

Marcela Petrolini Capobianco

Polimorfismos dos Genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS*, associados na co-estimulação dos Linfócitos B, em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium vivax* na Amazônia Brasileira.

São José do Rio Preto
2013

Marcela Petrolini Capobianco

Polimorfismos dos Genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS*, associados na co-estimulação dos Linfócitos B, em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium vivax* na Amazônia Brasileira.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

São José do Rio Preto
2013

Capobianco, Marcela Petrolini

Polimorfismos dos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* associados na co-estimulação dos Linfócitos B em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium vivax* na Amazônia brasileira/ Marcela Petrolini Capobianco. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

56 f. : il. 5; 30 cm.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. *Plasmodium vivax*, 2. Polimorfismos, 3. Malária, 4. Resposta imune. I. Machado, Ricardo Luiz Dantas. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.936

Marcela Petrolini Capobianco

Polimorfismos dos Genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS*, associados na co-estimulação dos Linfócitos B, em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium vivax* na Amazônia Brasileira.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Karin Kirchgatter
SUCEM – São Paulo

São José do Rio Preto
22/fevereiro/2013

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Mauro e Maria de Fátima, a minha irmã Mirela e ao meu namorado
Evandro, pelo incentivo constante, confiança e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, pela dedicação, ensinamentos, exemplo e pelo carinho;

A Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética, Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, pela dedicação e pelo apoio;

Ao Laboratório “Centro de Investigação de Microrganismos” (CIM) e a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP);

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Genética pelos ensinamentos e dedicação;

Aos meus pais e todos os demais familiares pela torcida, pelo carinho e pelo apoio a cada momento de desânimo;

Aos amigos do Laboratório “Centro de Investigação de Microrganismos” (CIM), pela convivência prazerosa e pelo compartilhamento e incentivo em todos os momentos de angústia, alegria, prazer e satisfação que fizeram parte deste trabalho;

Aos amigos Gustavo e Ana Livia, pelo grande apoio nas Análises Estatísticas que foram realizadas neste estudo;

Ao meu namorado, Evandro, pela compreensão, pela dedicação, pela torcida e pelo companheirismo;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Plasmodium vivax é a espécie mais prevalente de malária no Brasil. O processo co-evolutivo parasita-hospedeiro pode ser visto como uma "ferramenta", na qual trocas genéticas adaptativas podem influenciar na diversidade da população. Objetivo: Investigar polimorfismos de genes envolvidos na resposta imune humoral visando identificar possíveis associações com a malária. Material e Métodos: a amostra foi constituída por 103 pacientes com malária vivax não complicada e como grupo controle 97 indivíduos não-maláricos. A identificação dos SNPs -726T>C no gene *CD40L*, -1 C>T no gene *CD40* e -871C>T no gene *BLYS* foram efetuadas pelo método de PCR-RFLP. As frequências genótípicas, alélicas e de indivíduos portadores de cada alelo foram estimadas por contagem direta. Também foram comparadas as frequências genótípicas observadas com as esperadas segundo o teorema de Hardy e Weinberg. Resultados: As frequências genótípicas e alélicas para esses SNPs não diferiram estatisticamente entre pacientes e indivíduos do grupo controle. A combinação dos genótipos entre os genes *CD40* e *BLYS* e entre *CD40L* e *BLYS* não revelou interação gênica na população estudada. Não foi observada associação entre resposta imune humoral e parasitemia nos indivíduos maláricos com os polimorfismos dos genes investigados. Ambos os genes se encontram em equilíbrio de Hardy e Weinberg. Conclusões: Os resultados deste estudo sugerem que as variantes genéticas analisadas nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* não afetam a funcionalidade das moléculas de modo que possa interferir na susceptibilidade a doença, mas estas variantes podem influenciar o curso clínico em vez de simplesmente aumentar ou diminuir a susceptibilidade.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*; Polimorfismos; Malária; Resposta Imune.

ABSTRACT

Plasmodium vivax is the most prevalent malaria species in Brazil. The parasite-host coevolutionary process can be viewed as an 'arms race', in which adaptive genetic changes in one are eventually matched by alterations in the other. Objectives: following the candidate gene approach we analyzed the CD40, CD40L and BLYS genes that participate in B-cell co-stimulation, for associations with *P. vivax* malaria. Methods: the study sample included 97 patients and 103 controls. We extracted DNA using the extraction and purification commercial kit and identified the following SNPs: -1C>T in the CD40 gene, -726T>C in the CD40L gene and the -871C>T in the BLYS gene using PCR-RFLP. We analyzed the genotype and allele frequencies by direct counting. We also compared the observed with the expected genotype frequencies using the Hardy-Weinberg Equilibrium. Results: The allele and genotype frequencies for these SNPs did not differ statistically between patient and control groups. Gene-gene interactions were not observed between the CD40 and BLYS and between the CD40L and BLYS genes. Overall, the genes were in Hardy-Weinberg Equilibrium. Significant differences were not observed among the frequencies of antibody responses against *P. vivax* sporozoite and erythrocytic antigens and the CD40 and BLYS genotypes. Conclusions: the results of this study show that, although the investigated CD40, CD40L and BLYS alleles differ functionally, this variation does not alter the functionality of the molecules in a way that would interfere in susceptibility to the disease. Significance: The variants of these genes may influence the clinical course rather than simply increase or decrease susceptibility.

Keywords: Plasmodium vivax; Polymorphisms; Malaria; Immune Response

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Região do cromossomo em que o gene <i>CD40</i> se encontra.	20
Figura 2	Esquema mostrando o cromossomo X, onde se localiza o gene <i>CD40L</i> .	21
Figura 3	Desenvolvimento de uma resposta imune específica após a interação da molécula <i>CD40</i> com seu ligante <i>CD40L</i>	22
Figura 4	Esquema proposto para ativação das células B nos centros germinativos (modificado de Hase <i>et al.</i> , 2004).	24
Figura 5	Organização genômica de <i>BLYS</i> e localização dos SNPs descritos por Kawasaki <i>et al.</i> (2002).	24
Figura 6	Padrão de bandas obtido após eletroforese, para os genótipos possíveis para o gene <i>CD40L</i>	28
Figura 7	Padrão de bandas obtido após eletroforese, para os genótipos possíveis para o gene <i>CD40</i>	29
Figura 8	Padrão de bandas obtido após eletroforese, para os genótipos possíveis para o gene <i>BLYS</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos nos genes <i>CD40</i> , <i>CD40L</i> e <i>BLYS</i> em pacientes maláricos e indivíduos do grupo controle, de uma área endêmica brasileira	34
Tabela 2	O efeito combinado do SNP na posição -871 C>T no gene <i>BLYS</i> com o SNP na posição -1 C>T no gene <i>CD40</i> em pacientes e controles.	35
Tabela 3	Características epidemiológicas e sorológicas basais dos indivíduos infectados com <i>Plasmodium vivax</i> entre os diferentes genótipos dos genes <i>CD40</i> e <i>BLYS</i> .	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMA - 1	Antígeno 1 de membrana apical
BCR	Receptor de Célula B
CSP	Proteína circunsporozoítica
DARC	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
DBP	Proteína de ligação ao antígeno Duffy
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GE	Método de Diagnóstico – Gota Espessa
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
MSP	Proteína da Superfície do Merozoíto
OR	Odds ratio
<i>P. vivax-like</i>	<i>Plasmodium vivax-like</i>
PCR-RFLP	<i>Polimerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism</i>
PvDBP	<i>P. vivax Duffy Binding Protein</i>
PvMSP1	<i>P. vivax Merozoite Surface Protein 1</i>
RI	Região I do gene da Proteína circunsporozoítica
RII	Região II do gene da Proteína circunsporozoítica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	MALÁRIA - ABORDAGEM GERAL	13
1.2	MALÁRIA VIVAX	14
1.3	RESPOSTA IMUNE E MALÁRIA VIVAX	17
1.4	GENES ASSOCIADOS NA CO-ESTIMULAÇÃO DO LINFÓCITO B	19
1.5	JUSTIFICATIVA	25
1.6	HIPÓTESE	26
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAL E MÉTODO	27
3.1	ÁREA DE ESTUDO	27
3.2	AMOSTRA	27
3.3	GENOTIPAGEM	28
3.4	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA SOROLÓGICA CONTRA ANTÍGENOS DO <i>P. vivax</i>	31
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4	RESULTADOS	33
4.1	ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NOS GENES <i>CD40</i> , <i>CD40L</i> E <i>BLYS</i>	33
4.2	ANÁLISE COMBINADA DOS POLIMORFISMOS <i>CD40</i> E <i>BLYS</i>	35
4.3	ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS <i>CD40L</i> , <i>BLYS</i> , PARASITEMIA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS	36
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	50
	ANEXO A: RESUMO APRESENTADO NO XVIII INTERNATIONAL CONGRESS FOR TROPICAL MEDICINE AND MALARIA AND XLVIII CONGRESSO F THE BRAZILIAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE	51
	ANEXO B: RESUMO APRESENTADO NO 61ST THE AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE ANNUAL MEETING E PUBLICADO NO THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, VOLUME 97.	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária – abordagem geral

A malária é uma infecção de manifestação principalmente aguda, caracterizada clinicamente por ciclos de calafrios, febre alta, sudorese excessiva, incapacitando e matando mais pessoas que qualquer outra doença parasitária no mundo (HENRY et al., 1999; JAIN et al., 2010). Aproximadamente 40% da população mundial vive em áreas passíveis de transmissão. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), 104 países e territórios possuem áreas de risco de malária, sendo que estas atingem exatamente as regiões mais pobres do globo, o que a torna parte integrante do círculo vicioso pobreza-doença-pobreza. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* em 2012 (<http://www.cdc.gov>), 35 países, dos quais 30 pertencentes à África Subsaariana e 5 na Ásia, são, atualmente, os responsáveis por 98% das mortes globais pela doença, sendo a quinta causa de morte por doença infecciosa no mundo e a segunda na África. Embora a grande maioria das mortes causadas por malária ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania. Na América, a transmissão ocorre em 22 países, estimando-se que 137 milhões de pessoas vivem em áreas com distinta intensidade de transmissão, já que diferem em características sociais, econômicas e ecológicas (WHO, 2008). No Brasil, a Malária é considerada o maior problema de saúde pública nacional, com aproximadamente 306 mil casos registrados em 2009 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Os parasitos da malária são protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Atualmente, as cinco espécies reconhecidas infectando o homem são o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e, recentemente o *Plasmodium knowlesi* foi diagnosticado em humanos na Malásia. Estas espécies são diferentes morfologicamente, em suas características imunológicas, em suas distribuições geográficas, em suas formas de recaídas e também, em suas respostas a drogas disponíveis para o tratamento (MUELLER et

al., 2009; HEDRICK, 2011). Dos conhecidos parasitos da malária humana, somente o *P. falciparum*, *P. vivax* e o *P. malariae* são detectados no Brasil, com 99,7% dos casos ocorrendo na região Amazônica (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

No Brasil, o *P. vivax* tem sido a espécie mais prevalente, enquanto o *P. falciparum* foi responsável por aproximadamente 20% dos casos (ANDRADE et al., 2010). A distribuição de infecção por *P. falciparum* é focal, mais comum do que *P. vivax* em algumas áreas, mas muito raras ou ausentes em outras. Infecções mistas também são observadas e o *P. malariae* raramente tem sido detectado. A transmissão em áreas brasileiras caracteriza-se como hipo a mesoendêmica, de transmissão instável com flutuações sazonais anuais. Apesar de endêmica a malária não ocorre uniformemente em todas as áreas endêmicas do Brasil, uma vez que se observam localidades com diferentes níveis de transmissão da doença (HEMMER et al., 2006; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Na Região Extra-Amazônica, principalmente nos Estados do Paraná, Espírito Santo e São Paulo, tem sido registrados, frequentemente, surtos de malária decorrentes da introdução da doença por migrantes oriundos das áreas de transmissão, visto que esta área é receptiva para a transmissão de malária e os serviços de vigilância em saúde de alguns municípios são deficientes em estrutura adequada para enfrentar o problema (SÁEZ-ALQUÉZAR et al., 1998; MACHADO et al., 2003). Além disso, indivíduos assintomáticos, bem como símios presentes na região de Mata Atlântica podem servir como reservatórios para infecções em humanos (MARQUES, et al., 2008; YAMASAKI, et al., 2011).

