



Gustavo Capatti Cassiano

Polimorfismos de genes associados à resposta imune humoral
em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium*
vivax no Estado do Pará

São José do Rio Preto
2014

Gustavo Capatti Cassiano

Polimorfismos de genes associados à resposta imune humoral
em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium*
vivax no Estado do Pará

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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
2014

Gustavo Capatti Cassiano

Polimorfismos de genes associados à resposta imune humoral
em indivíduos naturalmente infectados pelo *Plasmodium*
vivax no Estado do Pará

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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.

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich
USP – São Paulo

Prof^ª. Dr^ª. Joseli de Oliveira Ferreira
FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Dorotéia Rossi Silva Souza
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

RESUMO

A malária é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. O desenvolvimento de uma resposta imune eficaz é capaz de reduzir a mortalidade e os sintomas clínicos da doença. No entanto, este é um processo complexo, e um dos objetivos dos imunologistas é entender as razões pelas quais os indivíduos diferem em suas respostas imunes contra o parasito. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de polimorfismos em genes coestimulatórios do sistema imune na resposta imune humoral contra proteínas de estágio sanguíneo do *Plasmodium vivax*, principal espécie causadora de malária no Brasil. Para tanto, nós genotipamos, pelo método de PCR-RFLP, nove SNPs em sete genes (*CD28*, *CTLA4*, *ICOS*, *CD86*, *CD40*, *CD40L* e *BLYS*). A amostra foi constituída por 227 indivíduos infectados com *P. vivax* no município de Goianésia do Pará, no Estado do Pará. As respostas de anticorpos IgG específicos contra as proteínas N- (ICB2-5) e C-terminal (MSP-1₁₉) da MSP-1, da DBP e da AMA-1 do *P. vivax* foram determinadas por ELISA. IgM e as subclasses de IgG contra a ICB2-5 também foram avaliadas. Para estudar os polimorfismos dos genes coestimulatórios, nós primeiramente investigamos o impacto da estratificação da população na distribuição dos polimorfismos com o auxílio de marcadores informativos de ancestralidade e demonstramos que a frequência dos SNPs *ICOS +1564T>C*, *CD40L -726T>C* e *CD86 +1057G>A* varia de acordo com a ancestralidade. Polimorfismos em genes coestimulatórios foram associados com a resposta de anticorpos contra proteínas do estágio sanguíneo do *P. vivax*, mais especificamente contra a DBP, e as porções N- e C-terminal da MSP-1. Além disso, haplótipos formados pelos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* foram associados com a resposta de anticorpos IgG4 contra a região N-terminal da MSP-1. Este é o primeiro estudo de associação genética envolvendo polimorfismos em genes coestimulatórios com a resposta imune

humoral contra o *P. vivax*. Esses dados acrescentam informações importantes que poderão auxiliar na compreensão dos aspectos imunológicos da malária vivax.

Palavras-chave: Malária. SNPs. Imunogenética. Coestimulação. MSP-1. AMA-1. DBP.

ABSTRACT

Malaria is one of the main causes of morbidity and mortality in the tropics and subtropics areas of the world. Although the immunity is only partial, it is important in reducing the amount of illness and death caused by malaria. However, the immunity against malaria is complex, and one of the main goals of vaccine developers is to understand why people differ in their immune response to the parasite. The present research aims to investigate the genetic mechanisms related to humoral immune response against P. vivax blood stages antigens, predominant malaria species in Brazil. Nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 7 genes (CD28, CTLA4, ICOS, CD86, CD40, CD40L e BLYS) were determined by PCR-RFLP. A total of unrelated 227 individuals infected with P. vivax from the Goianésia do Pará, Pará state, participated in this study. Level and prevalence of IgG antibodies against N-terminal (ICB2-5) and C-terminal (MSP-1₁₉) regions of MSP-1, DBP and AMA-1 of P. vivax were measured by ELISA. First, we evaluate the influence of genomic ancestry on distributions of co-stimulatory genes polymorphisms in an admixed Brazilian population using ancestry informative markers. ICOS, CD40L and CD86 polymorphisms were associated with genomic ancestry. There were significant association between CD28 -372G>A, ICOS +1564T>C, and CD40L -726T>C SNPs with antibodies anti-DBP prevalence. Moreover, CD40 -1C>T and CD86 +1057G>A SNPs were associated with antibody levels anti-PvMSP-1₁₉. The CD28 -372G>A and CD40 -1C>T SNPs were associated with IgM prevalence against ICB2-5. Haplotypes formed by polymorphisms in CD28, CTLA4, and ICOS genes were associated with IgG4 antibodies against ICB2-5. This is the first study to associate polymorphisms in costimulatory genes with humoral immune response against P. vivax. These data may add important information for understanding the immunological aspects involved in vivax malaria.

Keywords: Malaria. SNPs. Immunogenetic. Costimulation. MSP-1. AMA-1. DBP.

*Dedico esta tese aos meus
pais e irmão, por todo o
apoio, amor e confiança que
depositaram em mim*

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, minha imensa gratidão por ter me acolhido em seu laboratório desde minha iniciação científica. Obrigado pelos ensinamentos, confiança e amizade que contribuíram para o meu crescimento profissional e acadêmico.

À Dra. Marinete Marins Póvoa e toda sua equipe, em especial a Daniele Regina Lima Barbosa, por toda hospitalidade, gentileza e prontidão em colaborar com este trabalho.

Ao Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos e toda sua equipe, pela oportunidade de realizar a caracterização da ancestralidade genômica em seu laboratório, no Instituto de Biociências da Faculdade Federal do Pará.

À Dra. Maristela Gomes da Cunha, pela oportunidade de realizar os testes de ELISA para a MSP-1₁₉ em seu laboratório, no Instituto de Biociências da Faculdade Federal do Pará.

À Dra. Irene Soares e a técnica Kátia Françoso pela oportunidade de realizar os testes de ELISA para a AMA-1 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na Universidade de São Paulo.

Às Dras. Luzia Helena Carvalho, Cristiana Ferreira Alves de Brito, e Flora Satiko Kano e as alunas Flávia Alessandra de Souza Silva e Michaelis Loren Tang do Laboratório de Malária, do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade de realizar os testes de ELISA para a DBP.

Ao Dr. Paulo Nogueira e toda sua equipe, em especial a aluna Maria Edilene Martins de Almeida, pela oportunidade de realizar os testes de ELISA para a MSP-1 no Centro de Pesquisa Leonidas e Maria Deane, em Manaus.

À Darci pela imensa ajuda na coleta das amostras.

Ao Luís, secretário de saúde do município de Goianésia do Pará, e a todos os funcionários do posto de diagnóstico de malária, Margarete, Leila, Edna, Célia, Levi, Jeferson, Edmilson e Vicente.

