNF-α, a mediana dos níveis séricos desta citocina foi comparada entre o grupo de indivíduos homozigoto selvagem (genótipo *GG*) e o grupo de indivíduos que têm a presença do alelo mutante (genótipos *GA* e *AA*). A mediana do nível sérico do TNF-α no grupo de indivíduos homozigotos selvagens foi 1,0 e a média foi de 2,49 pg/mL ± 3,17, com variação de 0,0 a 14,0 pg/mL. No grupo que tem a presença do alelo mutante, a mediana do nível sérico do TNF-α foi de 0,0 e a média foi 2,56 pg/mL ± 3,87, com variação de 0,0 a 12,0pg/mL. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p = 0,7151) (Figura 8a).

Ao correlacionarmos o SNP *IFNG*+874 T>A e a expressão do INF-γ, a mediana dos níveis séricos desta citocina foi comparada entre o grupo homozigoto mutante (genótipo *AA*) o grupo de homozigotos selvagens e heterozigotos (genótipos *TT* e *TA*, respectivamente). A mediana dos níveis séricos da citocina no grupo de indivíduos homozigotos mutantes foi 1,97 pg/mL e a média foi de 10,13 pg/mL ± 37,82, com variação de 0,0 a 286,20 pg/mL. No grupo de homozigotos selvagens e heterozigotos, a mediana dos níveis séricos foi de 2,08 e a média foi 7,08 pg/mL ± 19,69, com variação de 0,0 a 155,03 pg/mL. Não observamos diferenças significativas entre os grupos (p = 0,3813) (Figura 8b).

Ao correlacionarmos o SNP *IL6*-174 G>C e a expressão da IL-6, a mediana da dos níveis séricos desta citocina foi comparada entre o grupo de indivíduos homozigoto selvagem (genótipo *GG*) e o grupo de indivíduos que têm a presença do alelo mutante (genótipos *GC* e *CC*). A mediana dos níveis séricos da citocina no grupo de indivíduos homozigotos selvagens foi 9,00 e a média foi de 102,82 pg/mL ± 398,79, com variação de 0,0 a 3.037,00 pg/mL. No grupo que tem a presença do alelo mutante, a mediana dos níveis séricos da citocina foi de 5,0 pg/mL e a média

foi 69,77 pg/mL ± 240,20, com variação de 0,0 a 1.531,0 pg/mL. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p = 0,1668) (Figura 8c).

Ao correlacionarmos o haplótipo da *IL10* e a expressão da IL-10, a mediana da dos níveis séricos desta citocina foi comparada entre o grupo de indivíduos com genótipo *GCC/GCC* e os demais. A mediana dos níveis séricos no grupo de indivíduos *GCC/GCC* foi 4,0 pg/mL e a média foi de 440,08 pg/mL ± 1.574,38, com variação de 0,0 a 12.014,0 pg/mL. Nos demais genótipos, a mediana dos níveis séricos foi de 0,0 pg/mL e a média foi 17,33 pg/mL ± 56,92, com variação de 0,0 a 198,0 pg/mL. Observamos diferenças significativas entre os grupos (p = 0,0162) (Figura 8d).

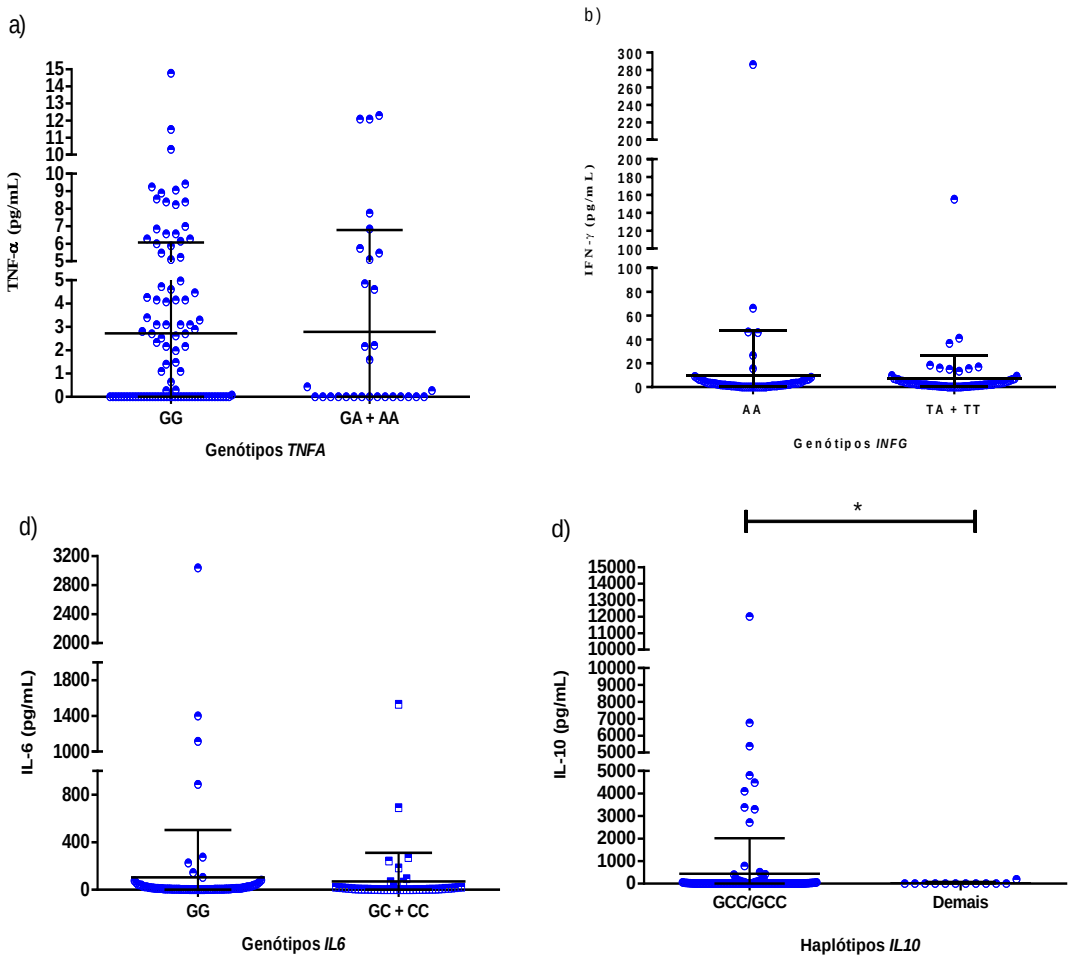

Figura 8: Correlação do nível das citocinas TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) e os SNPs/Haplótipo dos genes *TNFA* (a), *IFNG* (b), *IL6* (c) e *IL10* (d). Foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U-test. As diferenças significativas foram estimadas pela mediana dos valores em cada grupo, sendo considerados significativos àqueles onde p<0,05, onde * p < 0,05.

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE AS CITOCINAS E A CARGA PARASITÁRIA

Com o intuito de verificar se a expressão das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 podem contribuir para o controle da carga parasitária, as suas concentrações séricas foram comparadas com o número de parasitos no sangue periférico, a partir do teste não paramétrico de correlação de Spearman (Figura 9a-d).

Nos 50 pacientes do estudo, a média de parasitos foi de 10.910,40 parasitos/mm^3 ± 14.406,25. Observamos uma correlação positiva moderada entre a carga parasitária e o nível da citocina TNF-α (3,54 pg/mL ± 3,99), onde r = 0,4433 e p = 0,0013. Observamos uma correlação positiva forte entre a carga parasitária e o nível da citocina IL-6 (217,62 pg/mL ± 534,91), onde r = 0,5552 e p < 0,0001. Observamos uma correlação positiva forte entre a carga parasitária e o nível da citocina IL-10 (1.030,44 pg/mL ± 2.290,77), onde r = 0,5958 e p < 0,0001. Não observamos correlações entre a expressão da citocina IFN-γ com a carga parasitária.

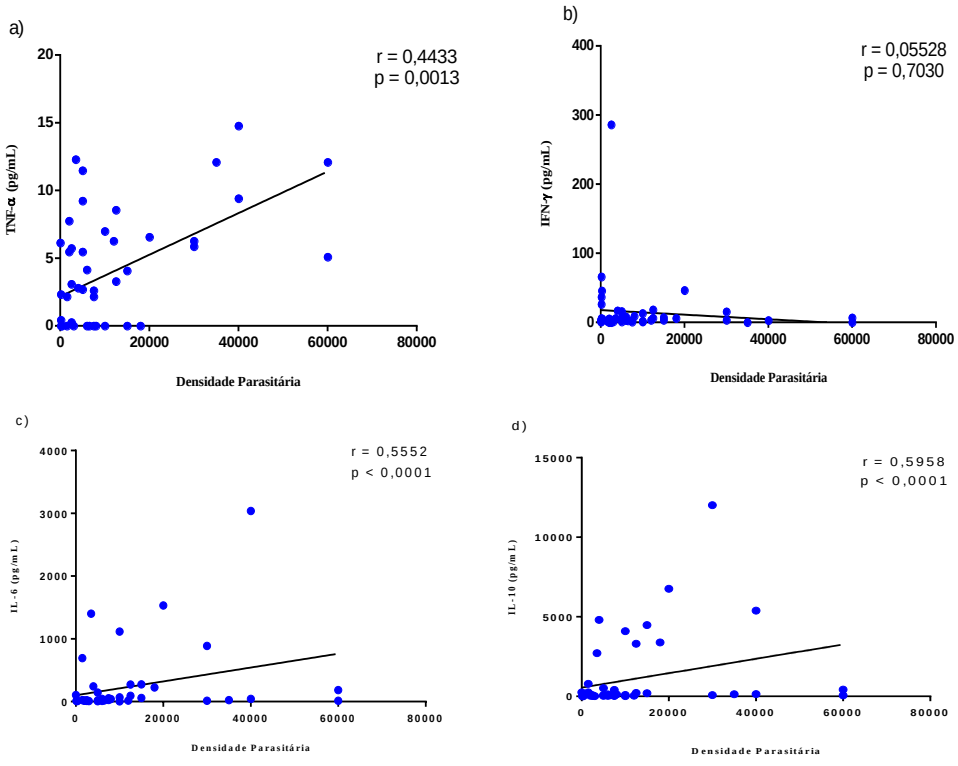

Figura 9: Expressão e correlação da citocina TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) em pg/mL com a carga parasitária nos pacientes maláricos. Foi realizado o teste não paramétrico de correlação de Spearman. r = coeficiente de Spearman, onde r < 0,4 = baixa correlação; 0,4 ≤ r ≤ 0,5 = correlação moderada; r > 0,5 = correlação forte.

4.6. CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA E OS GENÓTIPOS

Com o objetivo de verificar uma possível associação entre os SNPs e a carga parasitária, nós comparamos a mediana da carga parasitária entre os grupos de indivíduos homozigotos selvagem, homozigotos mutantes e heterozigotos, a partir do teste estatístico U de Mann-Whitney (Figura 10a-d).

Ao correlacionarmos o SNP *TNFA* -308 G>A e a carga parasitária, a mediana da carga parasitária foi comparada entre o grupo de indivíduos homozigoto selvagem (genótipo *GG*) e o grupo de indivíduos que têm a presença do alelo mutante (genótipos *GA* e *AA*). A mediana da carga parasitária no grupo de indivíduos homozigotos selvagens foi 7.500 e a média foi de 9.826,85 parasitos/mm^3± 9.906,69, com variação de 60 a 40.000 parasitos/mm^3. No grupo que tem a presença do alelo mutante, a mediana da carga parasitária foi de 2.000 parasitos/mm^3 e a média foi 11.638,13 parasitos/mm^3± 21.492,38, com variação de 7 a 60.000 parasitos/mm^3. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p = 0,0812) (Figura 10a).

Ao correlacionarmos o SNP *IFNG*+874 T>A e a carga parasitária, a mediana da carga parasitária foi comparada entre o grupo homozigoto mutante (genótipo *AA*) com indivíduos homozigotos selvagens e heterozigotos (genótipos *TT* e *TA*, respectivamente). A mediana da carga parasitária no grupo de indivíduos homozigotos mutantes foi 5.500 e a média foi de 10.288,00 parasitos/mm^3± 12.920,35, com variação de 60 a 40.000 parasitos/mm^3. No grupo de homozigotos selvagens e heterozigotos, a mediana da carga parasitária foi de 5.500 parasitos/mm^{3}e a média foi 11.325,33 parasitos/mm^3± 15.519,48, com variação de 30a 60.000 parasitos/mm^3. Não observamos diferenças significativas entre os grupos (p = 0,7346) (Figura 10b).

Ao correlacionarmos o SNP *IL6*-174 G>C e a carga parasitária, a mediana da carga parasitária foi comparada entre o grupo de indivíduos homozigoto selvagem (genótipo GG) e o grupo de indivíduos que têm a presença do alelo mutante (genótipos *GC* e *CC*). A mediana da carga parasitária no grupo de indivíduos homozigotos selvagens foi 6.000 parasitos/mm^3 e a média foi de 11.736,51 parasitos/mm^3 ± 14.554,11, com variação de 15 a 60.000 parasitos/mm^3. No grupo que tem a presença do alelo mutante, a mediana da carga parasitária foi

de 2.500 parasitos/mm^3 e a média foi 8.425,29 parasitos/mm^3± 14.503,50, com variação de 30 a 60.000 parasitos/mm^3. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p = 0,2644) (Figura 10c).

Ao correlacionarmos o haplótipo da *IL10* e a carga parasitária, a mediana da carga parasitária foi comparada entre o grupo de indivíduos com genótipo *GCC/GCC* e os demais grupos. A mediana da carga parasitária no grupo de indivíduos *GCC/GCC* foi 5.000 parasitos/mm^3 e a média foi de 10.737,18 parasitos/mm^3 ± 14.686,43 parasitos/mm^3, com variação de 15 a 60.000 parasitos/mm^3. Nos demais, a mediana da carga parasitária foi de 7.575 parasitos/mm^3 e a média foi 7.575,00 ± 10.500,53 parasitos/mm^3, com variação de 150 a 15.000 parasitos/mm^3. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p = 0,8776) (Figura 10d).

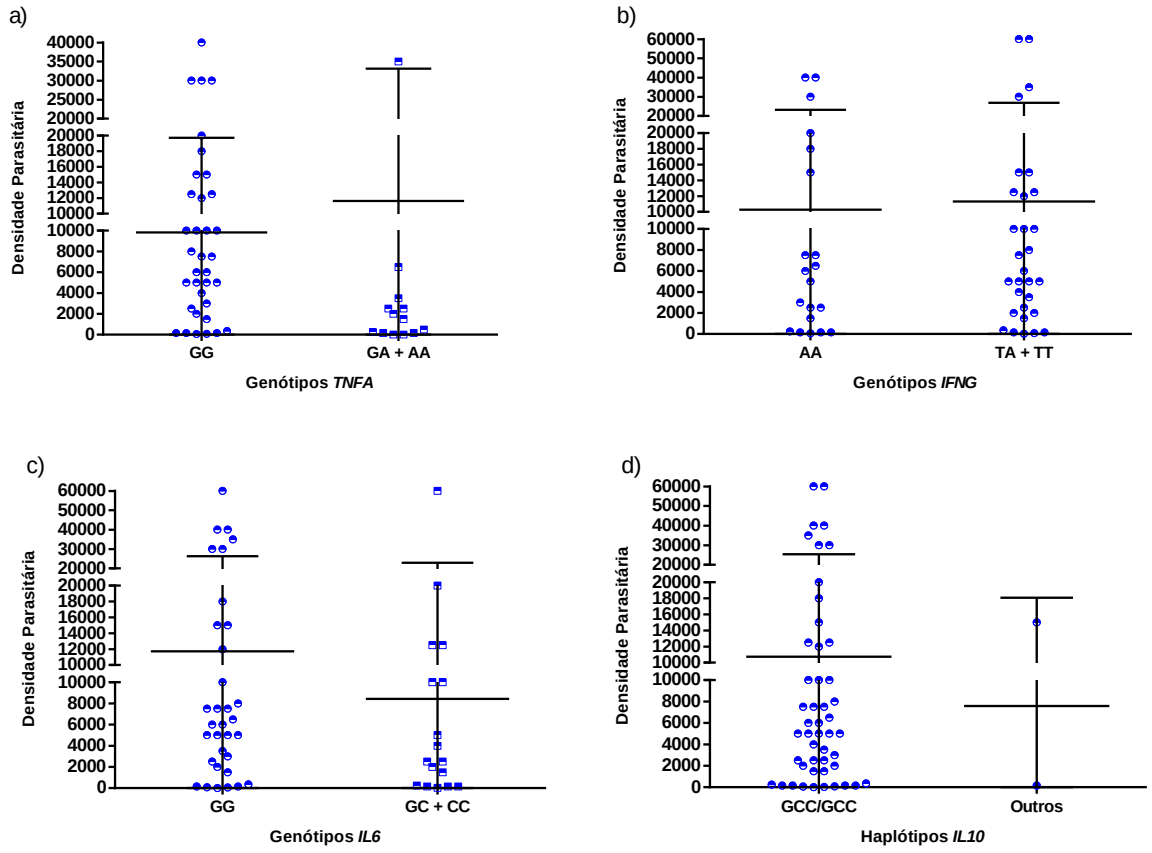

Figura 10: Correlação entre a carga parasitária nos pacientes maláricos e os SNPs/Haplótipo dos genes *TNFA* (a), *IFNG* (b), *IL6* (c) e *IL10* (d). Foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U-test. As diferenças significativas foram estimadas pela mediana dos valores em cada grupo, sendo considerados significativos àqueles onde p<0,05. Não observamos diferenças significativas.