1.2 Malária vivax

Embora a distribuição dos parasitos da malária seja ampla, observa-se que durante os últimos anos, as infecções causadas por *P. vivax* são responsáveis por mais de 80% dos casos de malária na Região Amazônica Brasileira. Além disso, nos últimos anos foram relatados no país, casos com complicações clínicas associadas a óbito por este protozoário, sendo um motivo de preocupação para os malariologistas brasileiros (LACERDA; HIPÓLITO; PASSOS, 2008; LACERDA et al., 2012).

O ciclo de vida do *Plasmodium* spp. é muito complexo e necessita da expressão de proteínas especializadas para garantir sua sobrevivência tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado. Este ciclo é constituído por duas fases, uma sexuada e a outra assexuada. A fase sexuada é onde ocorre a multiplicação dos parasitos nos mosquitos do gênero *Anopheles*, hospedeiro definitivo (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009) e a fase assexuada é caracterizada pela multiplicação no humano, hospedeiro intermediário, ocorrendo em células parenquimatosas do fígado ou nos eritrócitos.

A infecção tem início durante o repasto sanguíneo do mosquito fêmea infectado, o qual inocula, juntamente com a saliva, os esporozoítos presentes na corrente sanguínea. Os esporozoítos invadem os hepatócitos, crescem e se multiplicam, diferenciando-se em esquizontes hepáticos. Esta fase é denominada de esquizogonia hepática. O ciclo tem início com a maturação dos esquizontes hepáticos, os quais darão origem aos merozoítos hepáticos que serão liberados na corrente sanguínea por meio da lise dos hepatócitos e, que, posteriormente, invadirão os eritrócitos. Uma característica marcante da malária causada por *P. vivax* é a ocorrência de recaídas tardias, meses após a infecção. Isto ocorre pela presença de hipnozoítos, formas latentes do parasito que se alojam no fígado do hospedeiro e podem retomar a infecção meses após o incidente inicial (MUELLER et al., 2009). Após esta invasão, tem início a esquizogonia eritrocitária onde os merozoítos se diferenciarão em trofozoítos que por sucessivas divisões resultarão nos esquizontes eritrocitários (TUTEJA, 2007). Após a lise do eritrócito parasitado, são liberados novos merozoítos na corrente sanguínea, os quais farão a invasão de novos eritrócitos, além da sintomatologia febril associada a lise celular. Alguns merozoítos, após a invasão nos eritrócitos, podem não evoluir para a forma de esquizontes e sim, se diferenciarem nas formas sexuadas do parasito, os gametócitos feminino e masculino. Estes, quando ingeridos pela fêmea do mosquito durante o repasto sanguíneo, se desenvolvem no seu estômago, originando os macro e microgametas que, após a fertilização, iniciarão o ciclo esporogônico. O zigoto formado evolui para oocineto móvel, invadindo as células epiteliais do estômago do mosquito onde se fixa e da origem ao oocisto, que após sucessivas mitoses, originarão os esporozoítos. Estes rompem o oocisto e invadem a cavidade corporal do mosquito e migram, através da hemolinfa, para as glândulas salivares onde se acumulam no ducto salivar e tornam-se infectantes. Assim, quando o

mosquito infectado faz o repasto sanguíneo, os esporozoítos são inoculados, podendo então, iniciar uma nova infecção no hospedeiro vertebrado (COLLINS; JEFFERY, 2007; SCOTTO, 2010).

O *P. vivax* é capaz de invadir somente reticulócitos, eritrócitos jovens, que expressam em sua superfície o determinante antigênico do grupo sanguíneo Duffy (também conhecido como receptor DARC) um antígeno receptor de quimiocinas, o qual é o receptor da molécula ligante a *P. vivax Duffy Binding Protein* (PvDBP). Esta interação parece ser fundamental na formação de uma junção irreversível entre as membranas do merozoíto e da célula hospedeira, tornando-se uma etapa chave no processo de invasão aos eritrócitos. Indivíduos Duffy-negativos parecem ser completamente refratários a esta infecção (MILLER et al., 1976), embora evidências recentes na África (RYAN et al., 2006; MÉNARD et al., 2010; MENDES et al., 2011; WURTZ et al., 2011) e no Brasil (CAVASINI et al., 2007) sugerem que indivíduos Duffy negativos possam se infectar com este protozoário, provavelmente por meio de outros receptores envolvidos no reconhecimento eritrocitário (MÉNARD et al., 2010).

O processo de invasão do eritrócito pelo *Plasmodium* é complicado e envolve várias etapas, a saber: (1) reconhecimento e aderência reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; (2) reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; (3) desenvolvimento de uma junção irreversível no ponto de contato entre a porção apical do parasito e a membrana celular do eritrócito; (4) movimentação da junção ao redor do merozoíto com invaginação da membrana do eritrócito para que o parasito ocupe a porção interior da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo (DVORAK et al., 1975; MILLER et al., 1976). Estes dois eventos iniciais, envolvendo o reconhecimento e adesão do parasito, são aparentemente de baixa afinidade e reversíveis (COWMAN; CRABB, 2006). Ambas as etapas permitem ao parasito diferenciar um eritrócito competente para invasão de outro tipo celular. Além disso, a terceira e quarta etapa abrangem interações do tipo ligante-receptor de alta afinidade e, a partir deste ponto, o processo de invasão se torna irreversível.

1.3 Resposta Imune e malária vivax

A resposta imunológica contra malária vivax envolve mecanismos inatos e adaptativos, com a participação de vários tipos de células e anticorpos que podem levar a eliminação do agente ou a imunopatologia (WHALTER et al., 2006; MEDINA et al., 2011). De fato, interações célula-célula que necessitam de moléculas co-estimuladoras são essenciais para que a resposta imune seja efetiva.

A resposta imune humoral mediada por anticorpos opsonizadores podem proteger contra a invasão dos merozoítos aos eritrócitos (WAHLIN et al., 1984), além do seu crescimento intra-eritrocítico, ou ainda reduzindo o número de eritrócitos infectados da circulação ao se ligar em sua superfície (UDEINYA et al., 1981; TREUTIGER et al., 1992). O papel do sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) na resposta imune aos antígenos do *Plasmodium* tem sido amplamente investigado e diferentes associações têm sido encontradas, dependendo da população e do antígeno estudado (NARDIN et al., 2000; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; JOHNSON et al., 2004). Relatos anteriores demonstraram associações entre diferenças alélicas nos genes do HLA II e a resposta sorológica nos ensaios de vacinas para a malária. Acentuada resposta de anticorpos foi descrita em indivíduos tailandeses vacinados com antígenos de esporozoítos e a presença do alelo HLA DPB1*0501 (STEPHENS et al., 1995). Em contra partida, o alelo DRB1*0701 foi associado a níveis reduzidos de resposta de anticorpos em um ensaio de vacina realizado em voluntários dos Estados Unidos (NARDIN et al., 2000). Alelos do gene HLA-DR também tem sido associados à porção repetitiva do gene que codifica a proteína circunsporozoítica (CSP) da variante VK 247 de *P. vivax* (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004) na população brasileira. Recentemente, em pacientes com malária vivax de diferentes áreas da Amazônia Brasileira, foi observada associação entre os alelos HLA-DR3 e HLA-DR5 e falta de resposta de anticorpos a região amino terminal da proteína circunsporozoíta, bem como uma associação entre o HLA-DR3 e da resposta mais elevada de anticorpos para a proteína de superfície do merozoíto-1 (MSP1), caracterizando, portanto, um papel potencial regulador dos

alelos HLA-DRB1 na produção de anticorpos para pacientes com este tipo de malária (STORTI MELO et al., 2012).

No entanto, na comparação da resposta humoral de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, pesquisadores foram capazes de avaliar a relativa contribuição de *loci* HLA e não-HLA, e concluíram que, a regulação genética na resposta de anticorpos antígeno-específica parece não ser exclusiva dos genes HLA de classe II (DUAH et al., 2009). Assim, polimorfismos envolvidos em moléculas importantes nas diferentes etapas da produção de anticorpos, podem estar contribuindo na susceptibilidade ou resistência à malária.

O desenvolvimento de resistência à droga pelos parasitos e resistência a inseticidas pelos vetores tem comprometido os métodos tradicionais de tratamento e controle, reforçando a necessidade crítica do desenvolvimento de uma vacina para malária. A superfície do esporozoítio é recoberta por uma proteína que possui alto potencial antigênico e tem sido o principal alvo no desenvolvimento de vacinas para a malária. Nas últimas décadas, diversos estudos tem sido realizados para identificar e testar antígenos candidatos para uma vacina efetiva. O papel crucial que a resposta imune humoral desempenha na proteção contra a infecção pelos esporozoítos já foi amplamente descrito. A proteína circunsporozoíta (CSP) possui seqüências conservadas entre todas as espécies de plasmódio conhecidas (KEMP et al., 1990). Anticorpos monoclonais direcionados contra a região repetitiva deste antígeno podem bloquear a invasão da célula hospedeira e possivelmente conferir imunidade (POTOENJAK et al., 1980). O gene da CSP apresenta um domínio central formado por nucleotídeos repetidos em *tandem* que são flanqueados por duas regiões não repetitivas nas extremidades 3' e 5' do gene. Estes dois segmentos se mantêm altamente conservados nas diferentes espécies de plasmódios e são denominados região I (RI) que se localiza na direção amino-terminal e região II (RII) que se localiza a 54 aminoácidos da direção carboxi-terminal da proteína (DE LA CRUZ et al., 1988). A utilização da CSP como alvo para o desenvolvimento de vacinas tem sido reavaliada devido à descoberta de variações no gene desta proteína de espécies de *P. vivax* (ROSEMBERG, 1989; QARI et al., 1993a). A primeira variante seqüenciada apresenta um nonapeptídeo repetido em *tandem* no domínio central da proteína e foi denominada VK210 e considerada a forma clássica de *P. vivax* (ARNOT, et al 1985). Em cepas da Tailândia, Rosemberg et al., (1989) descreveram variações no nonapeptídeo da região repetitiva, sendo

essa variante conhecida como VK247. Posteriormente, em Papua Nova Guiné, Qari et al., (1993a) relataram a existência de uma variante denominada *P. vivax-like*, por ser morfológicamente semelhante ao *P. vivax*, mas por diferir na seqüência repetitiva da região central da CSP, bem como responder imunologicamente diferente aos dos dois tipos anteriormente descritos. No Brasil, Machado e Póvoa (2000) confirmaram, por diagnóstico molecular, a presença desses tipos variantes em áreas endêmicas, descrevendo a ocorrência tanto em infecções puras, enquanto que as variantes VK247 e *P. vivax-like* foram evidenciadas apenas em infecções mistas (SOUZA-NEIRAS et al., 2010).