Ao Daniel, responsável pela seção de análises clínicas do Hospital Municipal de Goianésia do Pará, por permitir a utilização da centrífuga para separação das amostras.

Ao senhor Francisco e toda sua família, por me acolherem em Manaus e pelo agradável convívio.

Ao Dr. Carlos Barros e toda sua família, por me acolherem em Belém de maneira calorosa e hospitaleira.

Ao Dr. Carlos Eugênio Cavasini, pela amizade, apoio e confiança na realização deste trabalho.

Às técnicas Valéria e Luciana, a quem gostaria de agradecer especialmente, pela amizade e por terem me ajudado em todos os momentos, a mais de 10 anos quando cheguei ao laboratório.

Aos grandes amigos do laboratório CIM, Marcela, Adriana, Maira, Pamella, Luciane e Marcus, que me ajudaram as inúmeras vezes em que precisei e por tornar nosso ambiente sempre alegre.

A todos os colegas do bloco U6, pela pronta disposição em ajudar, especialmente as incontáveis vezes que precisei visualizar os géis de eletroforese.

Aos organizadores do seminário Laveran/Deane sobre malária, Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro e Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz, pela oportunidade de participar deste evento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética.

A todos meus professores, pela competência e generosidade intelectual com que me orientaram.

A todos os meus amigos, os quais seriam aqui impossíveis nomear, por tornar mais agradável toda minha jornada acadêmica.

Ao CNPq, pela bolsa e auxílio financeiro.

A todos os pacientes com malária.

A minha namorada Joice, por todo o companheirismo, incentivo nas horas mais difíceis e compreensão. Amo você.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Malária – Considerações gerais.....	19
1.2	Epidemiologia das espécies causadoras de malária no Brasil: <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i>	20
1.3	Situação da malária no Brasil.....	21
1.4	Ciclo de vida	25
1.5	Imunidade naturalmente adquirida.....	27
1.6.	Imunidade naturalmente adquirida em áreas de transmissão instável: assintomáticos na Amazônia brasileira.....	30
1.7	Resposta imune humoral na malária	31
1.8	Processo de invasão do eritrócito pelo <i>Plasmodium vivax</i>	35
1.9	<i>Merozoite surface protein-1</i> (MSP-1)	36
1.10	<i>Apical membrane antigen-1</i> (AMA-1).....	39
1.11	<i>Duffy Binding Protein</i> (DBP).....	42
1.12	Coestimulação de linfócitos B e T.....	44
1.13	Moléculas associadas na coestimulação da resposta imune: CD80/CD86-CD28/CTLA-4.....	44
1.13.1	CD80/CD86-CD28/CTLA-4 e malária	48
1.14	Moléculas associadas na coestimulação do linfócito B: CD40-CD40L.....	52
1.14.1	CD40-CD40L e malária.....	54
1.15	Molécula associada na coestimulação do linfócito B: BLYS.....	56
1.15.1	BLYS e malária.....	58
1.16	Molécula associada na coestimulação da resposta imune: ICOS	60
1.17	Região cromossômica 2q33: Polimorfismos e estrutura dos genes <i>CD28</i> , <i>CTLA4</i> e <i>ICOS</i>	62
1.18	Polimorfismos e estrutura do gene <i>CD86</i>	66
1.19	Polimorfismos e estrutura dos genes <i>CD40</i> e <i>CD40L</i>	67
1.20	Polimorfismos e estrutura do gene <i>BLYS</i>	70
1.21	Estudos de Associação e Ancestralidade.....	71

1.22	Hipótese.....	73
2	OBJETIVOS.....	74
2.1	Objetivo geral.....	75
2.2	Objetivos específicos.....	75
3	MATERIAL E MÉTODOS	76
3.1	Área de estudo.....	77
3.2	Amostras	78
3.3	Diagnóstico e determinação da parasitemia por microscopia.....	79
3.4	Extração de DNA.....	79
3.5	Diagnóstico molecular das espécies de <i>Plasmodium</i>	80
3.6	Genotipagem dos SNPs nos genes coestimulatórios.....	82
3.6.1	Genotipagem de <i>CD28 -372G>A</i> (rs35593994)	83
3.6.2	Genotipagem de <i>CD28 +17T>C</i> (rs3116496).....	84
3.6.3	Genotipagem de <i>CTLA4 -318C>T</i> (rs5742909).....	85
3.6.4	Genotipagem de <i>CTLA4 +49A>G</i> (rs231775).....	86
3.6.5	Genotipagem de <i>ICOS +1564T>C</i> (rs4404254).....	87
3.6.6	Genotipagem de <i>CD86 +1057G>A</i> (rs1129055).....	88
3.6.7	Genotipagem de <i>BLYS -871C>T</i> (rs9514828).....	89
3.6.8	Genotipagem de <i>CD40 -1C>T</i> (rs1883832).....	90
3.6.9	Genotipagem de <i>CD40L -726T>C</i> (rs3092945).....	91
3.7	Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs).....	92
3.7.1	INDEL	93
3.7.2	Estimativa de miscigenação individual.....	95
3.8	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	95
3.8.1	PvMSP-1 ₁₉	95
3.8.2	Região N-terminal da PvMSP-1 (ICB2-5).....	96
3.8.3	PvAMA-1.....	97
3.8.4	PvDBP	98
3.9	Análises estatísticas	99
	RESULTADOS	101
4.1	Associação da parasitemia com os polimorfismos estudados	102

4.2	Resposta de IgG total.....	104
4.3	Resposta de IgM e subclasses de IgG para a proteína ICB2-5.....	105
4.4	Influência da idade e exposição na aquisição de IgG total.....	106
4.4.1	Episódios prévios.....	106
4.4.2	Tempo decorrido desde o último episódio de malária.....	108
4.4.3	Tempo de residência na área endêmica.....	108
4.4.4	Idade.....	109
4.5	Influência da idade e exposição na aquisição de IgM e subclasses de IgG contra a ICB2-5.....	112
4.6	Associação entre a resposta de IgG total e os SNPs.....	114
4.6.1	Prevalência de anticorpos IgG total entre os genótipos.....	114
4.6.2	Prevalência de anticorpos IgG total de acordo com o modelo genético.....	117
4.6.3	Níveis de anticorpos IgG total entre os genótipos e os modelos genéticos.....	120
4.7	Associação entre a resposta de IgM e subclasses de IgG com os SNPs.....	125
4.7.1	Prevalência e níveis de anticorpos IgM e subclasses de IgG entre os genótipos e modelos genéticos.....	125
4.8	Associação entre a prevalência de anticorpos com os haplótipos dos genes <i>CD28</i> , <i>CTLA4</i> e <i>ICOS</i>	130
4.9	Associação entre os níveis de anticorpos com os haplótipos dos genes <i>CD28</i> , <i>CTLA4</i> e <i>ICOS</i>	132
5	DISCUSSÃO.....	135
5.1	Resposta de anticorpos contra proteínas de estágio sanguíneo do <i>P. vivax</i>	137
5.1.1	PvMSP-1 ₁₉	137
5.1.2	PvAMA-1.....	139
5.1.3	PvDBP.....	140
5.1.4	ICB2-5.....	141
5.2	Polimorfismos e a resposta de anticorpos.....	143
5.3	Considerações finais.....	147
6	CONCLUSÕES.....	148
	REFERÊNCIAS.....	150
	ANEXO I.....	204
	ANEXO II.....	205