4.7. CORRELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE EPISÓDIOS DE MALÁRIA E AS CITOCINAS

Com objetivo de analisar a influência do número de exposições ao *P. vivax* na resposta imune, avaliamos a expressão das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 nos grupos: controle endêmico, malária primária e malária recorrente. Observamos um aumento significativo no nível das citocinas IFN-γ, IL-6 e IL-10 no grupo malária primária em comparação ao controle endêmico, bem como um aumento significativo na expressão das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10 no grupo malária recorrente em comparação ao grupo controle endêmico, enquanto que a expressão da citocina IFN-γ foi significativamente maior no grupo com malária primária em comparação com o grupo malária recorrente. (Figura 11a-d).

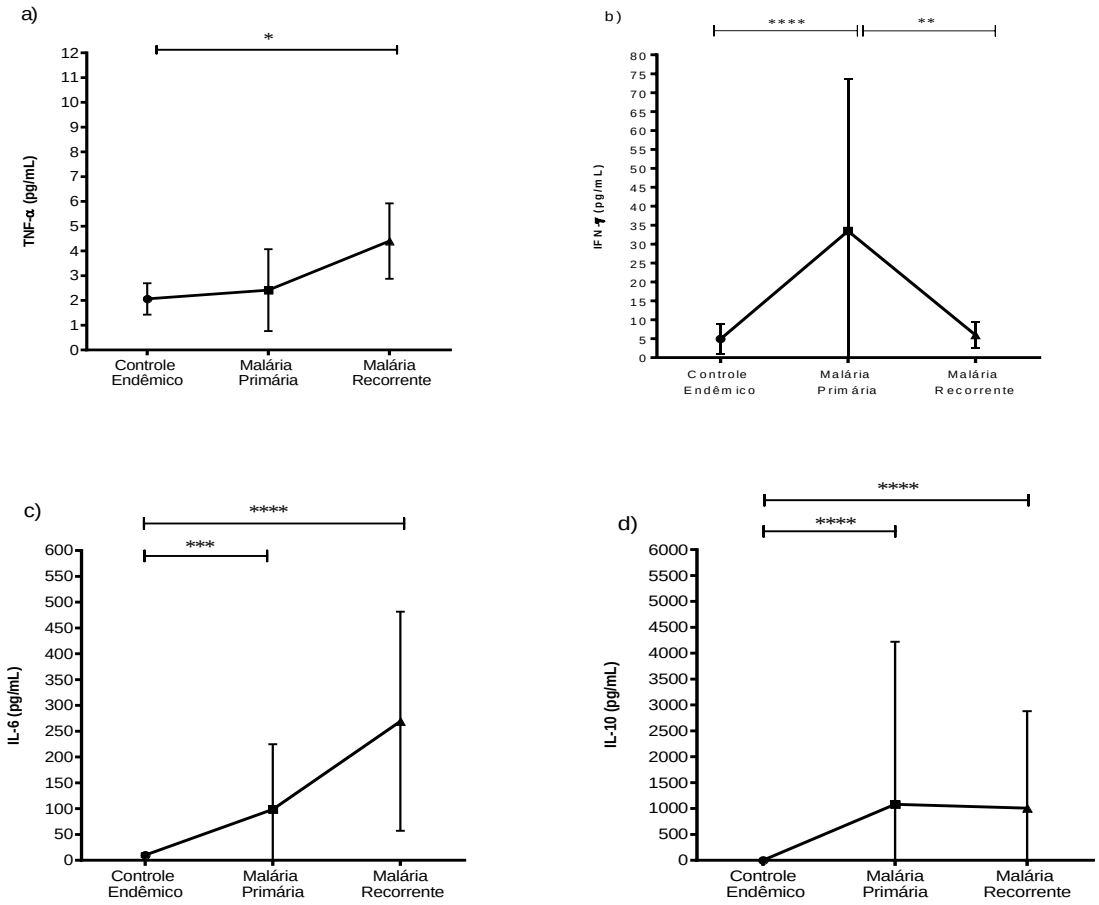

Figura 11: Análise comparativa entre a expressão das citocinas TNF-α (a), IFN-γ (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) em pg/mL com o grupo controle endêmico, malária primária e malária recorrente. Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações, seguido pelo pós-teste de Dunn`s. As diferenças significativas foram representadas por * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e **** $p< 0,0001$. Dados expressos pela média com intervalo de confiança de 95%.

4.8. ANÁLISE DAS CNVs

Todos os resultados descritivos citados abaixo foram obtidos após seleção aleatória e análise de CNVs de oito indivíduos sendo cinco (62,5%) do sexo feminino e três (37,5%) do sexo masculino. Dos cincos pacientes do sexo feminino, três eram pacientes positivos para *P. vivax* e dois eram negativos para a doença. A tabela 3 foi construída levando em consideração as CNVs que estavam presentes em pelo menos 30% dos pacientes positivos para *P. vivax* e ausente nos pacientes negativos. Foram observados 112 genes amplificados e 12 genes deletados e as CNVs encontradas não incluíam nenhum gene relacionado com receptores ou fatores de resistência a malária vivax. Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre os dados clinico-patológicos (parasitemia, sexo e recorrência da malária) e a presença das CNVs nos pacientes estudados ($p>0,05$). Contudo, identificamos vários genes já associados a outras patologias com o número de cópias alterado.

Tabela 3: Alterações envolvidas nas amostras positivas para *P. vivax*.

GENES	CNV (Média de Cópias)	BANDA CROMOSSÔMICA	TAMANHO (Kb)	NÚMERO DE MARCADORES	NÚMERO DE INDIVÍDUOS
RYR2, LOC100013033, ZP4, LOC339535, CHRM3, RPS7P5, FMN2.	Amplificação (Duas Cópias)	1q43	2.823	97	4
LOC643650, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, PPYR1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, AGAP9, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL.	Deleção	10q11.22	657	16	3
PWRN2, PWRN1, C15orf2, SNRPN, SNURF, SNORD107, PAR-SN, PAR5, IPW, PAR1, HBII-52-27, HBII-52-28, HBII-52-45, HBII-52-46, UBE3A, ATP10A, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OCA2, HERC2, GOLGA8F, GOLGA8G, HERC2P9, WHAMML2, LOC 100289656, LOC646278, APBA2, FAM189A1, NDNL2, SNORD64, SNORD108, SNORD109B, SNORD109A. SNORD116-1 a SNORD116-29, SNORD115-1 a SNORD115-48.	Amplificação (Duas Cópias)	15q11.2	563	27	3

5. DISCUSSÃO

5.1. ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *P. vivax*

Desde os anos 90, o número de casos de infecções por *P. vivax* aumentou no Brasil e atualmente representam mais de 85% dos relatados anuais na região Amazônica e a com alta prevalência de infecção assintomática (Suárez-Mutis et al., 2007; Tada et al., 2012). Apesar dos casos relatados de malária vivax ter sido associado a padrões não complicados da manifestação clínica da doença, atualmente há relatos de casos complicados, porém há muito o que ser explorado sobre a imunopatogênese deste padrão de infecção (Siqueira et al., 2016). Estudos realizados em Papua Nova Guiné (Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008) e na Amazônia brasileira (Alexandre et al., 2010) demonstraram exatamente esta associação entre a malária vivax e complicações graves.

As alterações hematológicas, características das infecções maláricas, podem levar a uma maior suspeita clínica da doença, iniciando assim uma terapia específica, mesmo na ausência de uma GE positiva (Jairajpuri et al., 2014). Os principais aspectos clínicos graves de *P. vivax* incluem a trombocitopenia, malária cerebral (Ozen et al., 2006), bem como a insuficiência renal aguda (Prakash et al., 2003) e hepática (Nautiyal et al., 2005). Foi proposto que o balanço entre respostas pró e anti-inflamatórias é fundamento para o controle do desenvolvimento de episódios graves da doença. Após a infecção, a resposta imune precisa modular não só para evitar a doença, mas também para permitir o controle do parasito.

No presente estudo, os parâmetros hematológicos foram caracterizados em pacientes com malária primária e recorrente. O grupo malária primária demonstrou uma diminuição significativa na contagem de glóbulos brancos (leucopenia) em comparação com o grupo controle. No entanto, em Manaus (Chaves et al., 2016) e em Nova Deli (Jairajpuri et al., 2014) não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, porém observou-se uma diminuição significativa na contagem de monócitos no grupo com malária primária. Nosso resultado, contudo, revelou um aumento da contagem de monócitos no grupo malária primária, semelhante ao que foi demonstrado em crianças gambianas com malária (Abdalla, 1988).

Acreditamos que a frequência dessas células na resposta imune a malária pode variar de acordo com diferentes áreas e populações endêmicas. A trombocitopenia foi considerada uma característica das infecções por *P. falciparum*, porém, desde o início da década de 1970, começaram a surgir relatos de achados semelhantes em infecções por *P. vivax* (Beale et al., 1972). Recentemente, em um estudo em Manaus, foi demonstrado que paciente com malária primária e recorrente apresentou trombocitopenia mais significativa em relação ao grupo de controle (Chaves et al., 2016). Além disso, na Índia (Muley et al., 2014) foi demonstrado também trombocitopenia em pacientes com malária vivax que desenvolveram os sintomas clínicos graves da doença. Estes resultados reforçam que alguns parâmetros hematológicos podem ser usados como indicadores para a gravidade da infecção por *P. vivax* (Alexandre et al., 2010).

Na análise entre o perfil de citocinas e a carga parasitária, verificou-se um aumento significativo dos níveis de TNF-α nos pacientes com malária recorrente em relação ao grupo controle, fator este associado à gravidade da doença (Andrade et al., 2010). As características clínicas mais comuns das infecções maláricas são os episódios febris, que recorrem tipicamente em intervalos de 48 horas em infecções por *P. vivax*, após a ruptura dos eritrócitos infectados. A ruptura leva à liberação de antígenos parasitários que, em seguida, estimulam as células mononucleares do sangue periférico para produzir TNF-α (Karunaweera et al., 1992; Mendis e Carter, 1992). Andrade et al. (2010) demonstraram um aumento significativo no nível plasmático de TNF-α em infecções graves por *P. vivax*. Além disso, dois estudos recentes demonstraram níveis mais elevados de TNF-α entre os pacientes infectados por *P. vivax* em Porto Velho (Hojo-Souza et al., 2017), bem como aqueles com alta parasitemia em imigrantes africanos (Hemmer et al., 2006).

No presente estudo, observamos um aumento no nível de IFN-γ no grupo malária primária e os níveis de IL-6 e IL-10 foram maiores em pacientes com malária recorrente e com uma correlação positiva com o aumento da carga parasitária. Chaves et al. (2016) corroboram com nossos achados e demonstraram associação entre os níveis de IL-6 e IL-10 diretamente proporcional a carga parasitária no grupo malária recorrente e maior em comparação com malária primária (6.000 parasitos/mm3 versus 2.500 parasitos/mm3, respectivamente).

Além disto, estudos anteriores propuseram que o perfil das citocinas pró- e anti-inflamatórias pode determinar resistência ou susceptibilidade a infecções por *Plasmodium*, sendo a expressão de TNF-α e IFN-γ associada à resistência e a de IL-10 com à susceptibilidade a malária (Day et al., 1999; Riley et al., 2006). Tais achados reforçam de que as citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10 estão envolvidas na regulação da resposta imune durante a recorrência da malária e que a aquisição gradual da imunidade depende da exposição, como verificado em outra área endêmica da malária no Brasil (Chaves et al., 2016). Somando-se a isto, a IL-10 desempenha um importante efeito regulador na desativação de macrófagos (Mosmann e Moore, 1991) e consequentemente diminui o possível dano tecidual e indiretamente responsável pela diminuição da produção de IFN-γ, reduzindo o controle da carga parasitária pelo hospedeiro e, deste modo, favorecendo a recidiva da infecção (Andrade et al., 2010; Chaves et al., 2016; Da Costa et al., 2014).

5.2. POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS E A INFECÇÃO PELO *P. vivax*

Em áreas de assentamento agrícola e de exploração mineral há um aumento na transmissão da malária (Da Silva-Nunes et al., 2008), favorecida pela intensa mudança ambiental, alteração na biologia dos vetores e agrupando de imigrantes não imunes (Vittor et al., 2008). No retorno desses imigrantes infectadas ao seu local de origem, novas infecções são introduzidas (Barbieri e Sawyer, 2007) e potencialmente disseminam diferentes cepas de *Plasmodium* para regiões vizinhas (Khasnis e Nettleman, 2005).

Aliado a isto e, sobretudo ao fato de que, fatores genéticos do hospedeiro também contribuem para a infecção e nas diferentes manifestações clínicas (Grant et al., 2015), o presente estudo avaliou se a frequência dos polimorfismos nos genes *TNFA*, *IFNG*, *IL6* e *IL10* e a influência desses SNPs na expressão das citocinas, bem como na carga parasitária, poderiam estar relacionados à infecção pelo *P. vivax* numa área de garimpo no estado do Pará.

As distribuições alélicas e genotípicas nestes genes variam em diferentes populações étnicas. Santovito et al. (2017) realizaram um estudo com indivíduos saudáveis da região norte e sul da Itália, e encontraram frequências de 87%

(população do norte da Itália) e 71% (população do Sul da Itália) para o alelo *TNFA*-308**G*, 91% e 76%, respectivamente, para o alelo *IL6*-174**G*, 88% e 80% para o alelo *IL10*-1082**G* e 87% e 71% para o alelo *IL10*-819**C*, resultados estes que foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho (89%, 77%, 91% e 97%, respectivamente). Entretanto, outros relatos mostraram frequências bem distintas, como por exemplo, frequências de 23% do alelo *IL10*-1082**G* em Indianos (Kaur et al., 2007) e de 29% para o alelo *IL10*-819**C* em Ameríndios Brasileiros (Lindenau et al., 2013).

As frequências genotípicas, assim como as alélicas, também apresentam diferenças em suas distribuições entre diferentes populações. O genótipo *TNFA*-308*GG* (baixos níveis) apresentou frequências de 57% em caucasóides, 88% em Africanos, 33% em Chineses, 95% em Japoneses e 75% em Tailandeses, enquanto que o genótipo *TNFA*-308*AA* (altos níveis) apresentou frequências de 0% em caucasóides, Africanos, Chineses e Japoneses, e 23% em Tailandeses (Sodsai et al., 2011). No presente estudo observamos uma frequência de 81,01% do genótipo *TNFA*-308*GG* na população saudável e 1,27% na frequência do genótipo *TNFA*-308*AA*.

O genótipo IL6-174*GG* (altos níveis) foi mais frequente na população de Salvador (71%), do que na população de Joinville (45%) e do Paraná e São Paulo (49%). O genótipo IL-6*CC* (baixos níveis) foi mais frequente na população de Joinville (19%) do que na população de Salvador (4%) e do Paraná e São Paulo (9%) (Visentainer et al., 2008). Diferenças foram observadas na frequência genotípica também com o presente estudo, onde a frequência do genótipo IL6-174*GG* foi de 59,50% na população saudável e 5,06% na frequência do genótipo IL6-174*AA* na mesma população. De forma semelhante, outras citocinas, como IL-10 e IFN-γ também apresentam diferenças significativas com relação ao seu perfil genético em diversas populações (Popadic et al., 2012; Vázquez-Villamar et al., 2016).