Além disso, trabalhos com a proteína de superfície do merozoíto (MSP) e a proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP), presente no *P. vivax*, demonstraram que esses também podem estimular resposta de anticorpos, sendo estas proteínas candidatas aos testes de vacinas. Valderrama-Aguirre et al. (2005) observaram que 52,2% dos indivíduos previamente expostos ao *P. vivax* e 72,8% dos infectados com *P. vivax* desenvolveram anticorpos contra um fragmento da MSP denominado Pv200L, que se localiza na região N-terminal desta proteína. Diferentes segmentos recombinantes derivados da MSP têm sido avaliados quanto ao potencial de estimular resposta sorológica. Estudo com dois polipeptídeos recombinantes, PvMSP1₁₄ e PvMSP1₂₀ foram capazes de estimular a produção de anticorpos contra a proteína MSP, entretanto o PvMSP1₂₀ apresentou maiores níveis de resposta (BARRETO et al., 2005). A DBP é uma proteína conservada expressa na superfície do merozoíto que se interage com antígeno de grupo sanguíneo Duffy, necessário para invasão dos eritrócitos. Arevalo-Herrera et al. (2005) demonstraram que a imunização com um peptídeo recombinante da DBP de *P. vivax*, a PvRII, induz altos níveis de anticorpos específicos, mas não fornece imunidade protetora.

1.4 Genes associados na co-estimulação dos Linfócitos B

A molécula CD40 é uma proteína de aproximadamente 50 KDa, membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF), que é expresso constitutivamente por células apresentadoras de antígenos, como os linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. O gene *CD40* está localizado em 20q12-q13.2,

conforme descrito na figura 1 e sua região transcrita compreende 9 exons e 8 introns, (PARK et al., 2007). Quando a proteína CD40 se envolve com o receptor funcional ocorre uma associação com moléculas lipídicas que irão interagir com moléculas adaptadoras, promovendo assim, o processo de sinalização (XIE et al., 2006).

A expressão da proteína CD40 tem sido associada com as células apresentadoras de antígenos, mas na realidade, sua expressão é bastante onipresente, incluindo expressão neural, endotelial, epitelial, de adipócitos e de células T (WAGNER, 2009). As células endoteliais induzem a formação de moléculas de adesão em resposta à estimulação CD40-CD40L, enquanto os fibroblastos induzem a expressão de quimiocinas (VOGEL et al., 2004) e os adipócitos induzem a formação de citocinas pró-inflamatórias (POGGI et al., 2009). Diversos estudos têm investigado associações entre SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e a regulação da expressão de *CD40* em infecções e doenças auto-imunes (TOMER; CONCEPCION; GREENBERG, 2002; JACOBSON et al., 2007; RAYCHAUDHURI et al., 2008). O único SNP conhecido afetando os níveis da proteína CD40 está localizado próximo ao códon iniciador (-1C>T) (JACOBSON et al., 2007).

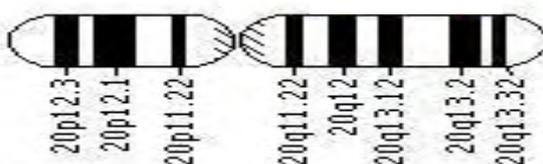


Figura 1: Esquema do cromossomo, indicando a localização do gene *CD40*.

Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CD40>. Acesso em 03/11/2012.

O gene *CD40L* está localizado no cromossomo X, na região Xq26, conforme demonstrado na figura 2 e gera uma glicoproteína transmembrânica do tipo II, de aproximadamente 39 KDa, expressa principalmente sobre a superfície de células T CD4+ ativadas. As células apresentadoras de antígenos expressam a molécula CD40. O ligante correspondente (CD40L ou CD154) é constitutivamente expresso

em linfócitos T, mas a sua expressão é regulada positivamente através do encontro com um antígeno. Estes eventos ainda regulam a expressão de moléculas B7 em células que apresentam antígenos, permitindo assim, o acoplamento da molécula de CD28 nas células T. Neste ponto, uma resposta imune específica pode se desenvolver. A interação entre a molécula CD40 e seu ligante desencadeia respostas específicas nas células B, promovendo a proliferação, mudança na classe de imunoglobulina produzida e geração de células de memória (XU; SONG, 2004) (Figura 3). A via de sinalização CD40-CD40L parece ser fundamental em infecções por *Plasmodium*. Camundongos *CD40*^{-/-}, *CD40L*^{-/-}, e tratados com anticorpos monoclonais para CD40L apresentaram taxas de mortalidade reduzidas quando infectados por *Plasmodium berghei*, sugerindo um papel importante deste sistema na patogênese da malária grave (PIGUET et al., 2001). Experimentos *in vitro* mostraram não haver produção de anticorpos em resposta aos antígenos R23, PfEB200 e MSP2-2CH2r, expressos no estágio sanguíneo do *P. falciparum*, na ausência de sinalização CD40-CD40L (GARRAUD et al., 2002). Por outro lado, esta sinalização não aumentou a porcentagem de respondedores para uma região imunogênica da proteína de superfície do merozoíto - MSP1, a qual está envolvida na etapa de invasão eritrocitária (GARRAUD et al., 2002). A sensível regulação da expressão de *CD40L* sugere que polimorfismos na região regulatória 5' podem ser importantes para a resposta imune. Além disso, polimorfismos nesta região, bem como no primeiro *exon* do gene, proporciona uma redução no risco para malária grave em homens hemizigotos para o SNP *CD40L*-726C (SABETI et al., 2002).

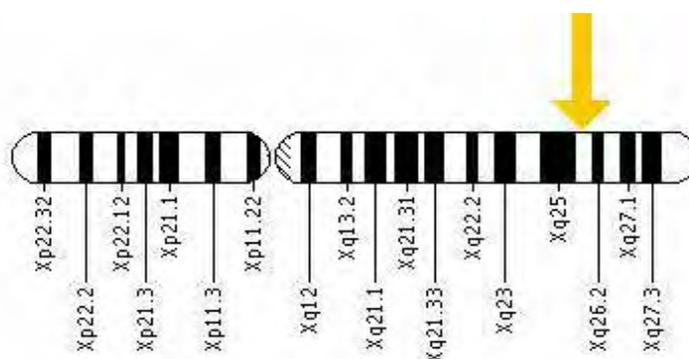


Figura 2: Esquema mostrando o cromossomo X, onde se localiza o gene *CD40L*.

Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CD40>. Acesso em 04/11/2012.

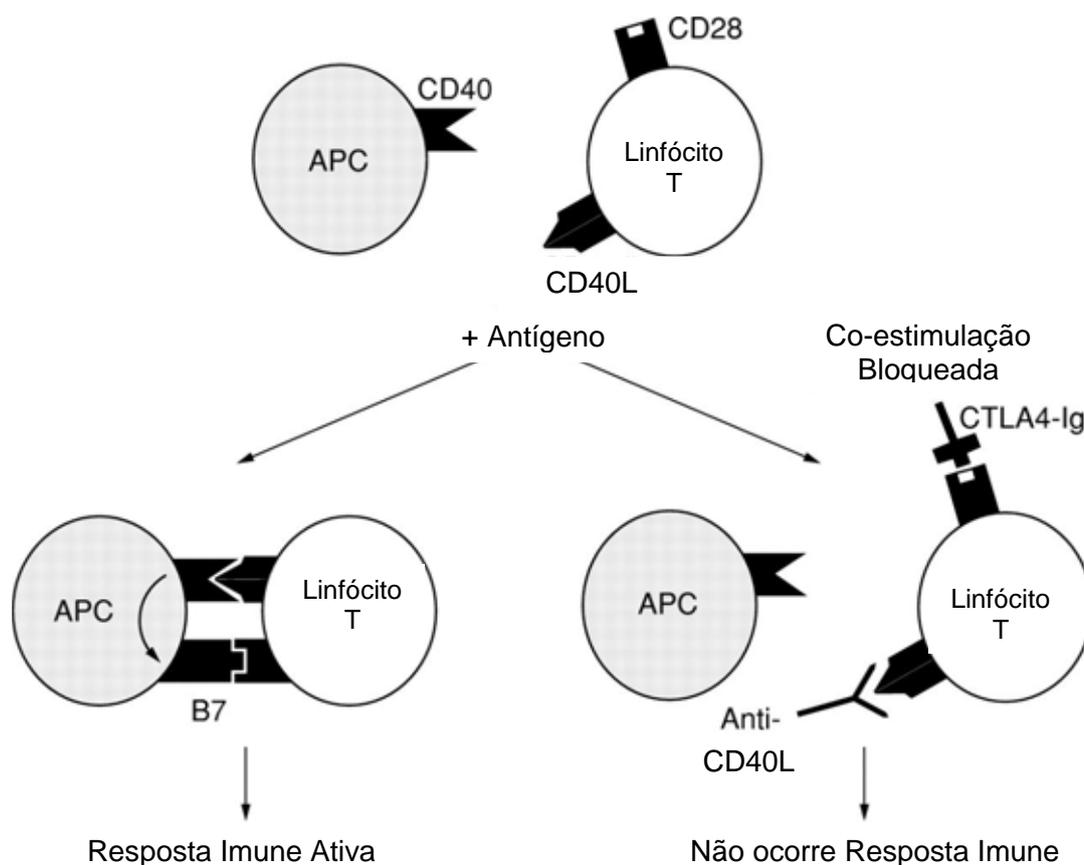


Figura 3: Desenvolvimento de uma resposta imune específica após a interação da molécula CD40 com seu ligante CD40L.

Fonte: <http://thorax.bmj.com/content/54/6/554.full>. Acesso em 04/11/2012.

A molécula estimuladora de linfócitos B (*BLYS*), também conhecido como *TALL-1*, *zTNF4*, *TNFSF-13* e *BAFF* pertence a superfamília TNF, expressa em monócitos, macrófagos e células dendríticas. Este gene está localizado no cromossomo 13q na região cromossômica 32-34 (CANCRO, 2004). Esta molécula tem a capacidade de se ligar a vários receptores sobre as células B atuando de forma sinérgica com a molécula CD40L na ativação e expansão dessas células por intermédio da atenuação da apoptose. Essa molécula aumenta os níveis de ativação de Th1 e a recombinação necessária para mudanças nas classes de imunoglobulinas que são importantes na maturação de anticorpos envolvidos na resposta imune primária (TREML et al., 2008). Além disso, tem também, papel importante na sobrevivência, maturação e produção de anticorpos por células B e é fundamental para a formação de centros germinativos (SCHNEIDER et al., 2000; YAN et al., 2000).