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países ou áreas com risco de transmissão de malária, 2011	20
Figura 2. Número de casos de malária vivax e malária falciparum no Brasil, entre os anos de 1959 e 2012.....	22
Figura 3. Mapa de risco de transmissão de malária por município de notificação segundo estratificação epidemiológica de risco na Amazônia Legal, 2011	23
Figura 4. Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp</i> no homem	27
Figura 5. Esquema do processo de invasão dos reticulócitos pelo <i>P. vivax</i> e principais alvos do sistema imune contra o estágio eritrocítico	35
Figura 6. Representação esquemática da PvMSP-1.....	39
Figura 7. Representação esquemática da PvAMA-1	40
Figura 8. Representação esquemática da PvDBP.....	43
Figura 9. Estrutura dos genes <i>CD28</i> , <i>CTLA4</i> e <i>ICOS</i> presentes na região cromossômica 2q33.....	62
Figura 10. Estrutura do gene <i>CD86</i>	66
Figura 11. Estrutura do gene <i>CD40</i>	68
Figura 12. Estrutura do gene <i>CD40L</i>	69
Figura 13. Estrutura do gene <i>BLYS</i>	71
Figura 14. Número de casos mês a mês registrados no município de Goianésia do Pará nos anos de 2011 e 2012.....	78
Figura 15. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CD28 -372G>A</i>	83
Figura 16. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CD28 +17T>C</i>	84
Figura 17. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CTLA4 -318C>T</i>	86
Figura 18. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CTLA4 +49A>G</i>	87
Figura 19. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>ICOS +1564T>C</i>	88

Figura 20. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CD86 +1057G>A</i>	89
Figura 21. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>BLYS -871 C>T</i>	90
Figura 22. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CD40 -1C>T</i>	91
Figura 23. Representação esquemática da RFLP para o SNP <i>CD40L -726T>C</i>	92
Figura 24. Exemplo de resultado gerado da genotipagem dos AIMS.....	94
Figura 25. Associação entre os genótipos e parasitemia representado nos Boxplots	103
Figura 26. Prevalência da resposta de anticorpos IgG total contra as proteínas MSP-1 ₁₉ , DBP, AMA-1 e ICB2-5.....	104
Figura 27. Prevalência da resposta de anticorpos IgM, IgG total e subclasses contra a proteína ICB2-5	106
Figura 28. Influência do número de episódios prévios de malária na prevalência de IgG total contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5.....	107
Figura 29. Prevalência de anticorpos IgG total contra a PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os indivíduos que tiveram malária nos últimos seis meses comparado com indivíduos que não contraíram malária nos últimos seis meses	108
Figura 30. Influência do tempo de residência na área endêmica na prevalência de IgG total contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5.	109
Figura 31. Influência da idade na prevalência de IgG total contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5	110
Figura 32. Associação entre os genótipos e IR contra a PvMSP-1 ₁₉ representado nos Boxplots.....	121
Figura 33. Associação entre os genótipos e IR contra a PvDBP representado nos Boxplots	122
Figura 34. Associação entre os genótipos e IR contra a PvAMA-1 representado nos Boxplots	123
Figura 35. Associação entre os genótipos e IR contra a ICB2-5 representado nos Boxplots	124
Figura 36. Efeito dos haplótipos nos níveis de anticorpos IgG total contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5	133

Figura 37. Efeito dos haplótipos nos níveis de anticorpos IgM e subclasses de IgG contra a proteína ICB2-5..... 134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados na nested-PCR	81
Tabela 2. Níveis de anticorpos (IR) para a PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 de acordo com a idade, tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, tempo decorrido desde o último episódio de malária e primo infecção.....	111
Tabela 3. Níveis de anticorpos (IR) IgM e subclasses de IgG contra a proteína ICB2-5 de acordo com a idade, tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, tempo decorrido desde o último episódio de malária	113
Tabela 4. Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos contra as proteínas PvMSP-119, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes genótipos avaliados neste estudo	115
Tabela 5. Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes modelos genéticos.....	118
Tabela 6. Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos de IgM e subclasses de IgG contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes genótipos avaliados neste estudo.....	126
Tabela 7. Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos IgM e subclasses de IgG contra a proteína ICB2-5 entre os diferentes modelos genéticos	128
Tabela 8. Frequências haplotípicas e associação com a prevalência de anticorpos IgG total contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ , PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5.....	131

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária – Considerações gerais

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium* transmitidos naturalmente ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Estes parasitos pertencem ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Ordem Hemosporidiiida, Família Plasmodiidae e Gênero *Plasmodium* Marchiafava e Celli, 1885. Dentre as diferentes espécies, cinco são reconhecidamente agentes etiológicos da malária humana: *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890, *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, *Plasmodium malariae* Laveran, 1881, *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 e *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan, 1932 (WHO, 2013).

Os dados disponíveis sobre a ocorrência de malária, em todo o mundo, são bastante imprecisos. No entanto, todas as estimativas são muito elevadas (SNOW et al., 2005; CARTER e MENDIS, 2006; WHO, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, ocorreram 207 milhões de casos de malária em 2012, resultando em aproximadamente 627 mil mortes, principalmente de crianças menores de cinco anos residentes na África (WHO, 2013). Embora a grande maioria dos casos ocorra no continente africano, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania (Figura 1), sendo que 103 países no mundo possuem áreas de risco de transmissão de malária (WHO, 2013).

Nas Américas, a transmissão ocorre em 21 países, estimando-se que 120 milhões de pessoas vivem em áreas com distinta intensidade de transmissão, já que diferem em características sociais, econômicas e ecológicas. No ano de 2012 foram registrados 469 mil casos de malária nas Américas, e o país com maior contingente de casos notificados foi o Brasil (52%), seguido pela Colômbia (13%) e Venezuela (11%) (WHO, 2013).