O SNP *TNFA*-308*G>A* está localizado na região promotora do gene e o alelo *TNFA*-308*A* já foi associado ao aumento da produção da citocina (Wilson et al., 1997). No presente estudo, observamos o alelo *TNFA*-308**G* mais frequente (associado à baixa produção de TNF-α), com 87,98%, e a frequência do alelo

TNFA-308*A* (associada à alta produção de TNF-α) foi de 12,02%. Os resultados semelhantes foram demonstrados por estudos anteriores na população brasileira (Mendonça et al., 2014; Furini et al., 2016a).

O genótipo *TNFA*-308*GG* apresentou frequências semelhantes no grupo malárico (70%) e controle endêmico (81,01%) e, consequentemente, nenhuma associação foi observada entre o SNP TNFA-308*G>A* e a susceptibilidade à infecção. Além disso, os níveis de TNF-α mostraram um aumento significativo nos pacientes com malária em comparação com ao controle endêmico, mas não observamos associação entre os genótipos e episódios anteriores de malária. Do mesmo modo, um estudo recente demonstrou que os pacientes brasileiros de malária vivax apresentaram alta produção de TNF-α, sem, no entanto, detectar diferença significativa (Hojo-Souza et al., 2017).

O SNP *IFNG*+874*A>T* está localizado na região onde o número de repetições pode modular a expressão do RNA mensageiro e a produção de IFN-γ (Pravica et al., 2000). No presente estudo, o alelo *IFNG*+874**A* (associada à baixa produção do IFN-γ) foi mais frequente (70,16%), semelhante ao observado em estudos prévios em áreas endêmicas da Amazônia brasileira (Medina et al., 2011; Furini et al., 2016a). Além disso, a frequência do genótipo *IFNG*+874*AA* (associado à baixa produção de IFN-γ) foi semelhante entre os grupos controle e malárico e, portanto, não foi observada associação entre os SNP e susceptibilidade a doença. No entanto, observamos um aumento significativo do nível de IFN-γ nos pacientes com malária em comparação ao controle, bem como uma correlação significativa dos níveis desta citocina com os episódios anteriores da doença. Neste contexto, vale a pena destacar o intenso fluxo populacional na região que favorece a transmissão da doença. Os indivíduos que trabalham ou moram nos locais onde há práticas de mineração, geralmente apresentam mais de quatro episódios de malária e isto já foi demonstrado estar associado com o aumento no nível de IFN-γ (Chaves et al., 2016).

Em um estudo com grupos étnicos no Mali frente à infecção pelo *P. falciparum* demonstrou que a frequência do diplótipo *IL6*-174*CG/GG* foi maior no grupo de não-Fulani em comparação ao grupo Fulani, tanto nos indivíduos sintomáticos quanto nos assintomáticos (Israelsson et al., 2009). No presente

estudo, a frequência do genótipo -174*GG* (associada à alta produção de IL-6) foi semelhante entre os grupos maláricos e controle e não observamos associação entre o SNP *IL6*-174*G>C*, os genótipos e os episódios anteriores da malária. Um estudo prévio também demonstrou não haver diferenças significativas na entre o SNP e a manifestação do quadro clínico (assintomáticos, malaria não complicada e complicada) da malária vivax (Mendonça et al., 2014). Contudo, no presente estudo observamos um aumento significativo no nível de IL-6 nos pacientes maláricos em comparação ao grupo controle, demonstrando, neste caso, uma associação entre a produção de IL-6 e o controle da infecção, assim como já foi demonstrado ser um mediador fundamental associado aos sintomas da doença (Böttger et al., 2013).

Os mecanismos que envolvem a ação da IL-10 na patogênese da malária são bastante controversos, e dependem de fatores associados ao hospedeiro, ao parasita e aos modelos de estudo utilizados. Estudo prévio demonstrou que o haplótipo IL-10*GCC* (-1082*G*, 819*C* e -592*C*) associados com altos níveis séricos de IL-10, protegia contra os quadros graves de anemia na malária falciparum (Ouma et al., 2008). No presente estudo, a frequência genotípica, alélica e haplotípica dos três SNPs da *IL10* (-1082*A>G*, -819*C>T* e -592*C>A*) foi semelhante entre os grupos malárico e controle e nenhuma associação foi observada com os episódios anteriores da malária.

Da mesma forma, foi demonstrado anteriormente não haver diferenças significativas nas frequências de genotípicas, alélicas e haplotípica de cinco SNPs da *IL10* (-3565, -2849, -2763, -1082 e -819) entre a população brasileira e holandesa (Moraes et al., 2003). Além disso, no presente estudo, observamos diferenças significativas entre os níveis de IL-10 e o haplótipo *GCC/GCC* nos pacientes maláricos. De fato, o haplótipo *GCC/GCC* está relacionado à alta produção da citocina e à suscetibilidade a malária em um estudo com grupo étnico Fulani no Mali (Israelsson et al., 2009), assim como foi demonstrado em outro estudo com crianças no Quênia com quadros graves de malária falciparum (Ouma et al., 2008).

O estudo dos polimorfismos em genes de citocinas e os fatores de risco associados à malária em áreas de mineração de ouro na região amazônica é,

particularmente, desafiadores devido aos vários fatores que influenciam, já que esta atividade consiste em fluxo intenso fluxo populacional o que dificulta a padronização da frequência desses SNPs na população e que podem afetar a resposta imune na malária vivax. Apesar disto, o presente estudo demonstrou que os níveis das citocinas e a frequência do haplótipo da IL-10 apresentaram correlação com os episódios anteriores da malária. Estes achados fornecem uma forte justificativa para estudos futuros de respostas de IFN-γ, TNF-α e IL-10 específicas de antígenos como biomarcadores de maior susceptibilidade à malária após exposição ao *P. vivax*. Estudos futuros com um número maior de amostras podem ser capazes de determinar quais desses determinantes genéticos e imunológicos são críticos na proteção contra o desenvolvimento da infecção clínica por *P. vivax*.

5.3. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DAS CNVs E SUA ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO *P. vivax*

A variação no número de cópias no genoma é uma ferramenta muito utilizada no estudo da variação genética humana, identificando uma diversidade de fatores associados a doenças. Avanços nas tecnologias de análise em larga escala, incluindo aCGH, microarranjos de SNPs e sequenciamento do genoma possibilitaram a descoberta e a caracterização de variantes com tamanhos intermediários entre aberrações cromossômicas grandes (> 1 Mbp) e pequenas inserções e deleções (1-50 pb). Essas variantes de tamanho intermediário, quando são deleções e duplicações presentes no genoma humano, são chamadas de CNVs (Lupski, 2007).

As CNVs alteram o fenótipo clínico das doenças infecciosas, como HIV-1, bem como, nas doenças como câncer e glomerulonefrite lúpica (Zheng et al., 2017; Al-Sukhni et al., 2012; Lane et al., 2013). Na malária, os fenótipos são heterogêneos e inclui infecção assintomática, quadro febril, malária não grave e grave com anemia severa e malária cerebral (White, 2014). O curso da infecção pode variar significativamente entre indivíduos e determinantes dessa variabilidade permanecem ainda não identificados (Greenwood et al., 1991). Fatores genéticos humanos demonstraram fornecer proteção contra a malária e são responsáveis por,

aproximadamente, um quarto da variabilidade total na incidência da doença (Mackinnon et al., 2005).

No presente estudo, descrevemos pela primeira vez a frequência das CNVs em indivíduos com infecção pelo *P. vivax* numa área de garimpo, localizada na cidade de Itaituba, estado do Pará. Embora não tenhamos observado associações significativas entre as CNVs e a apresentação clinico-patológico da malária vivax, vários trabalhos já identificaram genes associados à suscetibilidade a malária. Um estudo recente realizado por Faik et al. (2017) analisaram crianças Gabonesas com malária não grave e grave causada pelo *P. falciparum* e identificaram uma variação no número de cópias nos genes *PKLR, FCGR2A, FCGR2C* e *FCGR3* significativamente maior nas crianças com malaria grave em comparação com as crianças com malária não grave. Carpenter et al. (2012) analisaram três fenótipos clínicos (carga parasitária, número de episódios de malária e nível de hemoglobina) na população da Tanzânia na infecção pelo *P. falciparum* e demonstraram uma fraca evidência de associação entre a variação no número de cópias do gene *CCL3L1* e os fenótipos da malária. No presente estudo, contudo, não identificamos nenhum destes genes nos indivíduos analisados na infecção pelo *P. vivax*.

Em nossos resultados, vários genes já associados a outras patologias foram encontrados com o número de cópias alterado. Por exemplo, alterações no gene *RYR2* estão associadas a várias doenças cardíacas, como a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. Essas mutações incluem deleções de éxons (Leong et al., 2015), apesar de que em nossos estudos esse gene foi encontrado amplificado. Mutações no gene *CHRM3* estão relacionadas com a diabete tipo 2 e também com a síndrome de Prune Belly, uma uropatia fetal, de etiologia ainda não elucidada, caracterizada por uma tríade de anomalias congênitas, que inclui: ausência ou deficiência da musculatura abdominal; o não desenvolvimento testicular; expansão anormal da bexiga em associação com problemas no trato urinário superior (Guo et al., 2006). Não há relato sobre CNVs desse gene e seus efeitos. Outro gene, *FMN2*, está associado a deficiência intelectual, mas um estudo recente relacionou a perda de cópias desse gene com uma maior probabilidade de metástases em linfonodo em carcinoma medular de tireoide (Araujo et al., 2014).

Já a amplificação gene *PPYR1* estão associadas à obesidade, de acordo com um estudo em uma população chinesa (Sha et al., 2009).

Esses dados inéditos de CNVs em nossa amostra correspondem a um levantamento preliminar, e a ocorrência de alterações no número de cópias em genes sabidamente associados a diferentes quadros clínicos reforçam a importância em se aumentar o tamanho amostral, além da necessidade de estudo mais pormenorizados sobre a função dos genes alterados. Esses dados permitirão uma melhor interpretação de uma possível relação entre a presença de CNVs desses genes e uma maior ou menor susceptibilidade à malária ou diferenças no quadro clínico dos pacientes.

6. CONCLUSÃO

- Carga parasitária foi maior no grupo malária recorrente;
- Os grupos malária primária e malária recorrente apresentaram trombocitopenia;
- O grupo malária recorrente apresentou monocitose;
- A frequência dos SNPs entre os grupos foi semelhante;
- Os SNPs não estão associados a infecção pelo *P. vivax*;
- Os níveis de TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 estão elevados no grupo malárico;
- Pacientes com haplótipo IL10*GCC/GCC* apresentam níveis maiores de IL-10;
- O nível das citocinas IL-10, TNF-α e IL-6 estão correlacionados positivamente com a carga parasitária;
- O nível das citocinas IFN-γ, IL-6 e IL-10 é maior nos grupos malária primária e malária recorrente em comparação ao controle endêmico;
- O nível de IFN-γ é maior no grupo primário em comparação com o grupo recorrente;
- Cento e doze genes estão amplificados e doze genes estão deletados no genoma dos pacientes maláricos;
- As variações no número de cópias não incluem genes relacionados com receptores ou fatores de resistência a malária vivax;
- As variações no número de cópias não estão correlacionadas com os dados clinico-patológicos da malária;
- Identificamos genes com alterações no número de cópias que já foram relacionados a outras doenças.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abbas, A. K.; Litchtman, A. H.; Pillai, S. Imunologia Celular e Molecular, 8ª Ed, Rio de Janeiro-RJ: Elsevier Editora Ltda, 2015.

Abdalla, S.H. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. ***Ann Trop Paediat, 8***(4): 250-258. 1988.

Adams, J.H.; Sim, B.K.; Dolan, S.A.; Fang, X.; Kaslow, D.C.; Miller, L.H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89***: 7085–7089. 1992.

Adedoja, A.; Hoan, N. X.; van Tong, H.; Adukpo, S.; Tijani, D. B.; Akanbi, A. A.; Meyer, C. G.; Ojurongbe, O.; Velavan, T. P. Differential contribution of interleukin-10 promoter variants in malaria and schistosomiasis mono- and co-infections among Nigerian children. ***Trop Med Int Health, 23***(1):45-52. 2018.

Alecrim, M. G.; Lacerda, M. V.; Mourao, M. P.; Alecrim, W. D.; Padilha, A.; Cardoso, B. S.; Boulos, M. Successful treatment of Plasmodium falciparum malaria with a six-dose regimen of artemether-lumefantrine versus quinine-doxycycline in the western Amazon region of Brazil. ***Am J Trop Med Hyg, 74***: 20–25. 2006.

Alexandre, M. A.; Ferreira, C. O.; Siqueira, A. M.; Magalhães, B. L.; Mourão, M. P. G.; Lacerda, M. V.; Alecrim, M. G. C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. ***Emerg Infect Dis, 16***(10):1611-4 2010.

Al-Sukhni, W.; Joe, S.; Lionel, A. C, Zwingerman N, Zogopoulos G, Marshall CR, Borgida A, Holter S, Gropper A, Moore S, Bondy M, Klein AP, Petersen GM, Rabe KG, Schwartz AG, Syngal S, Scherer SW, Gallinger S. Identification of germline genomic copy number variation in familial pancreatic cancer. ***Hum Genet, 131***(9):1481-94. 2012.

Andrade, B. B.; Reis-Filho, A.; Souza-Neto, S. M.; Clarêncio, J.; Camargo, L. M. A.; Barral, A.; Barral-Netto, M. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. ***Malar J, 9***:13.2010.

Antonarakis, E. S.; Kazazian, H. H.; Orkin, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. ***Human Genetics, 69***:1-14. 1985.

Anstey, N. M.; Russell, B.; Yeo, T. W.; Price, R. N. The pathophysiology of vivax malaria. ***Trends Parasitol, 25***(5):220-7. 2009.

Anstey, N. M.; Douglas, N. M.; Poespoprodjo, J. R.; Price, R. N. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. ***Adv Parasitol, 80***: 151–201. 2012.

Araújo, T. M.; Seabra, A. D.; Lima, E. M.; Assumpção, P. P.; Montenegro, R. C.; Demachki, S.; Burbano, R. M.; Khayat, A. S. Recurrent amplification of RTEL1 and ABCA13 and its synergistic effect associated with clinicopathological data of gastric adenocarcinoma. ***Mol Cytogenet, 9***:52. 2016.

Araujo, A. N.; Moraes, L.; França, M. I.; Hakonarson, H.; Li, J.; Pellegrino, R.; Maciel, R. M.; Cerutti, J. M. Genome-wide copy number analysis in a family with p.G533C RET mutation and medullary thyroid carcinoma identified regions potentially associated with a higher predisposition to lymph node metastasis. ***J Clin Endocrinol Metab, 99***(6):E1104-12. 2014.

Araujo, F.; Resende, A.; Fontes, C. J.; Carvalho, L.; Brito, C. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. ***PLoS One 7***:e49871. 2012.

Arévalo-Herrera, M.; Quiñones, M. L.; Guerra, C.; Céspedes, N.; Giron, S.; Ahumada, M.; Piñeros, J. G.; Padilla, N.; Terrientes, Z.; Rosas, A.; Padilla, J. C.; Escalante, A. A.; Beier, J. C.; Herrera, S. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. ***Acta Trop, 121***: 303-314. 2012.

Artavanis-Tsakonas, K. and Riley, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. ***J Immunol, 169*** (6):2956–63. 2002.

Baird, J. K. Evidence and implications of mortality associated with acute Plasmodium vivax malaria. ***Clin Microbiol Rev 26***: 36-57. 2013a.

Baird, J. K. Malaria caused by Plasmodium vivax: recurrent, difficult to treat, disabling, and threatening to life--the infectious bite preempts these hazards. ***Pathog Glob Health, 107***(8):475-9. 2013b

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. ***Trop Med Int Health, 2***: 673-679. 1997.

Barbieri, A. F.; Sawyer, D. O. Heterogeneity of malaria prevalence in alluvial gold mining areas in Northern Mato Grosso State, Brazil. ***Cad Saude Publica, 23*** (12): 2878–2886. 2007.