As células B nos centros germinativos recebem sinais de ativação por células dendríticas foliculares (FDC) através do BCR e do complexo co-receptor de célula B. As respostas de células B são intensificadas por BLYS que aumenta a expressão de PAX -5, um fator de transcrição que aumenta a capacidade do BCR em fosforilar CD19, o que amplifica a sinalização pelo BCR. Além disso, o aumento da expressão de CD40 por BLYS torna as células B mais sensíveis à CD40L expresso sobre as células T, conforme descrito na figura 4 (HASE et al., 2004) (Figura 4).

Elevada expressão de *BLYS* /*BAFF* tem sido documentado em várias doenças auto-imunes como a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico (SUTHELAND et al., 2005; STOHL, 2006).

Kawasaki et al. (2002) investigaram quatro SNPs presentes na região promotora do gene (Figura 5) e encontraram associação entre um polimorfismo na posição -871 (C>T) e pacientes com lúpus eritematoso e artrite reumatóide. Os monócitos dos indivíduos possuindo o alelo variante T deste polimorfismo apresentaram níveis elevados de RNA mensageiro desta molécula quando comparados com indivíduos possuindo o alelo C. Este polimorfismo também foi encontrado em indivíduos de diferentes etnias da população brasileira (MALHEIROS; PETZL-ERLER, 2009).

Estudos prévios indicam que a desregulação da expressão do receptor BLYS nas células B pode contribuir pra uma resposta imune humoral de curta duração, contra antígenos maláricos em crianças que vivem em uma região endêmica da África Subsaariana (NDUATI et al., 2011). Além disso, é possível que os antígenos do *Plasmodium falciparum* e a hemozoína estimulem as células B a produzirem IgG específica com a participação destes fatores de ativação das células B (KUMSIRI et al., 2010).

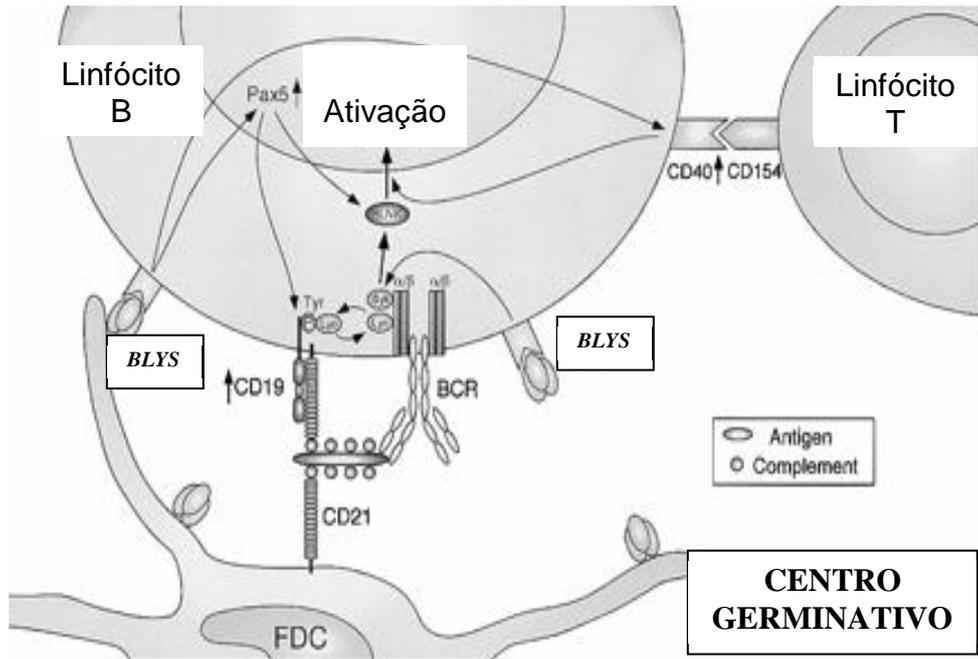


Figura 4: Esquema proposto para ativação das células B nos centros germinativos (modificado de Hase *et al.*, 2004).

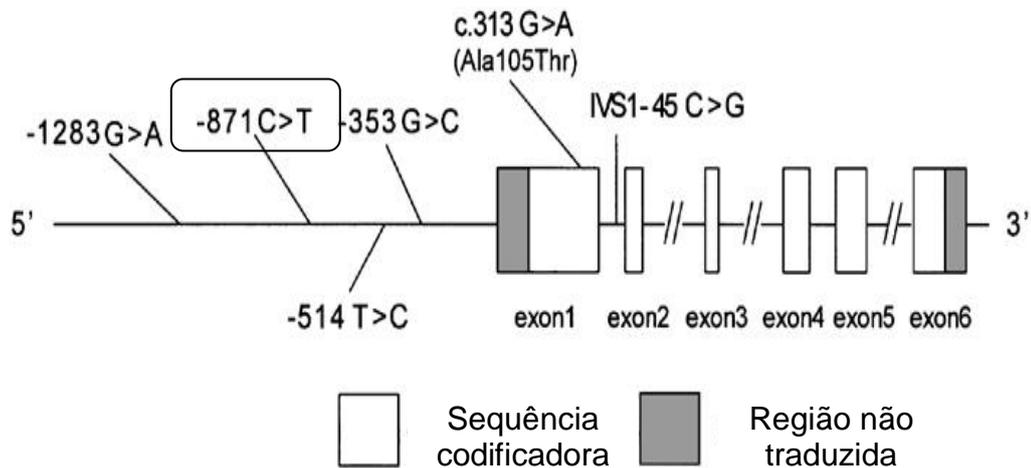


Figura 5: Organização genômica de *BLYS* e localização dos SNPs descritos por Kawasaki *et al.* (2002). Em destaque se encontra o SNP que foi avaliado neste trabalho.

1.5 Justificativa

O surgimento da resistência às drogas pelo *P. vivax* nos últimos anos (FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2011), bem como os estudos para o desenvolvimento de vacinas ainda não terem apresentado resultados promissores, tem sido motivo de grande preocupação na epidemiologia da malária. Diversos trabalhos analisando resposta sorológica à diferentes peptídeos do *Plasmodium* tem obtido resultados variáveis de acordo com o antígeno utilizado e a população analisada (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; LOUREMBAM; BARUAH, 2012; STORTI-MELO et al., 2012). Polimorfismos genéticos, em moléculas envolvidas na resposta imune em várias vias sinalizadoras, modulam a resposta imune humoral podem contribuir para níveis alterados de anticorpos e influenciar na susceptibilidade a malária.

Em decorrência dos dados obtidos pelo seqüenciamento do genoma humano, o conhecimento dos genes envolvidos na resposta imune e a verificação das implicações de sua variabilidade, com relação à causa de doenças é uma etapa avançada atualmente. Além de genes e alelos envolvidos na patogênese de nosologias, os trabalhos de associação também permitem que sejam determinadas as frequências populacionais daqueles alelos, já que os indivíduos-controles correspondem a indivíduos da população geral. Uma vez que polimorfismos genéticos variam entre grupos populacionais, a heterogeneidade de populações brasileiras acrescentará informações relevantes para a compreensão das causas de doenças complexas, como a malária. Ademais, esses estudos contribuem para o conhecimento da evolução e das implicações funcionais do polimorfismo genético. Dessa forma, os resultados desta investigação poderão contribuir na identificação e participação efetiva de genes humanos na modulação da resposta imune, essenciais no estabelecimento de estratégias de imunização contra a malária causada pelo *P. vivax*, em área de transmissão ativa da Amazônia brasileira, com o objetivo de produzir informações e possíveis soluções para o controle desta endemia.

1.6 Hipótese

Polimorfismos nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS*, moléculas co-estimuladoras de linfócitos B, podem influenciar na susceptibilidade a malária causada por *P. vivax* na Amazônia brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar polimorfismos de genes envolvidos na resposta imune humoral visando identificar possíveis associações com a malária.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar as frequências alélicas e genóticas de variantes nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* de amostras de pacientes infectados por *P. vivax* e indivíduos não maláricos.
- Verificar se combinação dos genótipos destes genes revela interação gênica na população estudada.
- Correlacionar estas frequências com a resposta imune humoral, parasitemia e a suscetibilidade ou resistência à malária.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Área de estudo

As amostras de sangue periférico foram coletadas no ano de 2003 e 2004 para o projeto de pesquisa intitulado “Epidemiologia e diagnóstico molecular de doenças infecciosas e parasitárias humanas” (CEP/FAMERP 214/2002) em Macapá (00°02`20`` S, 51°03`59`` W), área endêmica de malária da região Amazônica brasileira. Macapá é a capital do Estado do Amapá, localizada à margem do Rio Amazonas, juntamente com a floresta tropical. A população estimada é de 366.486 habitantes e o índice parasitário anual (número de casos positivos por mil habitantes - IPA) em 2011 foi de 5,2, índice parasitário considerado baixo.

3.2 Amostra

A amostra foi constituída por pacientes maláricos e indivíduos não-maláricos, ambas pareadas de acordo com sexo, etnia e idade, selecionadas após a confirmação do diagnóstico positivo para malária por *P. vivax* pelo método parasitológico e molecular. Um total de 103 pacientes com malária vivax não complicada foi envolvido neste estudo, obedecendo aos seguintes critérios: apresentaram sintomas clínicos característicos de malária, apresentaram idade superior a 18 anos (idade média igual a 26.2 ± 12.4) e diagnóstico positivo para malária por *P. vivax* pelo método da Gota Espessa (GE). Todos os pacientes receberam tratamento com 600 mg de cloroquina no primeiro dia e 450 mg por mais dois dias, além de 30 mg de primaquina no dia em que o diagnóstico foi realizado, persistindo por seis dias subsequentes. O grupo controle foi constituído por 97 indivíduos que também residem em Macapá e que estavam em conformidade com a política brasileira de banco de sangue: eram maiores de 18 anos de idade e de ambos os sexos. As amostras utilizadas já estavam armazenadas no Laboratório de

Pesquisa Centro de Investigação de Microrganismos, localizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). O projeto foi aprovado no CEP/FAMERP sob o número 2438/2011 em 12 de abril de 2011.

3.3 Genotipagem

A determinação dos genótipos para os SNPs analisados foram realizadas pelo método de PCR-RFLP (*Polimerase chainreaction – restriction fragment lenght polymorfism*) descrito por Malheiros e Petzl-Erler (2009), com modificações.

Para a genotipagem do SNP na posição -726 T>C (rs3092945) no gene *CD40L* foi amplificado um fragmento de 447 bp usando os oligonucleotídeos iniciadores 5' ATCTTCACAGCAACCTAC 3' e 5' CACTAAACTCAATGAAAGCC 3'. A PCR foi realizada com volume final de 25µL. Foram utilizados 100ng de DNA, 1 X tampão, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP; 0,6 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,5U de Taq Platinum. Os produtos de PCR foram digeridos usando a endonuclease de restrição *LweI* (Fermentas, GlenBurnie, MD, USA) a 37°C durante toda a noite e visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos resultantes para o genótipo C/C foram de 447 bp; 196 e 251 bp para o genótipo T/T e 196, 251 e 447 para o genótipo T/C (Figura 6).