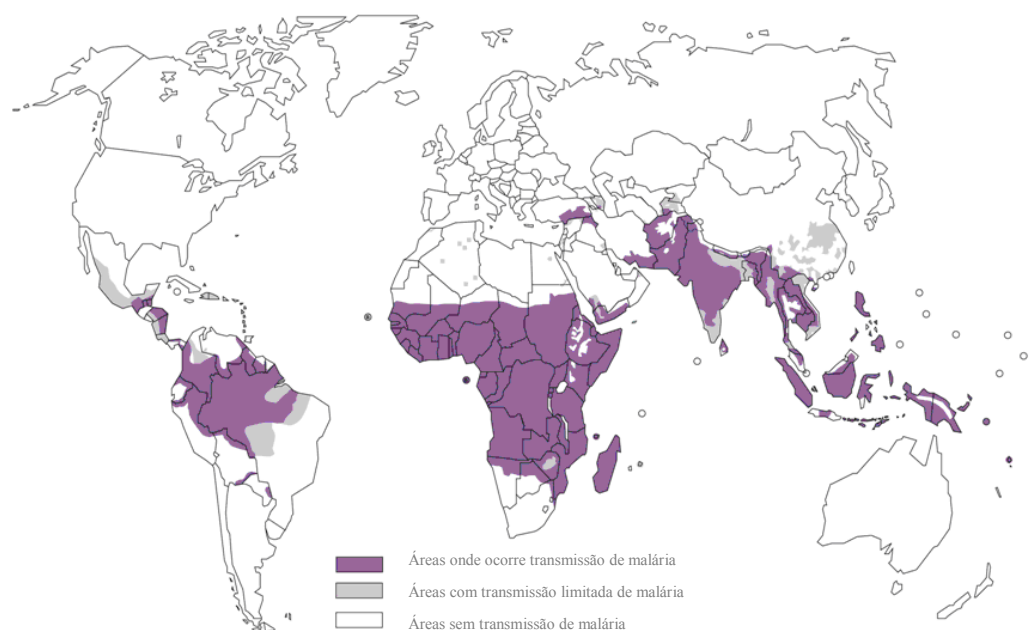


Figura 1 – Países ou áreas com risco de transmissão de malária, 2011.
Fonte: WHO (2013).

1.2 Epidemiologia das espécies causadoras de malária no Brasil: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*

O *P. vivax* é uma espécie amplamente distribuída no mundo, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A maior proporção do número de casos acontece no Sul e no Sudeste da Ásia (provavelmente mais de 80% das infecções) embora exista forte suspeita de que as infecções do continente africano não sejam corretamente notificadas (GUERRA et al., 2006; ROSENBERG, 2007). Nas Américas, apesar do número de malária vivax comparativamente inferior em relação ao continente asiático, esse plasmódio responde por mais de 65% de todos os casos (WHO, 2013) trazendo prejuízos significativos ao desenvolvimento socioeconômico da região.

A distribuição geográfica do *P. falciparum* se sobrepõe a do *P. vivax*, exceto em regiões temperadas, tais como na península coreana, devido ao fato do *P. vivax* completar seu ciclo de desenvolvimento em regiões mais frias. Outra exceção ocorre em regiões da África Subsaariana, mas por outra razão - uma

grande parcela da população não apresenta o antígeno Duffy, um receptor eritrocítico que permite a invasão do *P. vivax* (MILLER et al., 1976). Nestas regiões, o *P. falciparum* ocasiona mais de 90% dos casos, o que contribui para a grande mortalidade registrada neste continente. Isso porque quase todas as complicações e mortes relacionadas à malária são associadas a esta espécie (WHO, 2013).

O *P. malariae* teve prevalência maior no passado. Hoje, sua distribuição está quase que limitada à África e, mais raramente, no Pacífico Oeste e nas Américas do Sul e Central (CARTER e MENDIS, 2002). Nas áreas endêmicas da África, geralmente as infecções por *P. malariae* são mistas com o *P. falciparum*. Nas Américas, acredita-se que a malária ocasionada por este agente pode ter caráter zoonótico, uma vez que *P. malariae* compartilha identidade genética com o parasito de primatas *P. brasilianum* Gonder e Berenberg-Gossler, 1908 (AYALA et al., 1999) observado na América do Sul principalmente em símios das famílias Cebidae e Atelidae (DEANE et al., 1969; DEANE, 1992; FANDEUR et al., 2000). Interessantemente, tanto símios quanto humanos apresentaram altos níveis de soropositividade a antígenos do *P. malariae*/*P. brasilianum* (VOLNEY et al., 2002; DUARTE et al., 2006).

1.3 Situação da malária no Brasil

Até o final do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional, com exceção de algumas áreas da região Sul (BARCELAR, 1963). Após o Brasil adotar a estratégia de erradicação da malária, preconizada pela Organização Mundial de Saúde, a doença foi eliminada em diversos Estados e encontrou seus menores índices no início da década de 1960, quando cerca de 37 mil casos foram registrados. A partir de então, a incidência da malária voltou a ter um aumento progressivo, atingindo, em 1999, aproximadamente 610.000 casos (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010) (Figura 2).

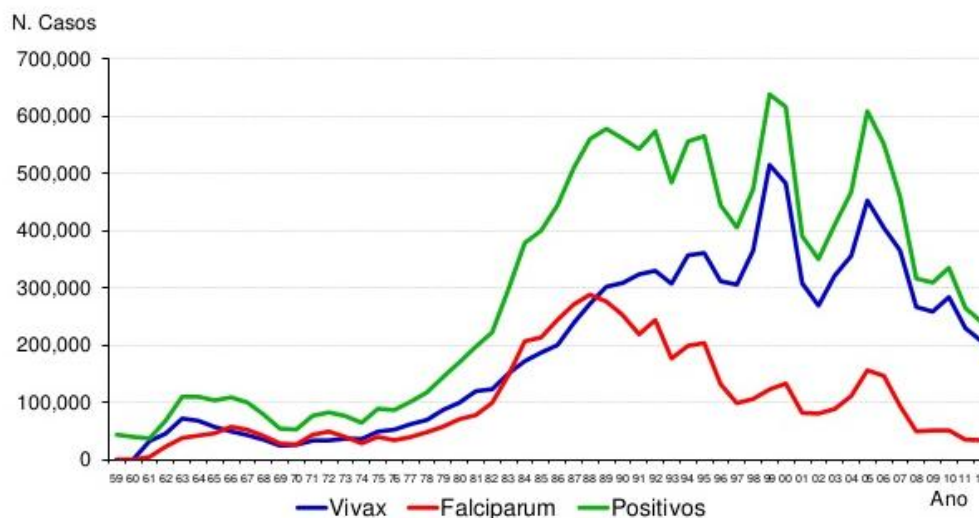


Figura 2 – Número de casos de malária *vivax* e malária *falciparum* no Brasil, entre os anos de 1959 e 2012.