Barreto, M. L.; Teixeira, M. G.; Bastos, F. I.; Ximenes, R. A.; Barata, R. B.; Rodrigues, L. C. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. ***Lancet, 377***: 1877–1889. 2011.

Bartoloni, A.; Zammarchi, L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. ***Mediterr J Hematol Infect Dis, 4***(1): e2012026. 2012.

Beale, P. J.; Cormack, J. D.; Oldrey, T. B. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. ***Br Med J, 1***(796): 345–349. 1972.

Bestach, Y.; Nagore, V. P.; Flores, M. G.; González, J.; Arbelbide, J.; Watman, N.; Sieza, Y.; Larripa, I.; Belli, C. Influence of *TNF* and *IL6* gene polymorphisms on the severity of cytopenias in Argentine patients with myelodysplastic syndromes. ***Ann Hematol, 96***(8):1287-1295. 2017.

Bidwell, J.; Keen, L.; Gallagher, G.; Kimberly, R.; Huizinga, T.; McDermott, M. F.; Oksenberg, J.; McNicholl, J.; Pociot, F.; Hardt, C.; D'Alfonso, S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. ***Genes Immun, 2***(2):61-70. 2001.

Bostrom, S.; Giusti, P.; Arama, C.; Persson, J. O.; Dara, V.; Traore, B.; Dolo, A.; Doumbo, O.; Troye-Blomberg, M. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. ***Malar J, 11***:109. 2012.

Böttger, E.; Grangeiro de Carvalho, E.; Meese, S.; Kun, J. F.; Esen, M. Expression of interleukin-6 family receptors in NK92 cells is regulated by cytokines and

not through direct interaction with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. ***J Interferon Cytokine Res, 33***:65–71. 2013.

Bouharoun-Tayoun, H.; Oeuvray, C.; Lunel, F.; Druilhe, P. Mechanisms under-lying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. ***J Exp Med, 182***:409–18. 1995.

Bradley, L. M. Migration and T-lymphocyte effector function. ***Curr Opin Immunol, 15***(3):343-8. 2003.

Braga, M. D.; Alcantara, G. C.; Silva, C. N.; Nascimento, C. G. Cerebral malaria in Ceara: a case report. ***Rev Soc Bras Med Trop, 37***:53-55. 2004.

IBGE. Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico, 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 31 de dezembro de 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Dados Epidemiológicos de Malária, por Estado, na Amazônia Legal. Notificação de Casos. Sivep/Malária. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponivel em: <www.saude.gov.br/sivep_malaria. Acesso em 23 de janeiro de 2017.

Brasil. Situação Epidemiológica – Dados. Ministério da Saúde. Mapa de risco por município de infecção, Brasil, 2015. Disponível em: < http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/32/Mapa-de-risco_malaria_2015.pdf.> Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Brasil. Secretaria de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2009.

Braz, R. M.; Duarte, E. C.; Tauil, P. L. Caracterização das epidemias de malaria nos municipios da Amazonia Brasileira em 2010. ***Cad Saúde Pública, 29*** (5): 935–944. 2013.

Budzko, L.; Marcinkowska-Swojak, M.; Jackowiak, P.; Kozlowski, P.; Figlerowicz, M. Copy number variation of genes involved in the hepatitis C virus-human interactome. ***Sci Rep, 6***:31340. 2016.

Cantor, E. M.; Lombo, T. B.; Cepeda, A.; Espinosa, A. M.; Barrero, C. A.; Guzman, F.; Gunturiz, M. L.; Urquiza, M.; Ocampo, M.; Patarroyo, M. E.; Patarroyo, M. A. *Plasmodium vivax*: functional analysis of a highly conserved PvRBP-1protein region. ***Mol Biochem Parasitol, 117***(2): 229–234. 2001.

Carpenter, D.; Färnert, A.; Rooth, I.; Armour, J. A.; Shaw, M. A. CCL3L1 copy number and susceptibility to malaria. ***Infect Genet Evol, 12***(5):1147-54. 2012.

Cavasini, C. E.; De Mattos, L. C.; Couto, A. A.; Couto, V. S.; Gollino, Y.; Moretti, L. J., Bonini-Domingos, C. R.; Rossit, A. R.; Castilho, L.; Machado, R.L. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. ***Malar J, 6***:167. 2007a.

Cavasini, C. E.; Mattos, L. C.; Couto, A. A.; Bonini-Domingos, C. R.; Valencia, S. H.; Neiras, W. C.; Alves, R. T.; Rossit, A. R.; Castilho, L.; Machado, R. L. Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? ***Trans R Soc Trop Med Hyg, 101***(10): 1042-1044. 2007b.

Carlton, J. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. ***Trends Parasitol, 19***(5):227-31. 2003.

Carvalho, T. A.; Queiroz, M. G.; Cardoso, G. L.; Diniz, I. G.; Silva, A. N.; Pinto, A. Y.; Guerreiro, J. F. Plasmodium vivax infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. ***Malar J, 11***:430. 2012.

Carvalho, B. O.; Matsuda, J. S.; Luz, S. L.; Martinez-Espinosa, F. E.; Leite, J. A.; Franzin, F.; Orlandi, P. P.; Gregoracci, G. B.; Lacerda, M. V.; Nogueira, P. A.; Costa, F. T. Gestational malaria associated to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* placental mixed-infection followed by foetal loss: a case report from an unstable transmission area in Brazil. ***Malar J. 10***: 178. 2011.

Carvalho, B. O.; Lopes, S. C.; Nogueira, P. A.; Orlandi, P. P.; Bargieri, D. Y.; Blanco, Y. C.; Mamoni, R.; Leite, J. A.; Rodrigues, M. M.; Soares, I. S.; Oliveira, T. R.; Wunderlich, G.; Lacerda, M. V.; del Portillo, H. A.; Araújo, M. O.; Russell, B.; Suwanarusk, R.; Snounou, G.; Rénia, L.; Costa, F. T. On the

Cytoadhesion of Plasmodium vivax-Infected Erythrocytes. ***J Infect Dis, 202***(4): 638-47. 2010.

Carvalho-Silva, D.R.; Santos, F. R.; Rocha, J.; Pena, S. D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. ***Am J Hum Genet, 68***: 281. 2001.

Cassiano, G. C.; Santos, E. J. M.; Maia, M. H. T.; Furini, A. A. C.; Storti-Melo, L. M.; Tomaz, F. M.; Trindade, P. C.; Capobianco, M. P.; Amador, M. A.; Viana, G. M.; Póvoa, M. M.; Santos, S. E.; Machado, R. L. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. ***Hum Immunol, 76*** (11): 836–842. 2015.

CDC, Center of Disease Control and Prevetion. Malaria. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/index.html> Acesso em: 27/12/2017.

CDC, Center of Disease Control and Prevetion. Malaria. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> Acesso em: 20.12.2017.

Chapman, S. J. and Hill, A. V. S. Human genetic susceptibility to infectious disease. ***Nat Rev Genet, 13***:175–188. 2012.

Chaves, Y. O.; Da Costa, A.G.; Pereira, M. L.; De Lacerda, M.V.; Coelho-Dos-Reis, J. G.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Malheiro, A.; Monteiro, W. M.; Orlandi, P. P.; Marinho, C. R. F.; Nogueira, P. A. Immune response pattern in recurrent Plasmodium vivax malaria. ***Malar J, 15***(1): 445. 2016.

Chen, Z.; Tato, C. M.; Muul, L.; Laurence, A.; O'Shea, J. J. Distinct Regulation of Interleukin-17 in Human T Helper Lymphocytes. ***Arthritis Rheum, 56***(9): 2936-46. 2007.

Cheng, M.; An, S.; Li, J. Identifying key genes associated with acute myocardial infarction. ***Medicine (Baltimore), 96***(42):e7741. 2017.

Clark, I. A. and Chaudhri, G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. ***Br J Haematol, 70***(1):99-103.1988.

Cohen, J. M.; Smith, D. L.; Cotter, C.; Ward, A.; Yamey, G.; Sabot, O. J.; Moonen, B. Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. ***Malar J, 11***: 122. 2012.

Conde, S. R.; Feitosa, R. N.; Freitas, F. B.; Hermes, R. B.; Demachki, S.; Araújo, M. T.; Soares, M. C.; Ishak, R.; Vallinoto, A. C. Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B. ***Cytokine, 61***(3):940-4. 2013.

Conrad, D. F.; Pinto, D.; Redon, R.; Feuk, L.; Gokcumen, O.; Zhang, Y.; Aerts, J.; Andrews, T. D.; Barnes, C.; Campbell, P.; Fitzgerald, T.; Hu, M.; Ihm, C. H.; Kristiansson, K.; Macarthur, D. G.; Macdonald, J. R.; Onyiah, I.; Pang, A. W.; Robson, S.; Stirrups, K.; Valsesia, A.; Walter, K.; Wei, J.; Wellcome Trust Case Control Consortium., Tyler-Smith, C.; Carter, N. P.; Lee, C.; Scherer, S. W.; Hurles, M. E. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. ***Nature, 464***(7289):704-12. 2010.

Costa, G. L.; Amaral, L. C.; Fontes, C. J. F.; Carvalho, L. H.; de Brito, C. F. A.; de Sousa, T. N. Assessment of copy number variation in genes related to drug resistance in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* isolates from the Brazilian Amazon and a systematic review of the literature. ***Malar J, 16***(1): 152. 2017.

Costa, A. G.; Antonelli, L. R. V.; Costa, P. A. C.; Pimentel, J. P. D.; Garcia, N. P.; Tarragô, A. M.; dos Santos Mdo, P.; Nogueira, P. A.; Hekcmann, M. I.; Sadahiro, A.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O. A.; Malheiro, A. The robust and modulated biomarker network elicited by the *Plasmodium vivax* infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. ***J Immunol Res, 2014***:318250. 2014.

Coura, J. R.; Suárez-Mutis, M.; Ladeia-Andrade, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 3***: 229–237. 2006.

Cowman, A. F.; Crabb, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. ***Cell 124***: 755-766. 2006.

Cunha, M. L.; Piovesan-Alves, F.; Pang, L. W. Community-based program for malaria case management in the Brazilian Amazon. ***Am J Trop Med Hyg, 65***(6): 872-876. 2001.

Cui, L.; Mharakurwa, S.; Ndiaye, D.; Rathod, P. K.; Rosenthal, P. J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. ***Am J Trop Med Hyg, 93***(3 Suppl):57-68. 2015.

Da Costa, A. G.; Antonelli, A. L. R.; Costa, P. A. C.; Pimentel, J. P. D.; Garcia, N. P.; Tarragô, A. M.; Dos Santos, M. P. S. L.; Nogueira, P. A.; Hekcmann, M. I.; Sadahiro, A.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O. A.; Malheiro, A. The robust and modulated biomarker network elicited by the Plasmodium vivax infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. ***J Immunol Res, 2014***: 318250. 2014.

Dalma-Weiszhausz, D. D.; Warrington, J.; Tanimoto, E. Y.; Miyada, C. G. The affymetrix GeneChip platform: an overview. ***Methods Enzymol, 410***:3-28. 2006.

Da Silva-Nunes, M.; Codeço, C. T.; Malafronte, R. S.; da Silva, N. S.; Juncansen, C.; Muniz, P. T.; Ferreira, M. U. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. ***Am J Trop Med Hyg, 79***(4):624-35. 2008.

Da Silva-Santos, S.; Clark, T. G.; Campino, S.; Suarez-Mutis, M. C.; Rockett, K. A.; Kwiatkowski, D. P.; Fernandes, O. Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. ***PLoS One, 7***(5):e36692. 2012.

Day, N. P.; Hien. T. T.; Schollaardt, T.; Loc, P. P.; Chuong, L. V.; Chau, T. T.; Mai, N. T.; Phu, N. H.; Sinh, D. X.; White, N. J.; Ho, M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. ***J Infect Dis, 180***: 1288–1297. 1999.

Deng, Z.; Yang, F.; Bai, Y.; He, L.; Li, Q.; Wu, Y.; Luo, L.; Li, H.; Ma, L.; Yang, Z.; He, Y.; Cui, L. Co-inheritance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations and hemoglobin E in a Kachin population in a malaria-endemic region of Southeast Asia. ***PLoS One, 12***(5):e0177917. 2017.

De Araujo, F. C.; De Rezende, A. M.; Fontes, C. J.; Carvalho, L. H.; Alves de Brito, C. F. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in Plasmodium vivax infection. ***PloS one, 7***(11):e49871. 2012.

De Oliveira, E. C, dos Santos, E. S.; Zeilhofer, P.; Souza-Santos, R.; Atanaka-Santos, M. Geographic information systems and logistic regression for high-resolution malaria risk mapping in a rural settlement of the southern Brazilian Amazon. ***Malar J, 12***: 420–429. 2013.

De Pina-Costa, A.; Brasil, P.; Di Santi, S. M.; de Araujo, M. P.; Suárez-Mutis, M. C.; Santelli, A. C.; Oliveira-Ferreira, J.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Daniel-Ribeiro, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 109***(5): 618-33. 2014.

De Souza, J. B.; Williamson, K. H.; Otani, T.; Playfair, J. H. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. ***Infect Immun, 65***(5):1593–8. 1997.

Domingues, W.; Kanunfre, K. A.; Rodrigues, J. C.; Teixeira, L. E.; Yamamoto, L.; Okay, T. S. Preliminary report on the putative association of il10 -3575 t/a genetic polymorphism with malaria symptoms. ***Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 58***:30. 2016.

Dondorp, A. M.; Lee, S. J.; Faiz, M. A.; Mishra, S.; Price, R.; Tjitra, E.; Than, M.; Htut, Y.; Mohanty, S.; Yunus, E. B.; Rahman, R.; Nosten, F.; Anstey, N. M.; Day, N. P.; White, N. J. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. ***Clin Infect Dis, 47***(2):151-7. 2008.

Doolan, D. L. and Hoffman, S. L. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. ***J Immunol, 165***(3):1453-62. 2000.

Douglas, N. M.; Anstey, N. M.; Buffet, P. A.; Poespoprodjo, J. R.; Yeo, T. W.; White, N. J.; Price, R. N. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. ***Malar J, 11***:135. 2012.

Duarte, E. C.; Pang, L. W.; Ribeiro, L. C.; Fontes, C. J. F. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. ***Am J Trop Med Hyg, 65***:471-6. 2001.

Duffy, P. E; Sahu, T.; Akue, A.; Milman, N.; Anderson, C. Pre-erythrocyticmalariavaccines: identifying the targets. ***Expert Rev Vaccines, 11***(10):1261–80. 2012.

Eskdale, J.; Gallagher, G.; Verweij, C. L.; Keijsers, V.; Westendorp, R. G.; Huizinga, T. W. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. ***Proc Natl Acad Sci USA, 95***(16):9465–70. 1998.

Faik, I.; van Tong, H.; Lell, B.; Meyer, C. G.; Kremsner, P. G.; Velavan, T. P. Pyruvate Kinase and Fcγ Receptor Gene Copy Numbers Associated With Malaria Phenotypes. ***J Infect Dis, 216***(2):276-282. 2017.

Faik, I.; de Carvalho, E. G.; Kun, J. F. J. Parasite-host interaction in malaria: genetic clues and copy number variation. ***Genome Med, 1***(9): 82. 2009.

Fang, X.D.; Kaslow, D.C.; Adams, J.H.; Miller, L. H. Cloning of the Plasmodium vivax Duffy receptor. ***Mol. Biochem. Parasitol, 44***: 125–132. 1991.

Feitosa, R. N.; Vallinoto, A. C.; Vasconcelos, P. F.; Azevedo, Rdo. S.; Azevedo, V. N.; Machado, L. F.; Lima, S. S.; Ishak, Mde. O.; Ishak, R. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. ***Viral Immunol, 29***(7):379-88. 2016.

Fernandes, A. A.; Carvalho, L. J.; Zanini, G. M.; Ventura, A. M.; Souza, J. M.; Cotias, P. M.; Silva-Filho, I. L.; Daniel-Ribeiro, C. T. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in the Brazilian Amazon region. ***Clin Vaccine Immunol,15***(4): 650-8. 2008.

Ferreira, I. M.; Yokoo, E. M.; Souza-Santos, R.; Galvão, N. D.; Atanaka-Santos, M. Factors associated with the incidence of malaria in settlement areas in the district of Juruena, Mato Grosso state, Brazil. ***Cien Saude Colet, 17***:2415–2424. 2012.