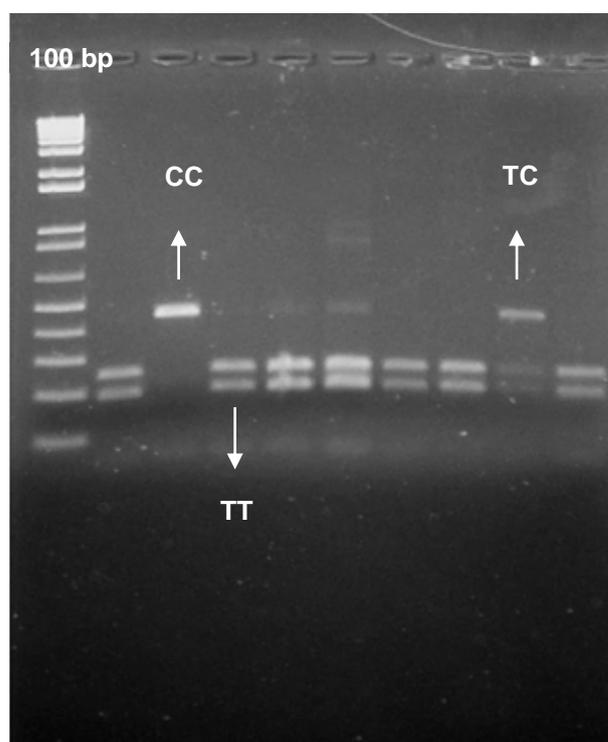


Figura 6: Padrão de bandas obtido após eletroforese, para os genótipos possíveis para o gene *CD40L*.

O SNP na posição -1 C>T (rs1883832) no gene *CD40* foi genotipado amplificando um fragmento de 300bp usando os oligonucleotídeos 5' CCTCTTCCCCGAAGTCTTCC 3' e 5' GAAACTCCTGCGCGGTGAAT 3'. A PCR foi realizada com volume final de 25 μ L. Foram utilizados 100ng de DNA, 1 X tampão, 5,0% de glicerol, 2,0 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 μ mol de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,5U de Taq Platinum. Os produtos de PCR foram digeridos usando a endonuclease de restrição *StyI* (Promega Corporation, USA), incubando a 37°C durante toda a noite. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os genótipos atribuídos foram baseados no tamanho dos fragmentos resultantes, onde 96 e 207 bp correspondem ao genótipo T/T; 74,96 e 133 ao genótipo C/C e 74,96,133 e 207 bp ao genótipo T/C (Figura 7).

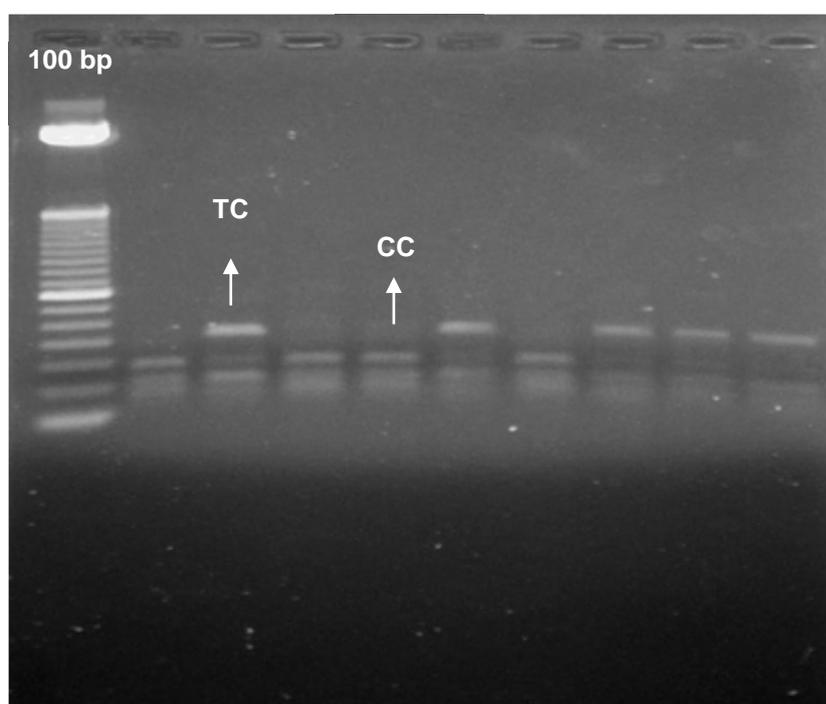


Figura 7: Padrão de bandas obtido após eletroforese, para os genótipos possíveis para o gene *CD40*.

O segmento incluindo o SNP na posição -871 C>T (rs9514828) no gene *BLYS* foi amplificado usando os oligonucleotídeos 5' TGGCTCTTGTGTGATCAAGG 3' e 5' GCCTGGTCTCAGCTTTTCTG 3'. A PCR foi realizada com volume final de 25µL. Foram utilizados 100ng de DNA, 1 X tampão, 5,0% de glicerol, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µmol de cada oligonucleotídeo e 0,5U de Taq Platinum. Os produtos de PCR de 200bp foram digeridos com a endonuclease de restrição *MbiI* (Fermentas, GlenBurnie, MD, USA) por 15 minutos a 37°C e analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os resultados dos fragmentos para o genótipo T/T foi de 200 bp, para o genótipo C/C de 160 e 40 bp e para o genótipo T/C foram de 40,160 e 200 bp (Figura 8).

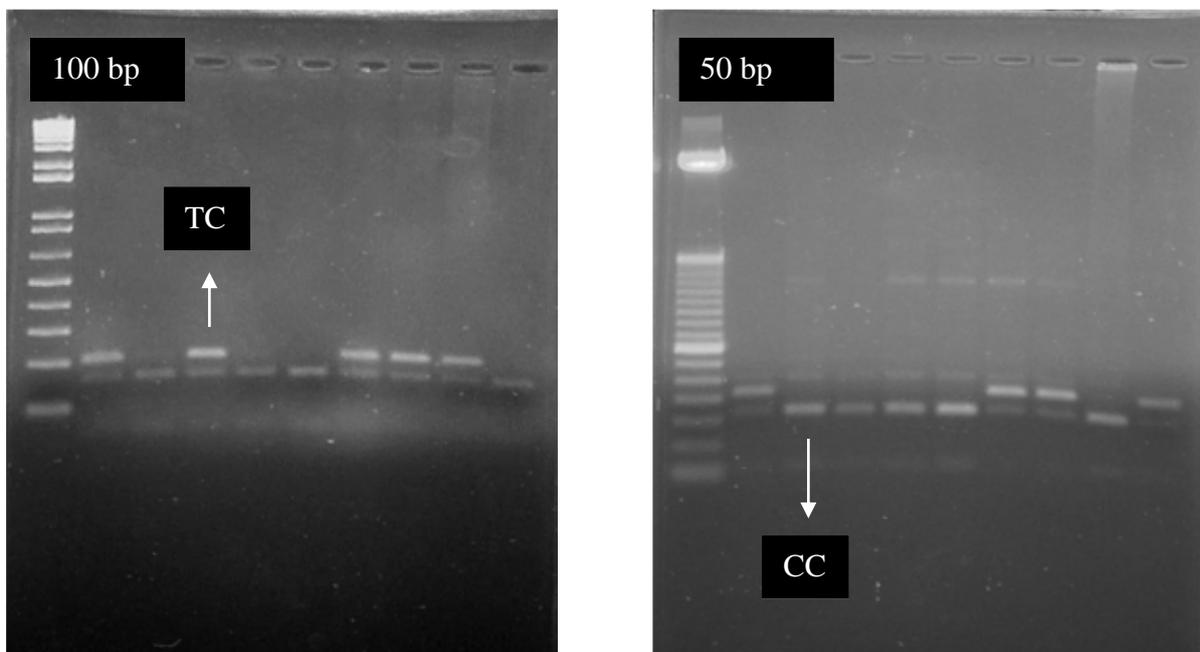


Figura 8: Padrão de bandas obtido após eletroforese, para os genótipos possíveis para o gene *BLYS*.

3.4 Avaliação da Resposta Sorológica contra antígenos do *P. vivax*

Anticorpos IgG foram detectados pelo método de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de acordo com protocolos previamente descritos, em amostras de plasma. Foram avaliados quatro diferentes peptídeos da CSP: porção amino (N), carboxila (C), região central repetitiva da variante VK210 (R) e a porção central repetitiva da variante VK247 (V) (HERRERA et al., 2004) além de mais três antígenos de fase de merozoíto: fragmento N-terminal da MSP-1 (Pv200L) (VALDERRAMA-AGUIRRE et al., 2005), um peptídeo recombinante da AMA-1 (RODRIGUES et al., 2005) e um peptídeo recombinante da DBP (CERÁVOLO et al., 2005). Os dados sorológicos foram previamente publicados por Souza Neiras et al. (2010).

3.5 Análise Estatística

As frequências genótípicas e alélicas foram estimadas por contagem direta. A comparação entre pacientes e indivíduos controles foi realizada por meio de análises de tabelas de contingência 2x2 para calcular a exata probabilidade (P) usando *software* Minitab/ Windows versão 14.0. O modelo de regressão logística foi utilizado para avaliar o efeito das distribuições genótípicas dos três polimorfismos entre os grupos. Para estimar o Odds ratio (OR) nós arbitrariamente adotamos o modelo dominante, sendo o genótipo mais frequente como referência (OR = 1). O modelo de regressão logística também foi utilizado para verificar o efeito combinado dos SNPs nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* na susceptibilidade a malária. Esta análise estatística, bem como Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram realizados usando o programa computacional BioEstat versão 5.0 (AYRES et al., 2008). O valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram apresentados como odds ratio (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

As análises de interação gênica foram realizadas conforme Svejgaard e Ryder (1994), com modificações no enfoque das questões investigadas. Nestas análises, foram comparadas a presença e ausência dos fatores em questão. Estes dados

representam as frequências das quatro combinações fenotípicas dos dois fatores (genes) analisados. O mesmo fator será considerado positivo numa análise e negativo na outra. Por exemplo, se o gene 1 tem um SNP cujas posições variáveis são ocupadas por C ou T e o gene 2 também tem um SNP ocupado por C ou T, as combinações possíveis para análise são:

- (i) Considerar C como positivo para o gene 1 e C como positivo para o gene 2;
- (ii) Considerar T como positivo para o gene 1 e T como positivo para o gene 2;
- (iii) Considerar C como positivo para o gene 1 e T como positivo para o gene 2;
- (iv) Considerar T como positivo para o gene 1 e C como positivo para o gene 2.