Fonte: SIVEP-Malária (2013).

Na década de 80 a incidência da malária, em ascensão, teve como causa principal o processo de desenvolvimento e de ocupação da Amazônia. Isso porque neste período iniciou-se um intenso fluxo migratório, na grande maioria de pessoas das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país, sem imunidade adquirida. Geralmente, neste grupo populacional, a primo-infecção por *P. falciparum* apresentava maior letalidade (SABROZA, 1985), conforme corroborado pela tendência ascendente de mortalidade e letalidade neste mesmo período. Tendência esta, acrescida também, pela incipiente estrutura de serviços de saúde nas áreas de colonização recente, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde existente e o difícil acesso dos profissionais de saúde à localidade (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Nos últimos anos houve um declínio da incidência da doença e, no ano de 2012, foram registrados aproximadamente 242 mil casos de malária, sendo que quase a totalidade destes originários da Amazônia (SIVEP-MALÁRIA, 2013). De fato, a maioria é registrada na região Norte nos Estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima. No entanto, não se apresenta distribuída uniformemente uma vez que são detectados níveis diferenciais de transmissão da

doença entre certas áreas (SIVEP-MALÁRIA, 2011) (Figura 3). Estas particularidades epidemiológicas decorrem, principalmente, das diversas formas de ocupação do solo e modalidades de exploração econômica dos recursos naturais, bem como da distribuição vetorial e das características genéticas da população (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Tal declínio sofreu influência das atividades de controle, sem dúvida, mas outros fatores estiveram seguramente envolvidos, como a mobilidade populacional. Com o esgotamento de várias atividades econômicas nas áreas rurais da região Amazônica, principalmente o garimpo artesanal, a região tornou-se palco de movimentos migratórios do campo para as cidades (CERUTTI-JUNIOR, 2007). Com condições menos favoráveis de transmissão, o número de casos urbanos tende a ser menor do que aquele observado na área rural. Por outro lado, tais movimentos migratórios ensejam a eclosão de surtos de malária urbana (SIVEP-MALÁRIA, 2011).

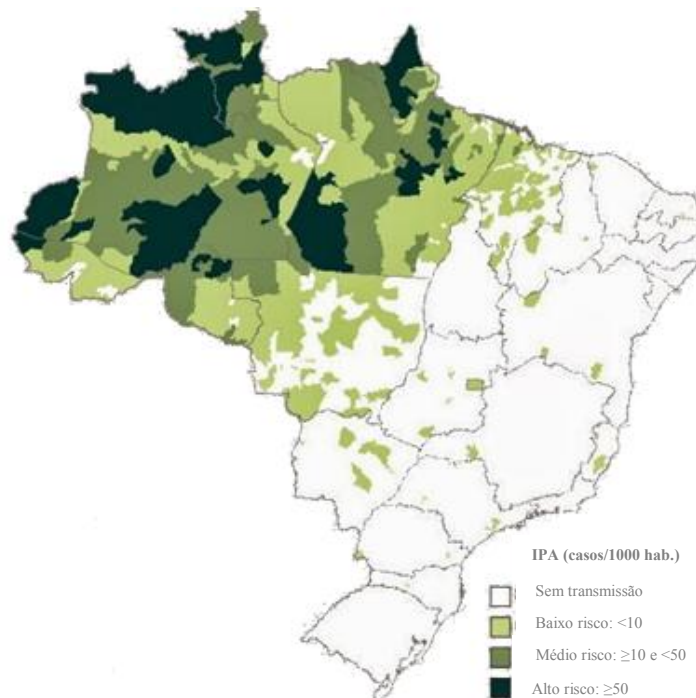


Figura 3 – Mapa de risco de transmissão de malária por município de notificação segundo estratificação epidemiológica de risco no Brasil, 2011.

Fonte: SIVEP-MALÁRIA (2011).

Na região Extra-Amazônica, têm sido registrados surtos de malária decorrentes da introdução da doença por migrantes infectados oriundos das áreas de transmissão (SIVEP-MALÁRIA, 2011). Esse quadro é preocupante uma vez que toda a região Extra-Amazônica é receptiva para transmissão de malária e os serviços de vigilância em saúde de alguns municípios são carentes de estrutura adequada para enfrentar o problema. Outro desafio que se impõe aos programas de controle é a eliminação de casos autóctones esporádicos que ocorrem em áreas focais restritas. Grande parte destes casos está localizada em áreas cobertas pela Mata Atlântica nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Em regiões de Mata Atlântica a malária está associada a existência de plantas da família Bromeliaceae, que funcionam como criadouros de anofelinos do subgênero *Kerteszia* Theobald, 1905. A malária associada a estes vetores, causada por *P. vivax* ou *P. malariae*, apresenta quadro bem específico com parasitemias baixas, sintomas moderados e transmissão isolada (CURADO et al., 1997).

Em relação às espécies de *Plasmodium*, com o surgimento de resistência do *P. falciparum* à cloroquina, o número de infecções de malária provocadas por esta espécie ultrapassou o número de casos de *P. vivax*, durante o período de 1984 a 1988. A partir deste, outro perfil epidemiológico foi observado, no qual o *P. vivax* novamente figura como a espécie predominante no Brasil (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Embora os motivos destas inversões ainda não estejam totalmente compreendidos, a utilização da mefloquina ao tratamento de *P. falciparum* pode ter contribuído para a queda do número de casos. Além disso, a doença provocada pelo *P. vivax* muitas vezes se manifesta de forma benigna, levando o paciente a não aderir ao tratamento de maneira correta, ocasionando recaídas, que aumentam as fontes de infecção e a quantidade de malária provocada por esta espécie. Soma-se a esse quadro a circulação de cepas de *P. vivax* resistentes a antimaláricos tais como cloroquina e mefloquina (ALECRIM et al., 1999). A partir de 2007, com a implantação de um novo esquema terapêutico, um combinado de lumefantrine com um derivado de artemisinina (Coartem®),

observa-se uma redução no número de casos de *P. falciparum* (SIVEP-MALÁRIA, 2013).

Infecções por *P. malariae* são raramente registradas, e dificilmente excedem 300 casos por ano (TAUIL e DANIEL-RIBEIRO, 1998), embora este número possa ser subnotificado na Amazônia brasileira. No Estado de Rondônia, por exemplo, 10% de positividade para *P. malariae* foram detectados no sangue de 96 pacientes, com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) (CAVASINI et al., 2000). Entre um grupo de garimpeiros do Mato Grosso, Fontes (2001) detectou 1,1% de *P. malariae* por exame hemoscópico, enquanto Scopel e colaboradores (2004), realizando PCR nestas mesmas amostras, ampliou tal prevalência para 11,8%. Lorenzetti e colaboradores (2008), também via PCR, encontraram em amostras de pacientes diagnosticados como infectados por *P. falciparum*, infecções mistas com o *P. malariae*.