Freitas, F. B.; Lima, S. S.; Feitosa. R. N.; Azevedo, V. N.; Ishak, Mde. O.; Ishak, R.; Vallinoto, A. C. Polymorphisms in the IFNγ, IL-10, and TGFβ Genes May Be Associated with HIV-1 Infection. ***Dis Markers, 2015***: 248571. 2015.

Furini, A. A. C.; Cassiano, G. C.; Capobianco, M. P.; Dos Santos, S. E.; Dantas Machado, R. L. Frequency of TNFA, INFG and IL10 gene polymorphisms and

their association with malaria vivax and genomic ancestry. ***Mediators Inflamm, 2016***:1-12. 2016a.

Furini A. A., Capobianco M. P., Storti-Melo L.M., Cunha M.G., Cassiano G. C., and Machado R. L. Cytokine gene polymorphisms are not associated with anti-PvDBP, anti-PvAMA-1 or anti-PvMSP-119 IgG antibody levels in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. ***Malar J, 15***(1): 374. 2016b.

Galinski, M. R.; Medina, C. C.; Ingravallo, P.; Barnwell, J. W. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. ***Cell 69***: 1213-1226. 1992.

Galinski, M. R.; Barnwell, J. W. Plasmodium vivax: who cares? ***Malar J, 7***(Suppl 1):S9. 2008.

Gazzinelli, R. T.; Kalantari, P.; Fitzgerald, K. A.; Golenbock, D. T. Innate sensing of malaria parasites. ***Nat Rev Immunol, 14***(11):744–57. 2014.

Genton, B.; D'Acremont, V.; Rare, L.; Baea, K.; Reeder, J. C.; Alpers, M. P.; Muller, I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. ***PLoS Med, 5***(6): e127. 2008.

Gething, P.W.; Patil, A.P.; Smith, D.L.; Guerra, C.A.; Elyazar, I.R.; Johnston, G.L.; Tatem, A.J.; Hay, S.I. A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010. ***Malar J, 10***: 378. 2011.

Gething, P.W.; Elyazar, I.R.; Moyes, C.L.; Smith, D.L.; Battle, K.E.; Guerra, C.A.; Patil, A.P.; Tatem, A.J.; Howes, R.E.; Myers, M.F.; George, D.B.; Horby, P.; Wertheim, H.F.; Price, R.N.; Mueller, I.; Baird, J.K.; Hay, S.I. A long neglected world malaria map: Plasmodium vivax endemicity in 2010. ***PLoS Negl Trop Dis, 6***: e1814. 2012.

Geraghty, D. E.; Daza, R.; Williams, L. M.; Vu, Q.; Ishitani, A. Genetics of the immune response: identifying immune variation within the MHC and throughout the genome. ***Immunol Rev, 190***:69-85. 2002.

Gimenez, F.; Barraud de Lagerie, S.; Fernandez, C.; Pino, P.; Mazier, D. Tumor necrosis factor a in the pathogenesis of cerebral malaria. ***Cell Mol Life Sci, 60***(8): 1623-35. 2003.

Gosain, A. and Gamelli, R. L. A primer in cytokines. ***J Burn Care Rehabil, 26***: 7-12, 2005.

Gonçalves, B. P.; Sagara, I.; Coulibaly, M.; Wu, Y.; Assadou, M. H.; Guindo, A.; Ellis, R. D.; Diakite, M.; Gabriel, E.; Prevots, D. R.; Doumbo, O. K.; Duffy, P. E. Hemoglobin variants shape the distribution of malaria parasites in human populations and their transmission potential. ***Sci Rep, 7***(1):14267. 2017.

Gourley, I. S.; Kurtis, J. D.; Kamoun, M.; Amon, J. J.; Duffy, P. E. Profound bias in the interferon-g and interleukin-6 allele frequencies in western Kenya, where severe malarial anemia is common in children. ***J infect dis, 186***: 1007-1012. 2002.

Grant, A. V.; Roussilhon, C.; Paul, R.; Sakuntabhai, A. The genetic control of immunity to *Plasmodium* infection. ***BMC Immunol, 16***(14): 1–7. 2015.

Greenwood, B.; Marsh, K.; Snow, R. Why do some African children develop severe malaria? ***Parasitol Today, 7***(10):277-81. 1991.

Griffing, S. M.; Tauil, P. L.; Udhayakumar, V.; Silva-Flannery, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 110***: 701–718. 2015.

Gueirard, P.; Tavares, J.; Iberge, S.; Bernex, F.; Ishino, T.; Milon, G. Franke-Fayard, B.; Janse, C. J.; Ménard, R.; Amino, R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. ***Proc Natl Acad Sci U S A, 107***(43): 18640–5. 2010.

Guindalini, C. and Tufik, S. Use of microarrays in the search of gene expression patterns: application to the study of complex phenotypes. ***Rev Bras Psiquiatr, 29***(4):370-4. 2007.

Guo, Y.; Traurig, M.; Ma, L.; Kobes, S.; Harper, I.; Infante, A. M.; Bogardus, C.; Baier, L. J.; Prochazka, M. CHRM3 gene variation is associated with decreased acute insulin secretion and increased risk for early-onset type 2 diabetes in Pima Indians. ***Diabetes, 55***(12):3625-9. 2006.

Guo, S. and Thompson, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. ***Biometrics, 48***: 361-372. 1992.

Hajeer, A. H. and Hutchinson, I. V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. ***Hum Immunol, 62***(11):1191-9. 2001.

Haldane, J. B. S. The rate of mutation of human genes. ***Hereditas, 35***:267–73. 1949.

Hanf, M.; Stephani, A.; Basurko, C.; Nacher, M.; Carme, B. Determination of the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Camopi, French Guiana. ***Malar J, 8***:278. 2009.

Harrington, L. E.; Hatton, R. D.; Mangan, P. R.; Turner, H.; Murphy, T. L.; Murphy, K. M.; Weaver, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. ***Nat Immunol, 6***(11):1123-32. 2005.

Harteveld, C. L. and Higgs, D. R. Alpha-thalassaemia. ***Orphanet J Rare Dis, 5***:13. 2010.

Hemmer, C. J.; Holst, F. G. E.; Kern, P.; Chiwakata, C. B.; Dietrich, M.; Reisinger, E. C. Stronger host response per parasitized erythrocyte in Plasmodium vivax or ovale than in Plasmodium falciparum malaria. ***Trop Med Int Health, 11***(6): 817-823. 2006.

Herrera, S.; Corradin, G.; Arévalo-Herrera, M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. ***Trends Parasitol, 23***(3):122-8. 2007.

Higgs, D. R.; Vickers, M. A.; Wilkie, A. O.; Pretorius, I. M.; Jarman, A. P.; Weatherall, D. J. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. ***Blood, 73***(5):1081-104. 1989.

Hill, A. V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. ***Annu Rev Genet, 40***:469-86. 2006.

Hoffmann, S. C.; Stanley, E. M.; Cox, E. D.; DiMercurio, B. S.; Koziol, D. E.; Harlan, D. M.; Kirk, A. D.; Blair, P. J. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. ***Am J Transplant, 2***(6):560-7. 2002.

Hojo‐Souza, N. S.; Pereira, D. B.; De Souza, F. S. H.; Mendes, T. A. O.; Cardoso, M. S.; Tada, M. S.; Zanini, G. M.; Bartholomeu, D. C.; Fujiwara, R. T.; Bueno, L. L. On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. ***Malar J, 16***: 42. 2017.

Hollox, E. J. and Hoh, B. P. Human gene copy number variation and infectious disease. ***Hum Genet, 133***(10):1217-33. 2014.

Horuk, R.; Chitnis, C. E.; Darbonne, W. C.; Colby, T. J.; Rybicki, A.; Hadley, T. J.; Miller, L. H. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. ***Science, 261***:1182–1184. 1993.

Howes, R.E.; Battle, K.E.; Mendis, K.N.; Smith, D.L.; Cibulskis, R.E.; Baird, J.K.; Hay, S.I. Global Epidemiology of Plasmodium vivax. ***Am J Trop Med Hyg, 95***(Suppl 6): 15–34. 2016.

Howes, R.E.; Patil, A.P.; Piel, F.B.; Nyangiri, O.A.; Kabaria, C.W.; Gething, P.W.; Zimmerman, P.A.; Barnadas, C.; Beall, C.M.; Gebremedhin, A.; Menard, D.; Williams, T.N.; Weatherall, D.J.; Hay, S.I. The global distribution of the Duffy blood group. ***Nat Commun, 2***: 266. 2011.

Huik, K.; Sadam, M.; Karki, T.; Avi, R.; Krispin, T.; Paap, P.; Rüütel, K.; Uusküla, A.; Talu, A.; Abel-Ollo, K.; Lutsar, I. CCL3L1 Copy Number Is a Strong Genetic Determinant of HIV Seropositivity in Caucasian Intravenous Drug Users. ***J Infect Dis, 201***(5):730–739. 2010.

Hulden, L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. ***Malar J, 10***:90.2011;

Hunt, N. H. and Grau, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. ***TRENDS immunol, 24***(9): 491-499, 2003.

Hunt, N. H.; Ball, H. J.; Hansen, A. M.; Khaw, L. T.; Guo, J.; Bakmiwewa, S.; Mitchell, A. J,.; Combes, V.; Grau, G. E. Cerebral malaria: gamma-interferon redux. ***Front Cell Infect Microbiol, 4***:113. 2014.

Hviid, L.; Kurtzhals, J. A.; Adabayeri, V.; Loizon, S.; Kemp, K.; Goka, B. Q.; Lim, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Akanmori, B. D.; Behr, C. Perturbation and proinflammatory type activation of V delta 1(+) gamma delta T cells in African children with *Plasmodium falciparum* malaria. ***Infect Immun, 69***(5):3190–6. 2001.

Iafrate, J. A.; Feuk, L., Rivera, M. N.; Listewnik, M. L.; Donahoe, P. K.; Qi, Y.; Scherer, S. W.; Iafrate, C. L. Detection of large-scale variation in the human genome. ***Nature Genetics, 36***:949-951. 2004.

Israelsson, E.; Ekström, M.; Nasr, A.; Dolo, A.; Kearsley, S.; Arambepola, G.; Homann, M. V.; Maiga, B.; Doumbo, O. K.; Elghazali, G.; Giha, H. A.; Troye-Blomberg, M.; Berzins, K.; Tornvall, P. Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. ***Malar J, 8***:136. 2009.

Iyer, S. S. and Cheng, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. ***Crit Rev Immunol, 32***(1):23-63. 2012.

Jairajpuri, Z. S.; SafiaRana; Hassan, M. J.; Nabi, F.; Jetley, S. An Analysis of Hematological Parameters as a Diagnostic test for Malaria in Patients with Acute Febrile Illness: An Institutional Experience. ***Oman Medical Journal, 29***(1): 12-17. 2014.

Jakeman, G. N.; Saul, A.; Hogarth, W. L.; Collins, W. E. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. ***Parasitology. 119*** (Pt 2):127-33. 1999.

Jat, K. R.; Guglani, V.; Khairwa, A. Severe and complicated Plasmodium vivax malaria in children.***Tropical doctor. 42***(4): 185-7. 2012.

Karunaweera, N. D.; Grau, G. E.; Gamage, P.; Carter, R.; Mendis, K. N. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. ***Proc Natl Acad Sci U S A, 89***: 3200-3203. 1992.

Karunajeewa, H. A.; Mueller, I.; Senn, M.; Lin, E.; Law, I.; Gomorrai, P. S. A trial of combination antimalarial therapies in children from Papua New Guinea. ***N Engl J Med, 11***: 359-83. 2008.

Kaur, G.; Rapthap, C. C.; Kumar, N.; Kumar, S.; Neolia, S.; Mehra, N. K. Frequency distribution of cytokine gene polymorphisms in the healthy North Indian population. ***Tissue Antigens, 69***(2): 113-120. 2007.

Kaushik, J. S.; Gomber, S.; Dewan, P. Clinical and epidemiological profiles of severe malaria in children from Delhi, India. ***J Health Popul Nutr, 30***(1):113-116. 2012.

Kellar, K. L. and Douglass, J. P. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. ***J Immunol Methods, 279***(1-2):277-85. 2003.

Keen, J. K.; Sinha, K. A.; Brown, K. N.; Holder, A. A. A gene coding for a high-molecular mass rhoptry protein of *Plasmodium yoelii*. ***Mol Biochem Parasitol, 65***: 171–177. 1994.

Kern, P.; Hemmer, C. J.; Van Damme, J.; Gruss, H. J.; Dietrich, M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. ***Am J Med, 87***: 139-43. 1989.

Khasnis, A. A. and Nettleman, M. D. Global warming and infectious disease. ***Arch Med Res, 36***:689-96. 2005.

Khatoon, L.; Baliraine, F.N.; Bonizzoni, M.; Malik, S.A.; Yan, G. Prevalence of antimalarial drug resistance mutations in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from a malaria-endemic area of Pakistan. ***Am J Trop Med Hyg, 81*** (3): 525–8. 2009.

Khim, N.; Andrianaranjaka, V.; Popovici, J.; Kim, S.; Ratsimbasoa, A.; Benedet, C.; Barnadas, C.; Durand, R.; Thellier, M.; Legrand, E.; Musset, L.; Menegon, M.; Severini, C.; Nour, B.Y.; Tichit, M.; Bouchier, C.; Mercereau-Puijalon, O.; Ménard, D. Effects of mefloquine use on Plasmodium vivax multidrug resistance. ***Emerg Infect Dis, 20*** (10): 1637–44. 2014.

Kitchen, S. F. The infection of reticulocytes by Plasmodium vivax. ***Am. J. Trop. Med. Hyg, 18***: 347–353. 1938.

Kochar, D. K.; Das, A.; Kochar, S. K.; Saxena, V.; Sirohi, P.; Garg, S.; Kochar, A.; Khatri, M. P.; Gupta, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. ***Am J Trop Med Hyg, 80***(2):194-8. 2009.

Kochar, D. K.; Tanwar, G. S.; Khatri, P. C.; Kochar, S. K.; Sengar, G. S.; Gupta, A.; Kochar, A.; Middha, S.; Acharya, J.; Saxena, V.; Pakalapati, D.; Garg, S.; Das, A. Clinical features of children hospitalized with malaria--a study from Bikaner, northwest India. ***Am J Trop Med Hyg, 83***(5):981-9. 2010.

Korn, T.; Bettelli, E.; Gao, W.; Awasthi, A.; Jäger, A.; Strom, T. B.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K. “IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells,” ***Nature, 448***(7152): 484–487. 2007.

Kuhn, L.; Schramm, D. B.; Donninger, S.; Meddows-Taylor, S.; Coovadia, A. H.; Sherman, G. G.; Gray, G. E.; Tiemessen, C, T. African infants' CCL3 gene copies influence perinatal HIV transmission in the absence of maternal nevirapine. ***AIDS, 21***:1753–1761. 2007.

Kumar, A. and Katiyar, G. P. Mixed infection with *Plasmodium vivax* and Salmonella

typhi in an infant. ***Indian pediatrics, 32***(2):243-4. 1995.

Kumar, M.; Sahu, R. K, Goyal, A.; Sharma, S.; Kaur, N.; Mehrotra, R.; Singh, U. R.; Hedau, S. BRCA1 Promoter Methylation and Expression - Associations with ER+, PR+ and HER2+ Subtypes of Breast Carcinoma. ***Asian Pac J Cancer Prev, 18***(12):3293-3299. 2017.

Kute, V. B.; Trivedi, H. L.; Vanikar, A. V.; Shah, P. R.; Gumber, M. R.; Patel, H. V.; Goswami, J. G.; Kanodia, K. V. *Plasmodium vivax* malaria-associated acute kidney injury, India, 2010-2011. ***Emerg Infect Dis, 18***(5):842-5. 2012.

Kwiatkowski, D. P. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. ***Am J Hum Genet, 77***(2): 171–192. 2005.

Lacerda, M. V.; Hipolito, J. R.; Passos, L. N. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. ***Rev Soc Bras Med Trop, 41***: 522-523. 2008.

Lacerda, M. V.; Mourao, M. P.; Coelho, H. C.; Santos, J. B. Thrombocytopenia in malaria: who cares? ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 106*** Suppl 1: 52-63. 2011.