Ademais, para execução da análise combinada dos genótipos, nós adotamos o genótipo CC no gene *CD40* e o genótipo CC no gene *BLYS* como referência, sendo denominado risco zero. O risco 1 foi determinado pela combinação dos genótipos CC no gene *CD40* com o CT no gene *BLYS* ou pela combinação do genótipo CC no gene *BLYS* com o CT no *CD40*, ou seja, um homocigoto do tipo selvagem com um heterocigoto. O risco 2 foi considerado para a combinação realizada entre os genótipos TT no gene *CD40* com o CC no gene *BLYS* ou com os genótipos CC no gene *CD40* com o TT no gene *BLYS*, ou seja, um alelo do tipo selvagem com um alelo polimórfico. O risco 3 foi definido quando se combinou os genótipos heterocigotos tanto para o gene *CD40* quanto para o gene *BLYS* (*CD40* – CT / *BLYS* – CT). E, por fim, foi considerado como risco 4 a combinação realizada entre os genótipos TT no gene *CD40* com o CT no gene *BLYS* ou CT no gene *CD40* com o TT no gene *BLYS* e, ainda, TT no gene *CD40* com o TT no gene *BLYS*, ou seja, um homocigoto polimórfico com um heterocigoto ou então ambos os genótipos polimórficos.

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos polimorfismos nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS*

Devido o gene *CD40L* se localizar no cromossomo X, as análises de associação do SNP -726 T>C foram realizadas em homens e mulheres separadamente. Como sumarizado na Tabela 1, o genótipo mais frequente para os indivíduos do sexo feminino foi o T/T (77,7% - maláricos versus 84,0% - não maláricos), seguido do genótipo T/C (22,2% versus 12,0%), sendo o genótipo C/C o menos frequente (0% versus 4,0%).

Os dados para o polimorfismo na posição -1C>T do gene *CD40* mostraram uma alta frequência do genótipo C/C (60,2% maláricos versus 64,9% não maláricos), seguido do genótipo T/C (34,0% versus 31,0%) e, em uma menor frequência o genótipo T/T (5,8% versus 4,1%).

Para o polimorfismo na posição - 871 C>T no gene *BLYS* o genótipo C/C foi o mais freqüente (57,3% maláricos versus 55,5% não maláricos), seguido do genótipo T/C (36,8% maláricos versus 33,0% não maláricos). O menos freqüente foi o genótipo T/T (5,9% maláricos versus 11,5% não maláricos). As frequências alélicas e genotípicas dos três genes foram comparadas entre indivíduos maláricos e não maláricos e não foram reveladas diferenças estatisticamente significantes. As frequências genotípicas destes genes estão de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 1. Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* em pacientes maláricos e indivíduos do grupo controle, de uma área endêmica brasileira.

	<i>BLYS</i>					<i>CD40</i>					<i>CD40L</i>						
	Grupo Controle (n=97)	Grupo Malárico (n=103)	95% IC	OR	p	Grupo Controle (n=97)	Grupo Malárico (n=103)	95% IC	OR	p	Mulheres	Grupo Controle (n=25)	Grupo Malárico (n=27)	95% IC	OR	p	
CC	54 (55,5%)	59 (57,3%)	0,61-1,86	1,06	0,93	CC	63 (64,9%)	62 (60,2%)	0,45-1,44	0,81	0,58	CC	1 (4,0%)	0 (0%)	-	-	0,96
TC	32 (33,0%)	38 (36,8%)	0,66-2,12	1,18	0,66	TC	30 (31%)	35 (34,0%)	0,63-2,07	1,14	0,75	TC	3 (12,0%)	6 (22,2%)	0,46-9,48	2,09	0,54
TT	11 (11,5%)	6 (5,9%)	0,17-1,36	0,48	0,25	TT	04 (4,1%)	06 (5,8%)	0,42-5,72	1,56	0,72	TT	21 (84,0%)	21 (77,7%)	0,25-3,11	0,66	0,82
T	54 (27,8%)	50 (24,3%)	0,53-1,30	0,83	0,48	T	38 (19,6%)	43 (20,8%)	0,68-1,81	1,11	0,76	T	45 (90,0%)	48 (88,9%)	0,32-3,94	0,88	0,89
C	140 (72,2%)	156 (75,7%)	0,77-1,88	1,20		C	156 (80,4%)	159 (77,2%)	0,68-1,81	1,11		C	5 (10,0%)	6 (11,1%)	0,50-10,29	1,12	
H-W	0,0782	0,9709				H-W	0,8576	0,7210				H-W	0,0956	0,5160			
											Homens* (n=72)	(n=75)					
											C	10 (13,9%)	5 (6,7%)	0,73-6,96	2,25	0,24	
											T	62 (86,1%)	70 (93,3%)	0,14-1,36	0,44		

N: número de indivíduos; H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR: odds ratio; IC: Intervalo de Confiança. Os genótipos nos indivíduos do sexo masculino não foram apresentados para o gene *CD40L* porque os homens são hemizigotos para este gene.

4.2 Análise Combinada dos Polimorfismos *CD40* e *BLYS*

A comparação dos SNPs analisados nos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* entre indivíduos maláricos e não maláricos foi realizada por meio de análises de tabelas de contingência 2x2. A análise de interação gênica com o *CD40L* não pode ser realizada, pois após a estratificação dos genótipos por sexo, o número amostral reduzido não permitiu a execução da análise estatística. As análises combinadas dos SNPs nos genes *CD40* e *BLYS* não revelaram associação com malária na população estudada, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: O efeito combinado do SNP na posição -871 C>T no gene *BLYS* com o SNP na posição -1 C>T no gene *CD40* em pacientes e controles.

<i>BLYS</i>	<i>CD40</i>	Pacientes (%)	Controles (%)	95% IC	OR	p
a)		n= 89	N= 85			
C+	T+	34 (38,2)	31 (36,5)	0,58-1,99	1,07	0,93
C+	T-	55 (61,8)	54 (63,5)	0,50-1,71	0,92	
b)		n= 96	N= 96			
C+	T+	34 (35,4)	31 (32,3)	0,63-2,09	1,14	0,76
OUTROS	OUTROS	62 (64,6)	65 (67,7)	0,47-1,58	0,86	
c)		n= 92	N= 93			
T+	T+	16 (17,4)	13 (14,0)	0,58-2,87	1,29	0,66
OUTROS	OUTROS	76 (82,6)	80 (86,0)	0,34-1,71	0,77	
d)		n= 41	N= 40			
T+	T+	16 (39,0)	13 (32,5)	0,53-3,30	1,32	0,70
T+	T-	25 (61,0)	27 (67,5)	0,30-1,87	0,75	
e)		n= 35	N= 32			
C/T	T+	13 (37,1)	13 (40,6)	0,32-2,30	0,86	0,96
C/T	T-	22 (62,9)	19 (59,4)	0,43-3,09	1,15	

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança.

a) *BLYS-871 C+ / CD40-1 T+* = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (C/C, T/C) e *BLYS-871 C+ / CD40-1 T-* = (C/T, C/C) + (C/C, C/C);

b) *BLYS-871 C+ / CD40 -IT+* = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (C/C, T/C) e **outros** *BLYS-871 /CD40-1* = (C/T, C/C) + (C/C, C/C) + (T/T, C/C) + (T/T, T/C) + (T/T, T/T);

c) *BLY-871 T+ / CD40-1 T+* = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (T/T, T/C) + (T/T, T/T) e **outros** *BLYS-871 /CD40-1* = (C/T, C/C) + (C/C, C/C) + (T/T, C/C) + (C/C, T/C);

d) *BLYS-871 T+ / CD40-1 T+* = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (T/T, T/C) + (T/T, T/T) e *BLYS-871 T+ / CD40-1 T-* = (C/T, C/C) + (T/T, C/C);

e) *BLYS-871 C/T / CD40-1 T+* = (C/T, T/T) + (C/T, T/C) e *BLYS-871 C/T / CD40-1 T-* = (C/T, C/C).

Nós combinamos os genótipos com risco zero e usamos este grupo como referência, os resultados mostraram que o risco de malária não variou entre as combinações estudadas: (**Risco 1:** OR = 1,13; IC 95% = 0,32-3,90; p = 0,85. **Risco 2 :** OR = 1,00; IC 95% = 0,06–17,9; p =1,00. **Risco 3:** OR = 3,00; IC 95% = 0,27–33,0; p = 0,37. **Risco 4:** OR = 2,00; IC 95% = 0,31–13,0; p =0,46).

4.3 Associações entre os polimorfismos *CD40/BLYS*, parasitemia e avaliação da resposta de anticorpos.

As características dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* são fornecidos na Tabela 3. Os genótipos C/T e T/T dos genes *CD40* e *BLYS* foram combinados para a análise estatística. Não houve diferenças estatisticamente significantes de gênero, idade ou densidade média geométrica da parasitemia entre os indivíduos com diferentes genótipos. Da mesma forma, não houve associações estatisticamente significativas na prevalência de anticorpos IgG do plasma de todos os antígenos de superfície do *P. vivax* nos diferentes genótipos dos genes *CD40* e *BLYS*.

Tabela 3: Características epidemiológicas e sorológicas dos indivíduos infectados com *Plasmodium vivax* entre os diferentes genótipos dos genes *CD40* e *BLYS*.

	<i>CD40</i>		<i>BLYS</i>	
	<i>C/C</i>	<i>C/T + T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T + T/T</i>
Gênero, masculino, %	63,8	66,6	66,8	65,1
Idade, anos*	26 (23,5-27,5)	24 (19,8-29)	25,5 (21-27,5)	27 (20,7-28,7)
Parasitas/ $\mu\text{L}\ddagger$	704 (373-1,329)	679 (379-1,216)	722 (409-1,275)	656 (352-1,224)
CSP (amino), % §	80	64,2	81,2	70,5
CSP (carboxila), % §	83,3	92,8	90,6	82,3
CSP (VK210), % §	60	50	56,2	64,7
CSP (VK247), % §	50	64,2	50	58,8
Pv200L, % §	74,2	71,4	71,8	76,4
AMA-1, % §	93,7	84,6	96,7	77,7
DBP, % §	46,6	23	38,7	41,1

*Mediana (IQR).

‡ Média geométrica (95% IC).

§Proporção de respondedores

5. DISCUSSÃO

Os genes *CD40* e *CD40L* foram originalmente descritos como genes envolvidos na resposta imune por influenciarem a produção de anticorpos (VOGEL; NOELLE, 1998; MOORE et al., 1999). Estudos tem associado à presença de diferentes alelos destes genes com doenças autoimunes (MALHEIROS; PETZL-ERLER, 2009). Além disso, a via de interação CD40/CD40L tem sido também mostrada ser importante na resistência a vários protozoários que causam parasitoses humanas (SOONG et al., 1996; COSYNS et al., 1998; REICHMANN et al., 2000).

A expressão do *CD40L* nas células T é transitória, sendo que este ligante só está presente em linfócitos T ativados. A regulação da expressão do *CD40L* sugere que polimorfismos na região regulatória podem ser importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune. Huang et al. (2008) verificaram que o polimorfismo no gene *CD40L* na posição -3459 A>G não estava associado ao desenvolvimento de lesões em artérias coronarianas em crianças da Tailândia com a Doença de Kawasaki. Em contrapartida, a avaliação do papel do *CD40* no Hipertireoidismo de Graves, uma doença autoimune, sugere que a susceptibilidade a esta doença pode estar relacionada com um polimorfismo na sequência do gene, em famílias caucasianas (TOMER; CONCEPCION; GREENBERG, 2002). A expressão do *CD40/CD40L* em modelos experimentais parece ter um importante papel na resistência aos protozoários do mesmo filo Apicomplexa ao qual pertence o *Plasmodium*; como o *Toxoplasma gondii* (REICHMANN et al., 2000) e o *Cryptosporidium parvum* (COSYNS et al., 1998). Isto nos levou investigar se o polimorfismo -726 T>C na região promotora do gene *CD40L* tem alguma influência na susceptibilidade a malária. Além disso, há evidências de uma pequena redução no risco na malária grave por *P. falciparum* em populações africanas para este SNP (OR = 0,52; P = 0,002) em homens hemizigotos e, uma tendência similar, mas não significativa, também foi encontrada em mulheres. Em áreas endêmicas de *P. falciparum* na África, o risco da parasitose é reduzido pela presença do alelo C e, o seu efeito, é muito mais potente que o observado na malária não complicada (SABET et al., 2002).