1.4 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 4) é constituído por uma fase sexuada (esporogônica), durante a qual ocorre a multiplicação dos parasitos nos mosquitos do gênero *Anopheles* (hospedeiro definitivo) e uma fase assexuada (esquizogônica), onde ocorre a multiplicação no homem (hospedeiro intermediário) em células parenquimatosas do fígado (esquizogonia hepática) ou nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária).

A infecção no homem inicia-se durante o repasto sanguíneo do mosquito fêmea infectado, onde as formas infectantes (esporozoítos) são depositadas na pele do hospedeiro, podendo permanecer neste local por várias horas antes de encontrarem um vaso sanguíneo (AMINO et al., 2006). Uma vez dentro da corrente sanguínea, os esporozoítos invadem os hepatócitos onde crescem e se multiplicam, diferenciando-se em esquizontes hepáticos. A esta fase, cuja duração depende da espécie de *Plasmodium*, dá-se o nome de ciclo pré-eritrocítico. No ciclo de vida do *P. vivax* e do *P. ovale*, os esporozoítos podem originar

hipnozoítos, que permanecem nos hepatócitos em um estado dormente, durante o qual não se dividem, por um período que pode variar de três semanas a um ano ou mais antes que inicie a reprodução; caracterizando este fenômeno umas das causas das recaídas da doença (COSTA et al., 2012). A periodicidade dos surtos de malária por *P. vivax* pode ser explicado pela ativação de hipnozoítos latentes proporcionado por infecções posteriores por *P. falciparum* (WHITE, 2011); e por meio de evidências de epidemias simultâneas de febre tifóide e malária sugere que a febre tifóide pode ativar hipnozoítos (SHANKS e WHITE, 2013). Após a maturação dos esquizontes, milhares de merozoítos são formados e liberados na corrente sanguínea envoltos pela membrana da célula hospedeira, sendo denominados merossomos (PRUDÊNCIO et al., 2006). Posteriormente, os merozoítos invadem os eritrócitos e após esta invasão, inicia-se o ciclo eritrocítico, na qual os merozoítos se diferenciam em trofozoítos e estes por divisões sucessivas dão origem aos esquizontes eritrocitários. Após lise do eritrócito parasitado, são liberados novos merozoítos na corrente sanguínea, com invasão cíclica de novos eritrócitos, resultando nos sintomas clínicos da doença. No caso do *P. vivax*, apenas os eritrócitos jovens (reticulócitos) são infectados. Alguns merozoítos, após invasão dos eritrócitos, não evoluem para esquizontes, mas diferenciam-se nas formas sexuadas do parasito, os gametócitos feminino e masculino.

Estes, em fase de maturação, se ingeridos pela fêmea do mosquito durante o repasto sanguíneo, desenvolvem-se em seu estômago dando origem a macrogâmetas e microgâmetas que, após sofrerem mudanças morfológicas, culminam na fertilização. A macrogametogênese envolve a saída dos macrogametócitos do interior dos eritrócitos presentes no sangue ingerido. Neste momento, os gametas estão sujeitos a ação dos anticorpos do hospedeiro vertebrado que podem ter sido juntamente ingeridos após o repasto sanguíneo, bem como proteínas do sistema complemento (LENSEN et al., 1997; GULIA et al., 2002), os quais podem bloquear ou reduzir a infectividade dos gametócitos (LENSEN et al., 1997; BHARTI et al., 2006). A fertilização e a formação do zigoto ocorrem rapidamente (em até uma hora) (SIDEN-KIAMOS e LOUIS

2004), com meiose subsequente imediata. Dentro de 24 horas o zigoto completará seu desenvolvimento, originando o oocineto, que necessita ultrapassar o epitélio do intestino para se alojar na membrana basal do órgão, quando é então denominado oocisto. Este processo de divisão esporogônica representa a fase mais longa e o único estágio de desenvolvimento extracelular do *Plasmodium* em seu ciclo de vida, e resulta em milhares de esporozoítos. Após saírem do oocisto, os esporozoítos são liberados na hemolinfa do inseto, e irão alcançar as glândulas salivares, completando o ciclo evolutivo dos plasmódios no hospedeiro invertebrado.

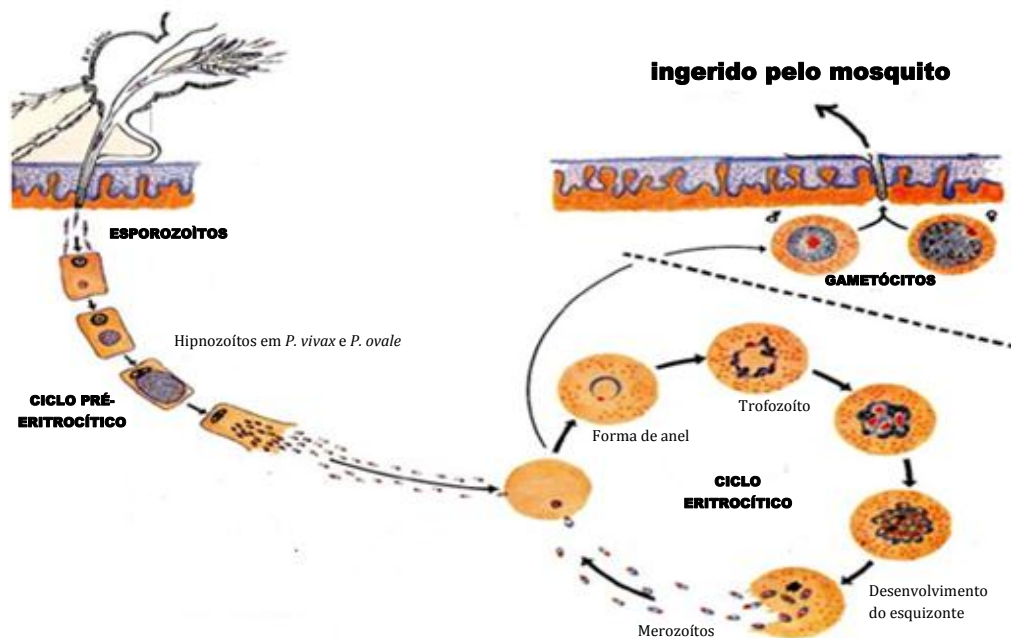


Figura 4 – Ciclo de vida do *Plasmodium sp* no homem.