Lacerda, M. V.; Fragoso, S. C.; Alecrim, M. G.; Alexandre, M. A.; Magalhaes, B. M.; Siqueira, A. M. Ferreira, L. C.; Araújo, J. R.; Mourão, M. P.; Ferrer, M.; Castillo, P.; Martin-Jaular, L.; Fernandez-Becerra, C.; del Portillo, H.; Ordi, J.; Alonso, P. L.; Bassat, Q. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? ***Clin Infect Dis, 55***(8): e67-74. 2012a

Lacerda, M. V.; Mourão, M. P.; Alexandre, M. A.; Siqueira, A. M.; Magalhães, B. M.; Martinez-Espinosa, F. E.; Filho, F. S.; Brasil, P.; Ventura, A. M.; Tada, M. S.; Couto, V. S.; Silva, A. R.; Silva, R. S.; Alecrim, M. G. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. ***Malar J, 9***(11):12. 2012b.

Lampah, D. A.; Yeo, T. W.; Hardianto, S. O.; Tjitra, E.; Kenangalem, E.; Sugiarto, P.; Price, R. N.; Anstey, N. M. Coma associated with microscopy-diagnosed Plasmodium vivax: a prospective study in Papua, Indonesia. ***PLoS neglected tropical diseases, 5***(6):e1032. 2011.

Lanca, E. F.; Magalhaes, B. M.; Vitor-Silva, S.; Siqueira, A. M.; Benzecry, S. G.; Alexandre, M. A.; O'Brien, C.; Bassat, Q.; Lacerda, M. V. Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. ***PloS one, 7***(4):e35406. 2012

Lane, J.; McLaren, P. J, Dorrell, L.; Shianna, K. V.; Stemke, A.; Pelak K, Moore S, Oldenburg J, Alvarez-Roman MT, Angelillo-Scherrer A, Boehlen F, Bolton-Maggs PH, Brand B, Brown D, Chiang E, Cid-Haro AR, Clotet B, Collins P, Colombo S, Dalmau J, Fogarty P, Giangrande P, Gringeri A, Iyer R, Katsarou O, Kempton C, Kuriakose P, Lin J, Makris M, Manco-Johnson M, Tsakiris DA, Martinez-Picado J, Mauser-Bunschoten E, Neff A, Oka S, Oyesiku L, Parra R, Peter-Salonen K, Powell J, Recht M, Shapiro A, Stine K, Talks K, Telenti A, Wilde J, Yee TT, Wolinsky SM, Martinson J, Hussain SK, Bream JH, Jacobson LP, Carrington M, Goedert JJ, Haynes BF, McMichael AJ, Goldstein DB, Fellay J; NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI). A genome-wide association study of resistance to HIV infection in highly exposed uninfected individuals with hemophilia A. ***Hum Mol Genet, 22***(9):1903-10. 2013.

Langhorne, J.; Ndungu, F. M.; Sponaas, A. M.; Marsh, K. Immunity to malaria: more questions than answers. ***Nat Immunol, 9***:725–32. 2008.

Leong, I. U. S.; Sucich, J.; Prosser, D. O.; Skinner, J. R.; Crawford, J. R.; Higgins, C.; Love, D. R. Array comparative genomic hybridization identifies a heterozygous deletion of exon 3 of the RYR2 gene. ***Ups J Med Sci, 120***(3): 190–197. 2015.

Leonard, W. J. and Spolski, R. “Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation,” N***at Rev Immunol, 5***(9): 688-698. 2005.

Liehl, P.; Meireles, P.; Albuquerque, I. S.; Pinkevych, M.; Baptista, F.; Mota, M. M.; Davenport, M. P.; Prudêncio, M. Innate immunity induced by *Plasmodium* liver infection inhibits malaria reinfections. ***Infect Immun, 83***:1172–80. 2015.

Li, F.; Li, X.; Zou, G. Z.; Gao, Y. F.; Ye, J. Association between TLR7 copy number variations and hepatitis B virus infection outcome in Chinese. ***World J Gastroenterol, 23***(9):1602-1607. 2017.

Lindenau, J. D.; Salzano, F. M.; Guimaraes, L. S. P.; Callegari-Jacques, S. M.;

Hurtado, A. M.; Hill, K. R.; Petzl-Erler, M. L.; Tsuneto, L. T.; Hutz M. H. Distribution patterns of variability for 18 immune system genes in Amerindians – relationship with history and epidemiology. ***Tissue Antigens, 82***: 177–185. 2013.

Livingstone, F. B. The Duffy blood groups, vivax malaria, and malaria selection in human populations: a review. ***Hum Biol, 56***: 413–425. 1984.

Liu, S.; Yao, L.; Ding, D.; Zhu, H. CCL3L1 Copy Number Variation and Susceptibility to HIV-1 Infection: A Meta-Analysis. ***PLoS One, 5***(12): e15778. 2010.

López, C.; Yepes-Pérez, Y.; Hincapié-Escobar, N.; Díaz-Arévalo, D.; Patarroyo, M. A. What Is Known about the Immune Response Induced by Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidates? ***Front Immunol, 8*** :126. 2017.

Lorente, L.; Martín, M. M.; Pérez-Cejas, A.; Barrios, Y.; Solé-Violán, J.; Ferreres, J.; Labarta, L.; Díaz, C.; Jiménez, A. Association between Interleukin-6 Promoter Polymorphism (-174G/C), Serum Interleukin-6 Levels and Mortality in Severe Septic Patients. ***Int J Mol Sci, 17***(11). 2016.

Lowther, C.; Merico, D.; Costain, G.; Waserman, J.; Boyd, K.; Noor, A.; Speevak, M.; Stavropoulos, D. J.; Wei, J.; Lionel, A. C.; Marshall, C. R.; Scherer, S. W.; Bassett, A. S. Impact of IQ on the diagnostic yield of chromosomal microarray in a community sample of adults with schizophrenia. ***Genome Med, 9***(1):105. 2017.

Lyke, K. E.; Burges, R.; Cissoko, Y.; Sangare, L.; Dao, M.; Diarra, I.; Kone, A.; Harley, R.; Plowe, C. V.; Doumbo, O. K.; Sztein, M. B. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. I***nfect Immun, 72***(10):5630-7. 2004.

Lu, Q. K.; Zhang, J. T.; Zhao, N.; Wang, H. Y.; Tong, Q. H.; Wang, S. L. Association of IL-6 Gene (-174 and -572 G/C) Polymorphisms with Proliferative Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in a Chinese Population. ***Ophthalmic Res, 58***(3):162-167. 2017.

Lupski, J. R. Genomic rearrangements and sporadic disease. ***Nat Genet, 39***:S43-47. 2007.

Mackinnon, M. J.; Mwangi, T. W.; Snow, R. W.; Marsh, K.; Williams, T. N. Heritability of malaria in Africa. ***PLoS Med, 2***(12):e340. 2005.

Mackintosh, C. L.; Beeson, J. G.; Marsh, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. ***Trends Parasitol, 20***(12): 597-603. 2004.

MacMurray, J.; Comings, D. E.; Napolioni, V. The gene-immune-behavioral pathway: Gamma-interferon (IFN-!) simultaneously coordinates susceptibility to infectious disease and harm avoidance behaviors," ***Brain Behav Immun, 35***: (169–175). 2014.

Mahgoub, H.; Gasim, G. I.; Musa, I. R.; Adam, I. Severe *Plasmodium vivax* malaria among Sudanese children at New Halfa Hospital, eastern Sudan. ***Parasit Vectors, 5***: 154. 2012.

Malaguarnera, L. and Musumeci, S. The immune response to Plasmodium falciparum malaria. ***Lancet infect dis, 2***: 472-478. 2002.

Manolova, I.; Miteva, L.; Ivanova, M.; Kundurzhiev, T.; Stoilov, R.; Stanilova, S. The SynergisticEffect of *TNFA* and *IL10* Promoter Polymorphisms on Genetic Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. ***Genet Test Mol Biomarkers, 22***(2): 1-6. 2018.

Markus, M. B. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. ***Parasitol Res, 108***:247-52. 2011.

McCall M. B. B. and Sauerwein R. W. Interferon-γ-central mediator of protective immune responses against the preerythrocytic and blood stage of malaria. ***J Leukoc Biol, 88***(6): 1131–1143. 2010.

Mendes, C.; Dias, F.; Figueiredo, J.; Mora, V. G.; Cano, J.; De Sousa, B.; do Rosário, V. E.; Benito, A.; Berzosa, P.; Arez, A. P. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax* - molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). ***PLoS Negl Trop Dis, 5*** (6): e1192. 2011.

Medina, T. S.; Costa, S. P. T.; Oliveira, M. D.; Ventura, A. M.; Souza, J. M.; Gomes, T. F.; Vallinoto, A. C.; Póvoa, M. M.; Silva, J. S.; Cunha, M. G. Increased interleukin-10 and interferon-γ levels in Plasmodium vivax malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. ***Malar J, 10***: 264. 2011.

Mendis, K. N. and Carter, R. The role of cytokine in *Plasmodium vivax* malaria. ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 87***: 51-55. 1992.

Mendonça, V. R. R.; Souza, L. C. L.; Garcia, G. G.; Magalhães, B. M.; Lacerda, M. V.; Andrade, B. B.; Gonçalves, M. S.; Barral-Netto, M. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene SNP and association with clinical outcomes of patients with *P vivax* malaria. ***Malar J, 13***:278. 2014.

Ménard, D.; Barnadas, C.; Bouchier, C.; Henry-Halldin, C.; Gray, L. R.; Ratsimbasoa, A.; Thonier, V.; Carod, J. F.; Domarle, O.; Colin, Y.; Bertrand, O.; Picot, J.; King, C. L.; Grimberg, B. T.; Mercereau-Puijalon, O.; Zimmerman, P. A. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. ***Proc Natl Acad Sci USA, 107***: 5967–5971. 2010.

Mesquita, Jr. D.; Cruvinel, W. M.; Câmara, N. O. S.; Kállas, E. G.; Andrade, L. E. C. Autoimmune diseases in the TH17 era. ***Braz J Med Biol Res, 42***(6):476-486. 2009.

Miller, L. H.; Mason S. J.; Clyde D. F.; McGinniss, M. H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. ***N Engl J Med, 295*** (6): 302-304.1976.

Miller, J. L.; Sack, B. K.; Baldwin, M.; Vaughan, A. M.; Kappe, S. H. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. ***Cell Rep, 7*** (2):436–47. 2014.

Mills, R. E.; Walter, K.; Stewart, C.; Handsaker, R. E.; Chen, K.; Alkan, C.; Abyzov, A.; Yoon, S. C.; Ye, K.; Cheetham, R. K. Chinwalla, A.; Conrad, D. F.; Fu, Y.; Grubert, F.; Hajirasouliha, I.; Hormozdiari, F.; Iakoucheva, L. M.; Iqbal, Z.; Kang, S.; Kidd, J. M.; Konkel, M. K.; Korn, J.; Khurana, E.; Kural, D.; Lam, H. Y.; Leng, J.; Li, R.; Li, Y.; Lin, C. Y.; Luo, R.; Um, X. J.; Nemesh, J.; Peckham, H. E.; Rausch, T.; Scally, A.; Shi, X.; Stromberg, M. P.; Stütz, A. M.; Urban, A. E.; Walker, J. A.; Wu, J.; Zhang, Y.; Zhang, Z. D.; Batzer, M. A.; Ding, L.; Marth, G. T.; McVean, G.; Sebat, J.; Snyder, M.; Wang, J.; Ye, K.; Eichler, E. E.; Gerstein, M. B.; Hurles, M. E.; Lee, C.; McCarroll, S. A.; Korbel, J. O.; 1000 Genomes Project. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. ***Nature, 470***:59–65. 2011.

Moraes, M. O.; Santos, A. R.; Schonkeren, J. J. M.; Vanderborght, P. R.; Ottenhoff, T. H.; Moraes, M. E.; Moraes, J. R.; Sampaio, E. P.; Sarno, E. N.; Huizinga, T. W. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. ***Immunogenetics, 54***(12):896–9. 2003.

Mosmann, T.R. and Moore, K.W. The role of IL-10 in cross regulation of TH1 and TH2 responses. ***Immunol Today, 12***(3): A49–53. 1991.

Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A.; Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. ***J Immunol, 136***(7): 2348-57.1986

Mueller, I.; Galinski, M. R.; Tsuboi, T.; Arevalo-Herrera, M.; Collins, W. E.; King, C. L. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. ***Adv Parasitol, 81***():77-131. 2013.

Muley, A.; Lakhani, J.; Bhirud, S.; Patel, A. Thrombocytopenia in Plasmodium vivax Malaria: How Significant? ***J Trop Med, 2014***: 1-4. 2014.

Mwakalinga, S. B.; Wang, C. W.; Bengtsson, D. C.; Turner, L.; Dinko, B.; Lusingu, J. P.; Arnot, D. E.; Sutherland, C. J.; Theander, T. G.; Lavstsen, T. Expression of a type B RIFIN in *Plasmodium falciparum* merozoites and gametes. ***Malar J, 11***:429. 2012.

Nautiyal, A.; Singh, S.; Parmeswaran, G.; DiSalle M. Hepatic dysfunction in a patient with *Plasmodium vivax* infection. ***Med Gen Med, 7***(1): 8. 2005.

Nahrevanian, H. Immune effector mechanisms of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity versus cytoprotection. ***Braz. J. Infect. Dis, 10***(4): 283-292. 2006.

Nasr, A.; Allam, G.; Hamid, O.; Al-Ghamdi, A. IFN-gamma and TNF associated with severe falciparum malaria infection in Saudi pregnant women. ***Malar J, 13***: 314. 2014.

Nguyen, T. N.; Baaklini, S.; Koukouikila-Koussounda, F.; Ndounga, M.; Torres, M.; Pradel, L.; Ntoumi, F.; Rihet, P. Association of a functional TNF variant with Plasmodium falciparum parasitaemia in a congolese population. ***Genes Immun, 18***(3):152-157. 2017.

Nedwin, G. E.; Naylor, S. L.; Sakaguchi, A. Y.; Smith, D.; Jarrett-Nedwin, J.; Pennica, D.; Goeddel, D. V.; Gray, P. W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. ***Nucleic Acids Res, 13***: 6361-73. 1985.

Nudelman, S.; Renia, L.; Charoenvit, Y.; Yuan, L.; Miltgen, F.; Beaudoin. R. L.; Mazier D. Dual action of anti-sporozoite antibodies in vitro. ***J Immunol, 143***:996–1000. 1989.

Nogueira, F. H.; Moreira-Campos, L. M.; Santos, R. L.; Pianetti, G. A. Quality of essential drugs in tropical countries: evaluation of antimalarial drugs in the Brazilian Health System. ***Rev Soc Bras Med Trop, 44***:582-6. 2011.

Nussenblatt, V.; Mukasa, G.; Metzger, A.; Ndeezi, G.; Garrett, E.; Semba, R. D. Anemia and Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Erythropoietin Levels among Children with Acute, Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. ***Am Society for Microbiol, 8***: 1164-1170. 2001.

Olaniyan, S. A.; Amodu, O. K.; Bakare, A. A.; Troye-Blomberg, M.; Omotade, O. O.; Rockett, K. A.; MalariaGEN Consortium. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphism, TNF-238 is associated with severe clinical outcome of falciparum malaria in Ibadan southwest Nigeria. ***Acta Trop, 161***:62-7. 2016.

Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M. V. G.; Brasil, P.; Ladislau, J. L. B.; Tauil, P. L.; Daniel-Ribeiro, C. T. Malaria in Brazil: an overview. ***Malar J, 9***: 115. 2010.

Ozen, M.; Gungor, S.; Atambay, M.; Daldal, N. Cerebral malaria owing to *Plasmodium vivax*: case report. ***Ann Trop Paediatr, 26***: 141-144. 2006.

Ouma, C..; Davenport, G. C..; Were, T.; Otieno, M. F.; Hittner, J.B.; Vulule, J.M.; Martinson, J.; Ong'echa, J. M.; Ferrell, R. E.; Perkins, D. J. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. ***Hum Genet, 124***(5): 515–524. 2008.

Park, H.; Li, Z.; Yang, X. O.; Chang, S. H.; Nurieva, R.; Wang, Y. H.; Wang, Y.; Hood, L.; Zhu, Z.; Tian, Q.; Dong, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. ***Nat Immunol, 6***(11): 1133-41. 2005.