Nossos resultados não mostraram evidências de associação significativa entre os polimorfismos analisados dos genes *CD40* e *CD40L* com susceptibilidade a malária não complicada por *P. vivax* na população estudada. Uma hipótese para esta falta de associação pode estar relacionada ao fato de que pacientes envolvidos neste estudo apresentam malária vivax não complicada, diferente dos pacientes investigados por Sabet et al. (2002), que eram portadores de malária falciparum grave onde a composição genética da população, o perfil de transmissão da malária e epidemiologia das espécies de plasmódio são diferentes no Brasil. Outra justificativa deve-se ao fato da ocorrência de alguns genótipos em baixa frequência e, portanto, o tamanho amostral pode ter dificultado o encontro de qualquer possível associação. Estes resultados, no entanto, necessitam ser investigados futuramente.

Poucos estudos tem investigado o papel da molécula BLYS na resposta imune (DONATI et al., 2006). Camundongos *BLYS* (-/-) apresentaram células B imaturas, baixos níveis de anticorpos circulantes, além de uma diminuição na resposta imune (GROSS et al., 2001). Por outro lado, camundongos transgênicos que super expressavam *BLYS* tinham uma sobrevivência aumentada das células B, o que levou ao desenvolvimento de auto-imunidade (GROSS et al., 2000). Kawasaki et al. (2002) investigaram quatro SNPs presentes na região promotora do gene, e encontraram associação entre um polimorfismo na posição -871 (C>T) em pacientes com lúpus eritematoso e artrite reumatóide. Este polimorfismo também foi encontrado em indivíduos de diferentes etnias da população brasileira, sendo também associado com pênfigo vulgaris (MALHEIROS; PETZL-ERLER, 2009). Em populações na Tailândia observou-se que monócitos que expressavam antígenos contra o *Plasmodium falciparum* poderiam induzir a produção de imunoglobulinas através da via BLYS, demonstrando assim, uma incidência satisfatória de ativação de células B por estes antígenos, bem como a produção de anticorpos específicos (KUMSIRI et al., 2010). Ademais, o *BLYS* desempenha um importante papel na resposta inflamatória e tem influência na imunopatologia durante a fase aguda de malária falciparum em crianças que vivem em áreas endêmicas na África Subsaariana (NDUATI et al., 2011).

No entanto, em nossos resultados, não foi observada nenhuma associação significativa entre o SNP -871 C>T no gene *BLYS* com malária não

complicada na população brasileira que vive em área endêmica da Amazônia. Entretanto, nossos dados não excluem a possível participação destes polimorfismos na patogênese da doença, mas indicam que esta variabilidade não tem impacto direto na incidência de malária vivax na população brasileira analisada. Além disso, análises da parasitemia e da prevalência de anticorpos IgG contra diferentes antígenos de superfície do *P. vivax* entre os diferentes genótipos não apresentaram associações significantes, reforçando o fato de que estes polimorfismos não tem um importante papel no risco de infecção por *P. vivax*. Além disso, existem outros polimorfismos neste gene que precisam ser investigados, e que podem influenciar na suscetibilidade desta parasitose.

O Brasil é um continente amplo e sua população apresenta uma enorme diversidade genética, composta por caucasianos, ameríndios e africanos (LINS et al., 2010), onde as diferentes regiões apresentam proporções variáveis destes grupos étnicos (CARVALHO-SILVA, et al., 2001).

Portanto, a investigação da variabilidade genética dos genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* em diferentes áreas endêmicas de malária vivax na região Amazônica Brasileira pode contribuir com novas informações relacionadas a possíveis associações com esta doença. Outra abordagem interessante seria investigar se estes SNPs estão associadas a diferentes subgrupos de pacientes que apresentam características clínicas específicas ou ainda, verificar se os polimorfismos destes genes estão associados com o tempo de início da doença, o número de episódios de malária ou a diferentes respostas apresentadas ao tratamento. Ademais, as variantes podem influenciar as formas específicas da doença ou ter um efeito sobre o curso clínico da mesma, em vez de simplesmente, aumentar ou diminuir a susceptibilidade.

6. CONCLUSÃO

Nos pacientes infectados por *P. vivax* e indivíduos não maláricos investigados observou-se que:

- Para os genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* os genótipos mais freqüentes foram C/C, T/T e C/C, respectivamente.
- Os alelos mais freqüentes para os genes *CD40*, *CD40L* e *BLYS* foram C, T e C, respectivamente.
- A combinação dos genótipos dos genes investigados não revelou interação gênica na população estudada.
- Não foi observada associação entre resposta imune humoral e parasitemia nos indivíduos maláricos com os polimorfismos dos genes investigados.
- Os genes estudados não foram associados à susceptibilidade a malária vivax.

7. REFERÊNCIAS

- ALECRIM, M. G. et al. Successful treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with a six-dose regimen of artemether-lumefantrine versus quinine-doxycycline in the Western Amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n.1, p. 20-25, 2006.
- ANDRADE B. B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal** , v. 9, p.13, 2010.
- ARÉVALO-HERRERA, M. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein in *Aotus Monkeys*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 25-31, 2005.
- ARNOT, D. E. et al. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, v. 230, p. 815-818, 1985.
- AYRES, M. et al. **Bioestat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, Brasil, 2008.
- BARRETO, C. A. et al. Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P. vivax* in *Aotus* monkeys. **Vaccine**, v. 23, p. 4048-4053, 2005.
- CANCRO, M. P. The BLYS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 237–249, 2004.
- CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosomes lineages. **American Journal of Human Genetics**, vol. 68, pp. 281-286, 2001.
- CAVASINI, C. E. et al. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, n. 10, p. 1042-1044, 2007.
- CERÁVOLO I. P. et al. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 72 -75, p. 681, 2005.
- COGSWELL, F. B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n.1, p. 26-35, 1992.

COLLINS W.E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n.4, p. 579-592, 2007.

COSYNS, M. et al. Requirement of CD40-CD40 ligand interaction for elimination of *Cryptosporidium parvum* from mice. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 603-607, 1998.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v.124, n.4, p. 755-766, 2006.

DE LA CRUZ, V. F. et al. Variation among circumsporozoite protein genes from rodent malarias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 28, p. 31-37, 1988.

DONATI, D. et al. Increased B cell survival and preferential activation of the memory compartment by a malaria polyclonal B cell activator. **Journal of Immunology**, vol. 177, pp. 3035-3044, 2006.

DOOLAN, D.L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J.K. Acquired immunity to malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n.1, p. 13-36, 2009.

DUAH, N. O. et al. Heritability of Antibody Isotype and Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. 7381, 2009.

DVORAK, J. A. et al. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science**, v.187, n. 4178, p. 748-750, 1975.

FERNANDO, D.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. **Malaria Journal**, v. 10, p. 351, 2011.

GARRAUD, O. et al. Regulation of antigen-specific immunoglobulin G subclasses in response to conserved and polymorphic *Plasmodium falciparum* antigens in an in vitro model. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2820-2827, 2002.

GAUCHAT, J. F. et al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 863-865, 1995.

GROSS, J. A. et al. Taci-Ig neutralizes molecules critical for a B cell development and autoimmune disease impaired B cell maturation in mice lacking BlyS. **Immunity**, vol. 15, pp. 289-302, 2001.

GROSS, J.A. et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**, vol. 404, pp. 995-999, 2000.

HEDRICK, P. W. Population genetics of malaria resistance in humans. **Heredity**, v.107, n. 4, p. 283-304, 2011.

HEMMER, C. J. et al. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. **Tropical Medicine & International Health: TM & IH.**, v. 11, p. 817-823, 2006.

HENRY, Jonh Bernard. **Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais** 19. ed. Mnole LTDA, 1999.

HERRERA S, et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. **International Journal of Parasitology**, vol.34, p.1535-46, 2004.

HUANG, X. et al. Interferon-induced protein IFIT4 is associated with systemic lupus erythematosus and promotes differentiation of monocytes into dendritic cell-like cells. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, 2008.

JACOBSON, E. M. et al. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 3, p. 205-214, 2007.

JAIN, V. et al. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. **Acta Tropica**, v. 113, p. 263–268, 2010.

JOHNSON, A. et al. Human leukocyte antigen class II alleles influence levels of antibodies to the *Plasmodium falciparum* asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2762-2771, 2004.

KAWASAKI, A. et al. Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Genes Immunity**, v. 3, p. 424-429, 2002.

KEMP, D. J. et al. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. **Advances in Parasitology**, v. 29, p. 75-149, 1990.

KUMSIRI, R. et al. Blood stage *Plasmodium falciparum* antigens induce T cell independent immunoglobulin production via B cell activation factor of the TNF family (BAFF) pathway. **Acta Tropica**, v. 116, p.217-226, 2010.

LACERDA, M. V.; HIPÓLITO, J. R.; PASSOS, L. N. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 522-523, 2008.

LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v.11, p.12, 2012.

LINS, T.C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22(2), p. 187-192, 2010.

LOUREMBAM, S. D.; BARUAH, S. Antibody response to allelic variants of 19kDa fragment of MSP-1: recognition of a variant and protection associated with ethnicity in Assam, India. **The Open Vaccine Journal**, v. 30(4), p. 767-773, 2012.

MACHADO, R. L. D.; PÓVOA, M.M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 377-381, 2000.

MACHADO, R. L. et al. Malaria outside the Brazilian Amazonian region: the situation in Santa Catarina State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p.581-586, 2003.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to *pephigus foliaceus*. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 6, p. 547-558, 2009.

MARQUES, G.R. et al. Epidemiological aspects of autochthonous malaria in the Atlantic forest area of the northern coast of the State of São Paulo, 1985-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 386-389, 2008

MEDINA, T. S. et al. 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. **Malaria Journal**, v. 14, p. 264, 2011.

MÉNARD, D. et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 5967-5971, 2010.

MENDES, C. et al. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5(6), p.1192, 2011.

MILLER, L. H. et al. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: Duffy blood group genotype, FyFy. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 6, p. 302-304, 1976.

MOORE, J.M. et al. Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1218-1225, 1999.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 555-566, 2009.

NARDIN, E. H. et al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccines of defined HLA genotypes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 5, p. 1486-1496, 2000.

NDUATI, E. et al. The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v.204, p. 962-970, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. **Actatropica**, v. 92, n. 1, p. 63-69, 2004.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 30, p. 115, 2010.

PARK, J. H. et al. Association analysis of CD40 polymorphisms with asthma and the level of serum total IgE. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 8, p.775-782, 2007.

PIGUET, P. F. et al. Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 2, p. 733-742, 2001.