Fonte: Adaptada de < <http://vcrc.res.in/malpar.html> >. Acesso em 14 jun. 2009.

1.5 Imunidade naturalmente adquirida

As primeiras evidências de imunidade naturalmente adquirida contra a malária vieram de observações de Robert Koch, em 1900. Examinando a frequência e a densidade parasitária em duas populações distintas na ilha de Java,

com diferentes níveis de transmissão, Koch deduziu que a proteção contra a malária era adquirida após sucessivo e ininterrupto contato com o parasito. Em Sukabumi, área de baixa endemicidade, os casos de malária eram observados em indivíduos de todas as idades, enquanto que em Ambarawa, área de alta endemicidade, os casos eram concentrados em crianças e raramente observados em adultos. Posteriormente, Koch postulou que a imunidade naturalmente adquirida é 1) efetiva em adultos após inúmeros ataques, 2) lábil, uma vez que desaparece se o contato com o parasito for cessado, 3) espécie específica, 4) estágio específica e, 5) adquirida em uma taxa dependente do grau de exposição (revisto em DOOLAN et al., 2009).

Em áreas de intensa transmissão, crianças são altamente susceptíveis a doença, sendo comuns infecções fatais durante os cinco primeiros anos de vida. Após este período, o número de episódios clínicos começa a diminuir, e o risco de mortalidade cai drasticamente, sendo raros os episódios de malária grave na adolescência. Ao atingirem a idade adulta, os indivíduos que sobreviveram aos vários episódios de malária adquirem imunidade clínica, apresentando baixas parasitemias e sintomatologia ausente (EGAN et al., 1996; BLOLAND et al., 1999). A visão mais amplamente aceita é de que para alcançar esta imunidade, também conhecida como premunição, vários anos de exposição contínua com o parasito são necessários, consequência da diversidade antigênica do parasito, no qual a exposição a um repertório de cepas circulantes é necessária para a proteção completa, assumindo que a imunidade é essencialmente cepa específica.

Entretanto, existem evidências que sugerem que a imunidade naturalmente adquirida pode depender de fatores intrínsecos do hospedeiro relacionados à idade. Adultos migrantes de regiões livres de malária para Irian Jaya, região de alta endemicidade na Indonésia, adquiriram rápida imunidade contra infecções por *P. falciparum*, independente de prolongada exposição prévia, enquanto que as crianças migrantes permaneceram susceptíveis à doença. Após 18 a 24 meses, a distribuição de casos de malária entre adultos e crianças foi semelhante entre os migrantes e os nativos de Iria Jaya (BAIRD et al., 1991). Curiosamente, esta relação entre idade e sistema imune, evidenciada para infecções com *P.*

falciparum, não foi observada para infecções com *P. vivax*, uma vez que os adultos não adquiriram imunidade clínica mais rapidamente do que as crianças (BAIRD, 1995), sugerindo que possam existir diferenças marcantes na maneira como se desenvolve a imunidade naturalmente adquirida para o *P. vivax* comparado ao *P. falciparum*.

De fato, a imunidade clínica contra o *P. vivax* parece ser adquirida mais rapidamente do que para o *P. falciparum*. Em Papua Nova Guiné, que é altamente endêmica tanto para o *P. falciparum* como para o *P. vivax* (MÜLLER et al., 2003), infecções com *P. vivax* são predominantes em crianças com menos de dois anos, diminuindo sua incidência rapidamente após este período. Já a incidência de infecções com *P. falciparum* continua aumentando até o quarto ano de vida (LIN et al., 2010). Aos cinco anos de idade a maioria das crianças adquire completa imunidade clínica ao *P. vivax*, enquanto que ainda permanecem com considerável risco de adoecer devido ao *P. falciparum* (MUELLER et al., 2009). Diferenças semelhantes são observadas na prevalência da infecção. A prevalência de *P. vivax*, diagnosticada por microscopia, alcança os maiores níveis em crianças com 4 a 7 anos, e a prevalência de *P. falciparum* é mais alta em crianças de 7 a 10 anos (MUELLER et al., 2009).

Diferença na aquisição de imunidade entre *P. vivax* e *P. falciparum* não foi observada apenas em regiões holoendêmicas de Papua Nova Guiné, mas também em outras áreas, incluindo regiões de baixa transmissão. Em estudos longitudinais realizados na Tailândia (LAWPOOLSRI et al., 2010), Sri Lanka (MENDIS et al., 2001) e Vanuatu (MAITLAND et al., 1996), a incidência de malária causada pelo *P. vivax* diminuiu significativamente com o passar da idade comparado com o *P. falciparum*. Em um assentamento na região Amazônica brasileira, apesar de não ter sido observado qualquer efeito da idade na redução da incidência da malária, o risco de contrair malária causada por *P. vivax* começou a diminuir após 5 a 6 anos de residência na área endêmica, diferentemente do observado para o *P. falciparum*, cujos casos começaram a cair após 8 a 9 anos de residência na área endêmica (da SILVA-NUNES et al., 2008).

1.6 Imunidade naturalmente adquirida em áreas de transmissão instável: assintomáticos na Amazônia brasileira

Em indivíduos cujo contato com o parasito não é frequente, as infecções quase sempre são sintomáticas, e os sintomas clínicos podem ser observados mesmo na presença de baixas parasitemias. Nestas áreas, onde a transmissão é considerada instável, tal como a região Amazônica, os mecanismos da imunidade naturalmente adquirida tem sido pouco explorados. Em tais regiões, relatos de infecção assintomática são relativamente recentes. Em um dos primeiros inquéritos conduzido em 1995 por Andrade e colaboradores (1995), 70% de casos de infecções assintomáticas foram encontrados entre garimpeiros na Amazônia brasileira, cujos indivíduos foram observados por 48 horas após a detecção do parasito pela gota espessa. Posteriormente, vários estudos demonstraram a presença de infecções assintomáticas na região Amazônica, tanto no Brasil (revisto em COURA et al., 2006), como no Peru (BRANCH et al., 2005; van DEN EEDE et al., 2012) e Venezuela (LASERSON et al., 1999).

Apesar de, em muitos estudos, os infectados terem sido acompanhados apenas por alguns dias após a detecção da infecção, inequívocos casos de infecção assintomática foram evidenciados após longo período de acompanhamento. Por exemplo, em comunidades ribeirinhas de um afluente do rio Negro, Suárez-Mutis e colaboradores (2007) detectaram, por técnicas moleculares, 20 casos de infecções assintomáticas por *P. vivax*, e nenhum destes indivíduos tiveram manifestações clínicas de malária seis meses antes e após a detecção do parasito.