Parkin, J. and Cohen, B. An overview of the immune system. ***Lancet, 357***: 1777-89. 2001.

Pelak, K.; Need, A. C.; Fellay, J.; Shianna, K. V.; Feng, S.; Urban, T. J.; Ge, D.; De Luca, A.; Martinez-Picado, J.; Wolinsky, S. M.; Martinson, J. J.; Jamieson, B. D.; Bream, J. H.; Martin, M. P.; Borrow, P.; Letvin, N.L.; McMichael, A. J.; Haynes, B. F.; Telenti, A.; Carrington, M.; Goldstein, D. B.; Alter, G. and on behalf of NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI). Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. ***PLoS Biol, 9***(11):e1001208. 2011.

Pereira, V. A.; S´anchez-Arcila, J. C.; Teva, A.; Perce-da-Silva, D. S.; Vasconcelos, M. P.; Lima, C. A.; Aprígio, C. J.; Rodrigues-da-Silva, R. N.; Santos, D. O.; Banic, D. M.; Bonecini-Almeida, M. G.; Lima-Júnior, J. C.; Oliveira-Ferreira, J. "IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals fromendemic area of the Brazilian Amazon," ***Malar J, 14***:30. 2015.

Pereira, E. A.; Ishikawa, E. A. Y.; Fontes, C. J. F. Adherence to *Plasmodium vivax* malaria treatment in the Brazilian Amazon Region. ***Malar J, 10***:355. 2011.

Picot, S. Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? ***Med Mal Infect, 36***: 406-413. 2006.

Pied, S.; Roland, J.; Louise, A.; Voegtle, D.; Soulard, V.; Mazier, D.; Cazenave, P. A. Liver CD4-CD8- NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. ***J Immunol, 164***(3):1463–9. 2000.

Popadic, D.; Savic, E.; Spuran, Z.; Markovic, M.; Mostarica Stojkovic, M.; Ramic, Z.; Pravica, V. Distinctive frequencies of +874T/A IFN-γ gene polymorphism in a healthy Serbian population. ***Clin Transl Sci, 5***(6):461-3. 2012.

Praba-Egge, A. D.; Montenegro, S.; Arevalo-Herrera, M.; Hopper, T.; Herrera, S.; James, M. A. Human cytokine responses to meso-endemic malaria on the Pacific Coast of Colombia. ***Ann Trop Med Parasitol, 97***(4): 327–37. 2003.

Pradel, G.; Frevert, U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. ***Hepatology, 33***(5): 1154-1165. 2001.

Prajapati, S. K.; Singh, O. P. Insights into the invasion biology of *Plasmodium vivax*. ***Front Cell Infect Microbiol, 5***(3):8. 2013.

Prakash, D.; Fesel, C.; Jain, R.; Cazenave, P. A.; Mishra, G. C.; Pied, S. Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum–infected patients from endemic areas of Central India. ***J Infect Dis, 194***: 198-207. 2006.

Prakash, J.; Singh, A. K.; Kumar, N. S.; Saxena, R. K. Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria. ***J Assoc Physicians India, 51***: 265-7. 2003.

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. ***Hum Immunol, 61***(9):863-6. 2000.

Price, R.N.; Von Seidlein, L.; Valecha, N.; Nosten, F.; Baird, J.K.; White, N.J. Global extent of chloroquine-resistant Plasmodium vivax: a systematic review and meta-analysis. ***Lancet Infect Dis, 14*** (10): 982–91. 2014.

Price, R.N.; Tjitra, E.; Guerra, C.A.; Yeung, S.; White, N.J.; Anstey, N.M. Vivax malaria: neglected and not benign. ***Am J Trop Med Hyg 77***: 79–87. 2007.

Pukrittayakamee, S.; Chantra, A.; Simpson, J. A.; Vanijanonta, S.; Clemens, R.; Looareesuwan, S.; White, N. J. Therapeutic responses to different antimalarial drugs in vivax malaria. ***Antimicrob Agents Chemother, 44***:1680-5. 2000.

Queiroz, A.; Sousa, R.; Heine, C.; Cardoso, M.; Guimarães, L. H.; Machado, P. R.; Carvalho, E. M.; Riley, L. W.; Wilson, M. E.; Schriefer, A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. ***J Clin Microbiol, 50***(12):4028-34. 2012.

Quispe, A.M.; Pozo, E.; Guerrero, E.; Durand, S.; Baldeviano, G.C.; Edgel, K.A.; Graf, P.C.F.; Lescano, A.G. *Plasmodium vivax* hospitalizations in a monoendemic malaria region: severe vivax malaria? ***Am J Trop Med Hyg, 91***: 11–17. 2014.

Rayner, J. C.; Huber, C. S.; Galinski, M. R.; Barnwell, J. W. Rapid evolution of an erythrocyte invasion gene family: the Plasmodium reichenowi Reticulocyte Binding Like (RBL) genes. ***Mol Biochem Parasitol, 133***: 287–296. 2004.

Rayner, J. C.; Galinski, M. R.; Ingravallo, P.; Barnwell, J. W. Two Plasmodium falciparum genes express merozoite proteins that are related to Plasmodium vivax and Plasmodium yoelii adhesive proteins involved in host cells election and invasion. ***Proc Natl Acad Sci U.S.A, 97***: 9648–9653. 2000.

Rénia, L.; Goh, Y. S. Malaria Parasites: The Great Escape. ***Front Immunol, 7***:1–14. 2016.

Ren, F. H.; Yang, H.; He, R. Q.; Lu, J. N.; Lin, X. G.; Liang, H. W.; Dang, Y. W.; Feng, Z. B.; Chen, G.; Luo, D. Z. Analysis of microarrays of miR-34a and its identification of prospective target gene signature in hepatocellular carcinoma. ***BMC Cancer, 18***(1):12. 2018.

Restrepo, E.; Imwong, M.; Rojas, W.; Carmona-Fonseca, J.; Maestre, A. High genetic polymorphism of relapsing Plasmodium vivax isolates in northwest Colombia. ***Acta Trop, 119***:23-9. 2011.

Rieckmann., K; Davis, D.; Hutton, D. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? ***Lancet, 334*** (8673): 1183–4. 1989.

Rijken, M. J.; McGready, R.; Boel, M. E.; Poespoprodjo, R.; Singh, N.; Syafruddin, D.; Rogerson, S.; Nosten, F. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. ***Lancet infect dis, 12***(1): 75-88. 2012.

Riley, E. M.; Wahl, S.; Perkins, D. J. Schofield L. Regulating immunity to malaria. ***Parasite Immunol, 28***(1-2): 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. ***J clin microbiol, 29*** (9): 2076-2078, 1991.

Rodriguez, L. E.; Urquiza, M.; Ocampo, M.; Curtidor, H.; Suarez, J.; Garcia, J.; Vera, R.; Puentes, A.; López, R.; Pinto, M.; Rivera, Z.; Patarroyo, M. E. *Plasmodium vivax* MSP-1peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. ***Vaccine, 20***: 1331–1339. 2002.

Rodriguez-Morales, A. J.; Sanchez, E.; Vargas, M.; Piccolo, C.; Colina, R.; Arria, M.; Franco-Paredes, C. Is anemia in *Plasmodium vivax* malaria more

frequent and severe than in *Plasmodium falciparum*? ***Am J Med, 119***: e9-10. 2006.

Ryan, J. R.; Stoute, J. A.; Amon, J.; Dunton, R. F.; Mtalib, R.; Koros, J.; Owour, B.; Luckhart, S.; Wirtz, R. A.; Barnwell, J. W.; Rosenberg, R. Evidence for transmission of Plasmodium vivax among a duffy antigen negative population in Western Kenya. ***Am J Trop Med Hyg, 75***: 575–581. 2006.

Sampaio, V. S.; Siqueira, A. M.; Alecrim, M.; Mourao, M. P.; Marchesini, P. B.; Albuquerque, B. C.; Nascimento, J.; Figueira, E. A.; Alecrim, W. D.; Monteiro, W. M.; Lacerda, M. V. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. ***Rev Soc Bras Med Trop, 48***(Suppl 1): 4–11. 2015.

Santovito, A.; Gendusa, C.; Matini, A.; Ferraro, F.; Musso, I.; Costanzo, M.; Delclos, A.; Cervella, P. Frequency distribution of six cytokine gene polymorphisms in North- and South-Italy. ***Int J Immunogenet, 44***(4): 1–6. 2017.

Schofield, L.; Grau, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. ***Nat Rev Immunol, 5***(9):722–35. 2005.

Schwenk, R.; Lumsden, J. M.; Rein, L. E.; Juompan, L.; Kester, K. E.; Heppner, D. G.; Krzych, U. Immunization with the RTS,S/AS malaria vaccine induces IFN-y(+)CD4 T cells that recognize only discrete regions of the circumsporozoite protein and these specificities are maintained following booster immunizations and challenge. ***Vaccine, 29***:8846–54. 2011.

Seixas, E. M.; Fonseca, L.; Langhorne, J. The influence of gammadelta T cells on the CD4+ T cell and antibody response during a primary *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. ***Parasite Immunol, 24***:131–40. 2002.

Sepúlveda, N.; Manjurano, A.; Campino, S. G.; Lemnge, M.; Lusingu, J.; Olomi, R.; Rockett, K. A.; Hubbart, C.; Jeffreys, A.; Rowlands, K.; Clark, T. G.; Riley, E. M.; Drakeley, C. J.; MalariaGEN Consortium. Malaria Host Candidate Genes Validated by Association with Current, Recent, and Historical Measures of Transmission Intensity. ***J Infect Dis, 216***(1):45-54. 2017.

Seoh, J. Y.; Khan, M.; Park, S. H.; Park, H. K.; Shin, M. H.; Ha, E. H.; Lee, B. E.; Yoo, K.; Han, H. S.; Oh, S.; Wi, J. H.; Hong, C. K.; Oh, C. H.; Kim, Y. A.; Park, J. W. Serum cytokine profiles in patients with Plasmodium vivax malaria: a

comparison between those who presented with and without hyperpyrexia. ***Am J Trop Med Hyg, 68***:102–106. 2003.

Sha, B. Y.; Yang, T. L.; Zhao, L. J.; Chen, X. D.; Guo, Y.; Chen, Y.; Pan, F.; Zhang, Z. X.; Dong, S. S.; Xu, X. H.; Deng, H. W. Genome-wide association study suggested copy number variation may be associated with body mass index in the Chinese population. ***J Hum Genet, 54***(4):199-202. 2009.

Shahbazi, M.; Abadi, J. S. A.; Roshandel, D.; Koochaki, M.; Amiri, H.; Kohansal, R.; Baghbanian, S. M.; Zamani, M. Combination of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with HLA-DRB1*15 allele is associated with multiple sclerosis. ***Indian J Med Res, 145***(6):746-752. 2017.

Shea, P. R.; Shianna, K. V.; Carrington, M.; Goldstein, D. B. Host genetics of HIV acquisition and viral control. ***Annu Rev Med, 64***:203–217. 2013.

Shostakovich-Koretskaya, L.; Catano, G.; Chykarenko, Z. A.; He, W.; Gornalusse, G.; Mummidi, S.; Sanchez, R.; Dolan, M. J.; Ahuja, S. S.; Clark, R. A.; Kulkarni, H.; Ahuja, S. K. Combinatorial content of CCL3L and CCL4L gene copy numbers influence HIV-AIDS susceptibility in Ukrainian children. ***AIDS, 23***:679–688. 2009.

Silvino, A. C.; Costa, G. L.; Araújo, F. C.; Ascher, D. B.; Pires, D. E.; Fontes, C. J.; Carvalho, L. H.; Brito, C. F.; Sousa, T. N. Variation in Human Cytochrome P-450 Drug-Metabolism Genes: A Gateway to the Understanding of Plasmodium vivax Relapses. ***PLoS One, 11***(7):e0160172. 2016.

Simões, L. R.; Junior, E. R. A.; Ribatski-Silva, D.; Gomes, L. T.; Nery, A. F.; Fontes, C. J. R. Fatores associados às recidivas de malária causada por *Plasmodium vivax* no Município de Porto Velho, Rondônia, Brasil, 2009. ***Cad. Saúde Pública, 30***(7): 1403-1417. 2014.

Singer, B. H.; Castro, M. C. Agricultural Colonization and Malaria on the Amazon Frontier. ***Ann N Y Acad Sci, 954***: 184-222. 2001.

Singh, A. P.; Buscaglia, C. A.; Wang, Q.; Levay, A.; Nussenzweig, D. R.; Walker, J. R.; Winzeler, E. A.; Fujii, H.; Fontoura, B. M.; Nussenzweig, V. Plasmodium circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. ***Cell, 131***(3): 492–504. 2007.

Sinha, A.; Singh, G.; Bhat, A. S.; Mohapatra, S.; Gulati, A.; Hari, P.; Samantaray, J. C.; Dinda, A. K.; Agarwal, S. K.; Bagga, A. Thrombotic microangiopathy and acute kidney injury following vivax malaria. ***Clin Exp Nephrol,17***(1): 66-72. 2013.

Sinnis, P.; Coppi, A. A long and winding road: The Plasmodium sporozoite's journey in the mammalian host. ***Parasitol Int. 56***(3): 171–8. 2007.

Siqueira, A. M.; Mesones-Lapouble, O.; Marchesini, P.; Sampaio, V. S.; Brasil, P.; Tauil, P. L.; Fontes, C. J.; Costa, F. T. M.; Daniel-Ribeiro, C. T.; Lacerda, M. V. G.; Damasceno, C. P.; Santelli, A. C. S. Plasmodium vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. ***Am J Trop Med Hyg, 95***(Suppl 6): 87–96. 2016.

SIVEP-MALÁRIA. Sistema de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde. 2017. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/sivep_ malaria> Acesso em: 27 de dezembro de 2017.

Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Jarra, W. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infection. ***Mol Biochem Parasitol, 58*** (2): 283-292. 1993.

Sodsai, P.; Nakkuntod, J.; Kupatawintu, P.; Hirankarn, N. Distribution of cytokine gene polymorphisms in Thai population. ***Tissue Antigens, 77***: 593–597. 2011.

Sortica, V. A.; Cunha, M. G.; Ohnishi, M. D. O.; Souza, J. M.; Ribeiro-Dos-Santos, A. K. C.; Santos, N. P. C.; Callegari-Jacques, S. M.; Santos, S. E. B.; Hutz, M. H. *IL1B, IL4R, IL12RB1* and *TNF* gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. ***Malar J, 11***:409. 2012.

Sortica, V. A.; Cunha, M. G.; Ohnishi, M. D.; Souza, J. M.; Ribeiro-dos-Santos, Â. K.; Santos, S. E.; Hutz, M. H. Role of *IL6*, *IL12B* and *VDR* gene polymorphisms in *Plasmodium vivax* malaria severity, parasitemia and gametocytemia levels in an Amazonian Brazilian population. ***Cytokine, 65***(1):42-7. 2014.

Srinivas, R.; Agarwal, R.; Gupta, D. Severe sepsis due to severe falciparum malaria and leptospirosis co-infection treated with activated protein C. ***Malar J, 6***:42. 2007.

Stankiewicz, P. and Lupski, J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. ***Annu Rev Med, 61***:437-55. 2010.

Stevenson, M. M. and Riley, E. M. Innate Immunity to malaria. ***Nat Rev Immunol, 4***(3):169-80. 2004.

Sturm, A.; Amino, R.; Van de Sand, C.; Regen, T.; Retzlaff, S.; Rennenberg, A.; Krueger, A.; Pollok, J. M.; Menard, R.; Heussler, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. ***Science, 313***(5791): 1287-1290. 2006.

Suárez-Mutis, M. C.; Cuervo, P.; Leoratti, F. M. S.; Moraes-Avila, S. L.; Ferreira, A. W.; Coura, F. O. J. R. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. ***Rev Inst Med Trop S Paulo, 49***(3): 159-164. 2007.

Sun, Y.; Lu, Y.; Li, T.; Xie, L.; Deng, Y.; Li, S.; Qin, X. Interferon Gamma +874T/A Polymorphism Increases the Risk of Hepatitis Virus-Related Diseases: Evidence from a Meta-Analysis. ***PLoS One, 10***(5):e0121168. 2015.