POGGI, M. et al. The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. **Diabetologia**, v. 52, p. 1152–1163, 2009.

POTOENJAK, P. et al. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. **J Exp Med.**, v. 151, p. 1504-1513, 1980.

QARI, S. H. et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. **The Lancet**, vol. 341, p. 780-783, 1993a.

RAYCHAUDHURI, S. et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. **Nature Genetics**, v. 40, n. 10, p. 1216–1223, 2008.

REICHMANN, G. et al. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1312-1318, 2000.

RODRIGUES M.H. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **International Journal of Parasitology**, vol.35, p.185-192, 2005.

RYAN, J. R. et al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p.575-581, 2006.

SABETI, P. et al. CD40L association with protection from severe malaria. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 5, p. 286-291, 2002.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A. et al. Control of blood transfusion malaria in an endemic and in a non-endemic region in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, p. 27-34, 1998.

SCHNEIDER, P. et al. **A software for population genetic data analysis, version 2000**. Genetics and Biometry Laboratories, Department of Anthropology, University of Genève, Genève, 2000.

SCOTTO, G. Malaria: an update. **Le infezioni in medicina :rivistaperiodicadieziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia dellepatologieinfettive**, v.18, n. 4, p. 213-234, 2010.

SOONG, L. et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmaniaamazonensis* infection. **Immunity**, v. 4, p.263-273, 1996.

SOUZA-NEIRAS, W. C. et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? **Malaria Journal** vol. 9, p. 178, 2010.

STEPHENS, H. A. et al. The presence of the HLA class II allele DPB1*0501 in ethnic Thais correlates with enhanced vaccine-induced antibody response to a malaria sporozoite antigen. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 11, p. 3142-3147, 1995.

STOHL, W. Therapeutic targeting of B lymphocyte stimulator (BLyS) in the rheumatic diseases. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, v.6, p. 351–358, 2006.

STORTI-MELO, L. M. et al. Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. **Acta Tropica**, v.121, p. 152-155, 2012.

SUTHERLAND, A. P. et al. BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p.5537-5544, 2005.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and diseases association: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, v. 43, p. 18-27, 1994.

TOMER, Y.; CONCEPCION, E.; GREENBERG, D. A.A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. **Thyroid**, v. 12, n. 12, p. 1129-1135, 2002.

TREML, L.S. et al. Manipulating B cell homeostasis: a key component in the advancement of targeted strategies. **Archivum Immunologia e Ettherapia e Experimentalis**, v. 56,p. 153–164, 2008.

TREUTIGER, C.J. et al. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, p. 503-510, 1992.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n.18, p. 4670-4679, 2007.

UDEINYA,I.J. et al.Falciparum malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, v. 31, p.555-557, 1981.

VALDERRAMA-AGUIRRE A, et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Plasmodium vivax MSP1 PV200I: a potential malaria vaccine subunit. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 73, p.16-24, 2005.

VOGEL, J.D. et al.CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-cell transmigration. **Gastroenterology**, v. 126, p. 63–80, 2004.

VOGEL, L. A.; NOELLE, R.J. CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family.**Seminars in Immunology**, v. 10, p. 435-442, 1998.

WAGNER, D.H. The co-evolution of our understanding of CD40 and inflammation.**Diabetologia**, v. 52, p. 997–999, 2009.

WÄHLIN, B. et al. Human antibodies to a Mr 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, p. 7912-7916, 1984.

WALTHER M, et al. Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogeneous Cytokine Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 5736-5745, 2006.

World Health Organization. **World Malaria Report 2008**, Disponível em<<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>>Acesso em: 14 abr. 2009.

World Health Organization. **World Malaria Report 2012**. Disponível em: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_20119789241564403_eng.pdf
Acesso em: 04/03/2013.

WURTZ, N. et al. *BriolantS.Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual.* **Malaria Journal**, 2011.

XIE, P. et al. Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 5388–5400, 2006.

XU, Y.; SONG, G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. **Journal of Biomedical Science**, v. 11, n. 4, p. 426-438, 2004.

YAMASAKI, T. et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 40, n.6, p. 392-400, 2011.

YAN, M. et al. Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity. **Nature Immunology**, v. 1, n. 1, p. 37-41, 2000.

APÊNDICE A - Parecer do comitê de ética

image-02 (2131x3232x24b jpeg)

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autorquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 090/2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 2438/2011 sob a responsabilidade de Ricardo Luiz Dantas Machado com o título "Polimorfismos dos genes CD40, CD40L e BLYS associados na co-estimulação dos linfócitos B em indivíduos naturalmente infectados pelo Plasmodium vivax na Amazônia brasileira" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 12 de abril de 2011.

Prof.ª. Dr.ª. Beatriz Barco Tavares Jontaz Irigoyen
Vice-Presidente do CEP/FAMERP

ANEXO A - Resumo apresentado no XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine



**XVIII International
Congress for Tropical
Medicine and Malaria**

and

**XLVIII Congress of
the Brazilian Society
of Tropical Medicine**

XXVIII Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Chagas Disease, XVI Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Leishmaniasis and
III Latin American Congress on Travel Medicine

Certificate

This is to certify that Capobianco, M. P., Cassiano, G. C., Furini, A. A. C., Storti-Melo, L. M., Fraga, V. D., Conceição, L. M., Machado, R. L. D.
has attended the XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII
Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, held in Rio de Janeiro from September 23 to 27,
2012, as Poster presentation: Genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules among malaria vivax patients in
Brazilian endemic area

Rio de Janeiro, September 27, 2012.

Professor Pierre Ambrose Thomas
President of the ITM

Professor José Rodrigues Coura
President of the XVIII ICTMM

Professor Cláudio Tadeu Daquele Ribeiro
President of the Scientific Committee of the XVIII ICTMM

Professor Carlos Henrique Nery Costa
President of the ITM



**XVIII International Congress
for Tropical Medicine and Malaria**
and
**XLVIII Congress of the
Brazilian Society of Tropical Medicine**

**XXVIII Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Chagas Disease,
XVI Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Leishmaniasis and
III Latin American Congress on Travel Medicine**

VOLUME I

23 to 27 September 2012 – Rio de Janeiro, Brazil – Royal Tulip Hotel

Val012- Genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules among malaria vivax patients in Brazilian endemic area

Capobianco, M. P.^{1,3}, Cassiano, G. C.^{1,3}, Furini, A. A. C.¹, Storti-Melo, L. M.², Fraga, V. D.³, Conceição, L. M.³, Machado, R. L. D.^{1,3}

¹Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brazil, ²Universidade Federal do Sergipe, Itabaiana, Brazil, ³Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil.

Introduction: Genetic polymorphisms in molecules associated with immune response interact in many signaling pathways. These, in turn, modulate the humeral immune response, which could contribute to abnormal antibody levels, thus influencing the susceptibility to malaria. This study aims at estimating the allelic and genotypic frequencies of variants in the *CD40L* and *BLyS* genes found in individuals from the malaria endemic area in the Brazilian Amazon rainforest. **Material and Methods:** The sample was collected from patients with vivax malaria and healthy individuals, from Macapá city, Amapá state. We extracted the DNA by using the extraction and purification kit Easy-DNATM (Invitrogen, California – USA) and identified the SNPs -726T>C in the gene *CD40L* and the -871C>T in the gene *BLyS* by the PCR-RFLP method. We analyzed the genotypic, allelic frequencies, as well as of those individuals carrying each allele, by direct counting. We also compared the observed genotypic frequencies with the expected ones, according to the Hardy-Weinberg Equilibrium. **Results:** Data showed a higher frequency of CC genotype (56,5%) for the *BLyS* gene, followed by the TC genotype (35%). The TT genotype presented the lowest frequency (8,5%). Since the *CD40L* gene is located in the X chromosome, we analyzed male and female individuals separately. The most frequent genotype for female individuals was TT (80,7%), followed by TC heterozygotic (17,3%). The CC genotype was the least frequent (2%) in the studied population. Regarding male individuals, the most frequent genotype was T (89,3%) and the least frequent was the C genotype (10,7%). No significant statistical association was observed in the allelic and genotypic frequencies among the patients with malaria and the control group. Both genes were balanced according to Hardy-Weinberg Equilibrium. **Conclusions:** The results suggest that the *CD40L* and *BLyS* genetic variability is not itself an important factor in the occurrence of vivax malaria in the studied population. **Funding:** CNPq and FAMERP **E-mail:** mpcapobianco@yahoo.com.br

ANEXO B - Resumo apresentado no 61 st The American Society of Tropical Medicine and Hygiene annual meeting e publicado no The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, volume 97.

CERTIFICATE of PARTICIPATION

This certifies that

Gustavo Capatti Cassiano successfully presented poster #702, titled: **Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of CD40, CD40L and BLYS genes, co-stimulatory molecules on susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria.**

attended the ASTMH 61st Annual Meeting in
Atlanta, GA, USA, November 11-15, 2012 at the
Atlanta Marriott Marquis Hotel



Advancing global health since 1903

Karen Goralski
Executive Director

Jim W. Kazura, MD, FASTMH
ASTMH President

**INDIVIDUAL AND EPISTATIC EFFECTS OF GENETIC
POLYMORPHISMS OF *CD40*, *CD40L* AND *BLYS* GENES,
CO-STIMULATORY MOLECULES ON SUSCEPTIBILITY TO
PLASMODIUM VIVAX MALARIA**

**Gustavo C. Cassiano¹, Marcela P. Capobianco¹, Adriana A. Furini²,
Luciane M. Storti-Melo³, Valeria D. Fraga², Luciana M. Conceicao²,
Ricardo L. Machado²**

1 Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brazil, 2 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil, 3 Universidade Federal do Serjipe, Itabaiana, Brazil

Following the candidate gene approach we analyzed the *CD40*, *CD40L* and *BLYS* genes that participate of B-cell co-stimulation, for association with Plasmodium vivax malaria, characterized by a non-lethal disease but its prolonged and recurrent infection with deleterious effects on personal well-being, growth and on the economic performance at individual, family, community, and national levels. *P. vivax* is the most prevalent malaria species in Brazil it represents more than 80% of clinical cases reported annually from the Amazon region. The parasite-host coevolutionary process can be viewed as an arms race, in which adaptive genetic changes in one are eventually matched by alterations in the other, in this case, within the genetically diverse Amazonian populations. The sample included 97 patients and 103 controls. We extracted the DNA by using the extraction and purification commercial kit and identified the SNPs -1 C>T in the gene *CD40*, -726T>C in the gene *CD40L* and the -871C>T in the gene *BLYS* by the PCR-RFLP method. We analysed the genotypic, allelic frequencies, as well as of those individuals carrying each allele, by direct counting. We also compared the observed genotypic frequencies with the expected ones, according to the Hardy-Weinberg Equilibrium. The allelic, genotypic and allele carrier frequencies for these SNPs did not differ statistically between the patient and the control groups. Gene-gene interactions were no observed between *CD40* and *BLYS*, and between *CD40L* and *BLYS*. Overall, the genes were balanced according to Hardy-Weinberg Equilibrium. The results of this study lead us to conclude that, although the *CD40*, *CD40L* and *BLYS* alleles analysed differ functionally, this variation does not alter the functionality of the molecules in a way that would interfere with the susceptibility of the disease.