Suwanarusk, R.; Chavchich, M.; Russell, B.; Jaidee, A.; Chalfein, F.; Barends, M.; Prasetyorini, B.; Kenangalem, E.; Piera, K. A.; Lek-Uthai, U.; Anstey, N. M.; Tjitra, E.; Nosten, F.; Cheng, Q.; Price, R. N. Amplification of pvmdr1 associated with multidrug-resistant Plasmodium vivax. ***J Infect Dis, 198*** (10):1558–64. 2008.

Tada, M. S.; Ferreira, R. G. M.; Katsuragawa, T. H.; Martha, R. C. D.; Costa, J. D. N.; Albrecht, L.; Wunderlich, G.; Da Silva, L. H. P. Asymptomatic infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon Basin: to treat or not to treat? ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 107***(5). 2012.

Tanwar, G. S.; Khatri, P. C.; Sengar, G. S.; Kochar, A.; Kochar, S. K.; Middha, S.; Tanwar, G.; Khatri, N.; Pakalapati, D.; Garg, S.; Das, A.; Kochar, D. K. Clinical profiles of 13 children with *Plasmodium vivax* cerebral malaria. ***Ann Trop Paediatr, 31***(4): 351-6. 2011.

Tauil, P.L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. ***Mem Inst Oswaldo Cruz, 106***(Suppl 1): 105-6. 2011.

Tesmer, L. A.; Lundy, S. K.; Sarkar, S.; Fox, D. A. Th17 cells in human disease. ***Immunol Rev, 223***:87-113. 2008.

Tjitra, E.; Anstey, N. M.; Sugiarto, P.; Warikar, N.; Kenangalem, E.; Karyana, M.; Lampah, D. A.; Price, R. N. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. ***PLoS Med, 5***(6): e128. 2008.

Trampuz, A.; Jereb, M.; Muzlovic, I.; Prabhu, R. M. Clinical review: Severe malaria. ***Crit Care, 7***(4): 315–323. 2003.

Trent, J. M.; Olson, S.; Lawn, R. M. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. ***Proc Natl Acad Sci U S A, 79***(24): 7809-7813. 1982.

Tripathi, T. and Aggarwal, A. NF-kappa B transcription factor: a key player in the generation of immune response. ***Curr Sci India, 90***:519–531. 2006.

Turner, D. M.; Williams, D. M.; Sankaran, D.; Lazarus, M.; Sinnott, P. J.; Hutchinson, I. V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. ***Eur J Immunogenet, 24***(1):1–8. 1997.

Vallinoto, A. C.; Graça, E. S.; Araújo, M. S.; Azevedo, V. N.; Cayres-Vallinoto, I.; Machado, L. F.; Ishak, M. O.; Ishak, R. *IFNG* +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. ***Hum Immunol, 71***(7):692-6. 2010.

Van Braeckel-Budimir, N.; Gras, S.; Ladell, K.; Josephs, T. M.; Pewe, L.; Urban, S. L.; Miners, K. L.; Farenc, C.; Price, D. A.; Rossjohn, J.; Harty, J. T. A T Cell Receptor Locus Harbors a Malaria-Specific Immune Response Gene. ***Immunity, 47***(5):835-847.e4. 2017.

Vanderberg, J. P. and Frevert, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. ***Int J Parasitol, 34***:991–6. 2004.

Vázquez-Villamar, M.; Palafox-Sánchez, C. A.; Hernández-Bello, J.; Muñoz-Valle, J. F.; Valle, Y.; Cruz, A.; Alatorre-Meza, A. I.; Oregon-Romero, E. Frequency distribution of interleukin-10 haplotypes (-1082 A>G, -819 C>T, and -592 C>A) in a Mexican population. ***Genet Mol Res, 15***(4). 2016.

Ventura, A. M.; Pinto, A. Y.; Silva, R. S.; Calvosa, V. S.; Silva Filho, M. G.; Souza, J. M. *Plasmodium vivax* malaria in children and adolescents -

epidemiological, clinical and laboratory features. ***J Pediatr (Rio J), 75***(3):187-94. 1999.

Visentainer, J. E. L.; Sell, A. M.; da Silva, G. C.; Cavichioli, A. D. G.; Franceschi, D. S. A.; Lieber, S. R.; de Souza, C. A. *TNF, IFNG, IL6, IL10* and *TGFB1* gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. ***Int J Immunogenet, 35*** (4-5), 287-293. 2008.

Vittor, A. Y.; Pan, W.; Gilman, R. H, Tielsch, J.; Glass, G.; Shields, T.; Sánchez-Lozano, W.; Pinedo, V. V.; Salas-Cobos, E.; Flores, S.; Patz, J. A. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. ***Am J Trop Med Hyg, 81***(1):5-12. 2009.

Wenisch, C.; Linnau, K. F.; Looaresuwan, S.; Rumpold, H. plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe *Plasmodium falciparum* malaria. ***J Infect Dis, 179***:747–50. 1999.

White, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. ***Malar J, 10***: 297. 2011.

White, N. J.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T. T.; Faiz, M. A.; Mokuolu, O. A.; Dondorp, A. M. Malaria. ***Lancet, 383***(9918):723-35. 2014.

Wilson, A. G.; Symons, J. A.; McDowell, T. L.; McDevitt, H. O.; Duff, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor-α promoter on transcriptional activation. ***Immunol, 94***:3195-9. 1997.

Wilson, J. N.; Rockett, K.; Jallow, M.; Pinder, M.; Sisay-Joof, F.; Newport, M.; Newton, J.; Kwiatkowski, D. Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. ***Genes Immun, 6***(6):462-6. 2005.

Wilson, K. L.; Xiang, S. D.; Plebanski, M. A Model to Study the Impact of Polymorphism Driven Liver-Stage Immune Evasion by Malaria Parasites, to Help Design Effective Cross-Reactive Vaccines. ***Front Microbiol, 7***:303. 2016.

Williams, T. N.; Maitland, K.; Phelps, L.; Bennett, S.; Peto, T. E.; Viji, J.; Timothy, R.; Clegg, J. B.; Weatherall, D. J.; Bowden, D. K. *Plasmodium vivax*: a cause of malnutrition in young children. ***QJM, 90***: 751–757.1997.

WHO, World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.

WHO, World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

WHO, World Malaria Report. Monitoring and evaluation. 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1> Acesso em: 27.12.2017.

Wu, Z.; Sun, Y.; Zhu, S.; Tang, S.; Liu, C.; Qin, W. Association of Interferon Gamma +874T/A Polymorphism and Leukemia Risk: A Meta-Analysis. ***Medicine (Baltimore), 95***(12):e3129. 2016.

Wurtz, N.; Mint Lekweiry, K.; Bogreau, H.; Pradines B., Rogier, C.; Ould Mohamed Salem Boukhary, A.; Hafid, J. E.; Ould Ahmedou Salem, M. S.; Trape, J. F.; Basco, L. K.; Briolant, S. Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. ***Malar J, 10***: 336. 2011.

Yamauchi, L. M.; Coppi, A.; Snounou, G.; Sinnis, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. ***Cell Microbiol, 9***(5):1215–22. 2007.

Yeo, T. W.; Lampah, D. A.; Gitawati, R.; Tjitra, E.; Kenangalem, E.; McNeil, Y. R.; Darcy, C. J.; Granger, D. L.; Weinberg, J. B.; Lopansri, B. K.; Price, R. N.; Duffull, S. B.; Celermajer, D. S.; Anstey, N. M. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. ***J Exp Med, 204***(11):2693-704. 2007.

Zeyrek, F. Y.; Kurcer, M. A.; Zeyrek, D.; Simsek, Z. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. ***Parasite Immunol, 28***: 201-207. 2006.

Zhang, J. M. and An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. ***Int Anesthesiol Clin, 45***(2): 27–37. 2007.

Zheng, Z.; Yu, R.; Gao, C.; Jian, X.; Quan, S.; Xing, G.; Liu, S.; Liu, Z. Low copy number of FCGR3B is associated with lupus nephritis in a Chinese population. ***Exp Ther Med, 14***(5): 4497–4502. 2017.

ANEXO I

FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA VIVAX E HELMINTOSES INTESTINAIS EM 3D: DINÂMICA, DIVERSIDADE E DIVERSIDADE EM UMA ÁREA ENDÊMICA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Dados Demográficos e Epidemiológicos:

Código:	Data de Notificação: ____/_____/_____	Nome:			Sexo:
Idade:	Data de Nascimento: ____/_____/_____	Residente: [ ] Não [ ] Sim	Quanto tempo:	Procedente de garimpo: [ ] Não [ ] Sim Qual_____	
Gestação: [ ]Não [ ]Sim		Escolaridade: [ ] analfabeto, [ ] fundamental incompleto; [ ] fundamental completo; [ ] médio incompleto; [ ] médio completo; [ ] superior incompleto; [ ] superior completo		Data do Sintoma inicial:	
Local do sintoma:		Malária anterior: [ ]1 [ ]2 [ ]3 [ ]4 [ ] >4		Primoinfecção: [ ]Não [ ]Sim Último episódio:_____	
Auto medicação (7 dias): [ ] Artecom [ ] Antibiótico [ ] Anti-inflamatório [ ] Anti-helminticoQual:_____					

Avaliação Clínica:

A intensidade das manifestações clínicas deverá ser registrada conforme o escore que se segue: 0- Ausente; 1- leve (incomoda pouco); 2- moderado (incomoda e limita em parte); 3- Intenso (incomoda muito)								**Informações Adicionais**
Sintoma	**Escore**	**Sintoma**	**Escore**	**Sintoma**	**Escore**	**Sintoma**	**Escore**	Peso
Febre		Dor abdominal		Sangramento nasal		Artralgia		
Calafrio		Diarreia		Sangramento gengival		Mialgia		Altura
Cefaleia		Melena		Anorexia		Lombalgia		
Sudorese		Náusea		Oligúria		Astenia		IMC
Tosse		Vômitos		Colúria		Tontura		Circunferência abdominal
Dispneia		Hematêmese		Hematúria		Prostação		
Temperatura corporal:								

Resultados de investigação microscópica:

1. Investigação microscópica (realizada no campo):
   Espécie: _____
   Parasitemia: _____

2. Investigação microscópica (realizada no laboratório):
   Espécie: _____
   Parasitemia: _____

Assinatura do investigador principal _____

Data: [___/___/_____]

OBS: Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará guardada nos arquivos das instituições responsáveis pela entrevista e coleta do paciente e sob a responsabilidade do pesquisador e a outra será entregue aos participantes do estudo, sendo que todas as duas vias estarão assinadas por quem de direito.

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução nº 466/2012 – CNS)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME

(PACIENTE):_____

ENDEREÇO

COMPLETO:_____

BAIRRO:_____CEP:_____CIDADE:

_____

ESTADO:_____FONE1:_____FONE2:_____

_____

DOCUMENTO DE INDENTIDADE: _____

II – DADOS SOBRE O ESTUDO

1.Título:*Epidemiologia da Malária vivax e Helmintoses Intestinais em 3D: Dinâmica, Distribuição e Diversidade em uma Área Endêmica a Amazônia Brasileira*

2. Equipe responsável: Ricardo Luiz Dantas Machado PhD, Martin Joannes Enk PhD, Ana Maria Revoredo da Silva Ventura PhD, José Luiz Fernandez Vieira PhD, Rosana Maria Feio Libonati PhD e Stefan Geiger PhD.

III. EXPLICAÇÕES SOBRE O PROJETO DE PESQUISA AO PACIENTE

1. A malária é uma doença muito frequente na Amazônia e causada por parasitos chamados plasmódios;

2. A infecção de vermes intestinais com o agente de malária pode ter o quadro de anemia acentuado;

3. Visando esclarecer alguns desses aspectos, convidamos você a participar desta pesquisa. Para conduzir os estudos, precisaremos realizar uma coleta do sangue da ponta dos dedos para preparação de lâminas de Gota Espessa (GE) e Distensão Sanguínea para diagnóstico da doença. Serão também coletadas amostras de sangue (10 mL) da veia do braço para realizar os estudos genéticos e sorológicos e fezes para realização do exame parasitológico. As coletas de sangue serão realizadas com materiais descartáveis e estéreis. Geralmente, não há dor no local da coleta, mas pode ocorrer de intensidade

limitada e por pouco tempo, em casos de coletas de sangue da veia. Serão entregues frascos limpos para o exame de fezes;

4. Algumas complicações decorrentes da coleta de sangue podem ocorrer como manchas roxas no local da coleta devido à retirada da agulha pelo profissional antes do garrote ou por perfuração da veia; alergia ao álcool a 70% usado para limpeza local ou contaminações devido à má limpeza feita ou uso de material não-descartável (estéril) contaminado;

5. É assegurado o diagnóstico e o tratamento de todos os pacientes com malária, independente da participação neste estudo;

6. A participação neste estudo é voluntária e você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento regular;

7. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes/indivíduos, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente/indivíduo;

8. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exame e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação;

9. O material biológico obtido poderá ser utilizado para esta pesquisa e será armazenado uma alíquota no Laboratório de Malária e no Laboratório de Parasitoses Intestinais, Esquistossomose e Malacologia da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas para a realização em outras pesquisas decorrentes deste estudo. Nova solicitação de utilização dessas amostras será realizada junto ao Comitê de Ética;

10. Para obtenção de quaisquer informações e esclarecimentos, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis no Instituto Evandro Chagas, situado na Rodovia Br 316, s/ nº - Bairro: Levilândia, CEP: 67030–000. Telefone para contacto: (0xx91) 3214–2150. Poderá também contactar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, situado no mesmo endereço citado anteriormente. Telefone para contacto: (0xx91) 3214–2237, sob Coordenação do Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro.

11. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

IV. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos? **( )SIM ( )NÃO**
2. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento ou do menor do qual sou responsável?
( )SIM ( )NÃO
3. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo?
( )SIM ( )NÃO
4. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?
( )SIM ( )NÃO
5. Fui esclarecido de que a segurança da minha identidade ou do menor do qual sou responsável será preservada, mantendo-se as informações em caráter confidencial?
( )SIM ( )NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme acima definido, autorizo a minha participação ou do menor do qual sou responsável, na qualidade de paciente no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Itaituba, _____ de _____ de _____.

_____

_____

Assinatura Paciente ou do Responsável Legal Assinatura e carimbo do Pesquisador

Impressão digital

Documento em duas vias

Rubrica em todas as páginas do TCLE do participante da pesquisa e o pesquisador responsável

ANEXO III

WORKSHEET

Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack, Lot 004

Cat. # CYTGEN, PCYTGEN

Name ☐ Patient ☐ Male ☐ Donor ☐ Female

Sample I.D. Race Birthdate ABO/Rh

Disease Relationship to Patient

TNF-α Results

TGF-β1 Results

IL-10 Results

IL-6 Results

IFN-γ Results

Tray Exp. Date

Tray Dot #

D-mix Lot #/Batch #

POSITIONS		1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
RESULTS (mark positive locations)																	
PRODUCT SIZE (bp)		750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	250	250	175	175	250	250
SPECIFICITY *		Neg Ctrl	TNF-α promoter -308A	TNF-α promoter -308G	TGF-β1 codon 10T	TGF-β1 codon 10C	TGF-β1 codon 25C	TGF-β1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN-γ Intron 1 +874T	IFN-γ Intron 1 +874A
TNF-α	G/G (low)			■													
	G/A (high)		■	■													
	A/A(high)		■														
TGF-β1	T/T G/G (high)				■			■									
	T/C G/G (high)				■	■		■									
	T/C G/C (intermediate)				■	■	■	■									
	C/C G/G (intermediate)					■		■									
	T/T G/C (intermediate)				■		■	■									
	C/C G/C (low)					■	■	■									
	C/C C/C (low)					■	■										
	T/T C/C (low)				■		■										
	T/C C/C (low)				■	■	■										
IL-10	GCC/GCC (high)									■			■				
	GCC/ACC (intermediate)									■	■		■				
	GCC/ATA (intermediate)								■	■		■	■				
	ACC/ACC (low)										■		■				
	ACC/ATA (low)								■		■	■	■				
	ATA/ATA (low)								■			■					
IL-6	G/G (high)														■		
	G/C (high)													■	■		
	C/C (low)													■			
IFN-γ	T/T (high)															■	
	T/A (intermediate)															■	■
	A/A (low)																■

Photo Documentation

Test Performed by Date

Read by Date

Reviewed by Date

* Note: Low, Intermediate and High refer to gene expression levels.

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge St., Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com

Template: Templ_CYTGEN_WS, Rev 0