Várias infecções geralmente precedem a imunidade clínica. No entanto, as razões que levam a imunidade clínica em áreas de baixa endemicidade ainda são pouco esclarecidas. Alguns estudos em diferentes regiões brasileiras encontraram maior prevalência de assintomáticos entre adultos comparados as crianças (FONTES, 2001; ALVES et al., 2002; MARCANO et al., 2004). No Amazonas, Ladeia-Andrade e colaboradores (2009) encontraram que o tempo de residência na área endêmica foi maior para os assintomáticos comparado aos sintomáticos. A de se ressaltar que nestes estudos, é difícil separar a influência da idade e do

tempo de residência na área endêmica na aquisição de imunidade clínica, uma vez que muitos indivíduos nasceram e permaneceram na área endêmica. Entretanto, o estudo realizado por Katsuragawa e colaboradores (2010), em Rondônia, encontrou uma prevalência de 15% de infecções assintomáticas em adultos residentes por longos períodos na área, enquanto que infecções assintomáticas em adultos que passam apenas curtos períodos na área foram ausentes, sugerindo que a aquisição de imunidade clínica nestas localidades é mais dependente de contínua e longa exposição do que da idade.

Entre garimpeiros no município de Apiacás, Estado do Mato Grosso, em 527 indivíduos avaliados, 7,2% de infecções assintomáticas foram detectadas por gota espessa (FONTES, 2001) e 27,3% foram detectadas por diagnóstico molecular, sendo que em aproximadamente metade destes casos a infecção era com *P. falciparum*. Para avaliar se anticorpos poderiam estar associados à proteção clínica, Braga e colaboradores (2002) compararam a resposta humoral contra o antígeno recombinante que representa o fragmento de 19 kDa da MSP-1 de *P. falciparum* entre 53 indivíduos assintomáticos e 46 com malária clínica da mesma população de Apiacás, e encontraram maior prevalência e maiores níveis de anticorpos IgG1 nos assintomáticos.

1.7 Resposta imune humoral na malária

O papel dos anticorpos na proteção contra a malária é bem documentado. A evidência mais convincente de sua importância nos humanos vem de experimentos nos quais a transferência de soro ou imunoglobulinas de indivíduos adultos imunes em áreas endêmicas de *P. falciparum* para crianças doentes foi capaz de reduzir a parasitemia e levar a cura da doença (COHEN et al., 1961; SABCHAREON et al., 1991). Recém-nascidos, com menos de seis meses de idade, geralmente possuem menor risco de desenvolver a doença devida, principalmente, a transferência de anticorpos da mãe para o feto durante a gestação e amamentação. Posteriormente, após a perda destes anticorpos, as

crianças são as mais susceptíveis a doença (AMARATUNGA et al., 2011). Em modelos animais, a proteção conferida pela inoculação com anticorpos monoclonais (mAbs) (SIDDIQUI et al., 1987; BADELL et al., 2000), transferência adotiva de células B previamente sensibilizadas (LANGHORNE et al., 1998) bem como a maior susceptibilidade de animais com deficiência de células B (VON DER WEID, et al., 1996) ressaltam a importância dos anticorpos na imunidade clínica.

Os mecanismos mediadores da proteção conferida pelos anticorpos incluem: 1) inibição da invasão dos merozoítos aos eritrócitos. Anticorpos ligados a proteínas envolvidas no processo de invasão impedem a ligação destas proteínas com seus receptores localizados no eritrócito, prevenindo assim a invasão dos merozoítos (WAHLIN et al., 1984; BLACKMAN et al., 1990); 2) inibição do crescimento do parasito intraeritrocítico em associação com monócitos (mecanismo conhecido como ADCI, do inglês *antibody dependent cellular inhibition*). Após a ruptura do esquizonte, os eritrócitos infectados são opsonizados por IgG1 e IgG3, que ligam-se por meio da porção Fc a receptores Fc γ expressos na superfície de macrófagos, induzindo-os a produzir TNF- α , que inibe o desenvolvimento das formas intraeritrocíticas (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995) e; 3) clareamento dos eritrócitos infectados. Anticorpos contra proteínas expressas na superfície do eritrócito infectado com *P. falciparum* impedem a citoaderência nas células endoteliais, permitindo assim a destruição dos eritrócitos infectados durante sua passagem pelo baço (SMITH et al., 2000). Além disso, tem sido sugerido que eritrócitos infectados com *P. vivax* apresentam deformabilidade aumentada, o que os possibilita a atravessarem o baço sem que sejam destruídos (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2009). Sendo assim, anticorpos ligados aos eritrócitos infectados poderiam diminuir esta deformabilidade, facilitando o clareamento pelo baço.

A resposta imune contra o *Plasmodium* pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasito. No estágio pré-eritrocítico, que envolve esporozoítos e esquizontes hepáticos, a resposta imune é mediada por mecanismos humoral e celular. Apesar de sua rápida permanência na

corrente sanguínea, os esporozoítos são capazes de estimular a produção de anticorpos. O papel protetor dos anticorpos durante este estágio envolve uma gama de mecanismos, incluindo o bloqueio da invasão dos esporozoítos aos hepatócitos (CHAPPEL et al., 2004), opsonização dos esporozoítos (SCHWENK et al., 2003) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (MAZIER et al., 1990). Os mecanismos mediados por células também parecem ser importantes e envolvem tanto macrófagos e células dendríticas, que possuem a capacidade de fagocitar os esporozoítos (HAFALLA et al., 2011), como a atividade citolítica de células T CD8⁺ e CD4⁺ sobretudo devido a produção de IFN- γ (GOOD e DOOLAN, 1999).

A resposta imune também pode ser dirigida contra os estágios sexuais do parasito. Esta resposta, também conhecida como imunidade bloqueadora de transmissão, foi primeiramente demonstrada utilizando modelos animais cujos anticorpos, ingeridos juntamente com as formas sexuais do parasito durante o repasto sanguíneo do mosquito, eram capazes de impedir a fertilização e formação dos oocinetos no estômago dos mosquitos (TSUBOI et al., 2003). Demonstrou-se que indivíduos expostos a sucessivas infecções adquirem anticorpos contra os estágios sexuais do parasito, uma vez que o soro destes indivíduos é capaz de bloquear a transmissão (AREVALO-HERRERA et al., 2005). A produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias é capaz de inativar os gametócitos ainda dentro do hospedeiro vertebrado (NAOTUNNE et al., 1993; LONG et al., 2008).

Dados epidemiológicos indicam que a exposição natural aos esporozoítos não induzem a imunidade esterilizante, ou seja, a eliminação dos parasitos e prevenção da infecção (HOFFMAN et al., 1987), e os mecanismos da imunidade naturalmente adquirida, responsáveis pela aquisição de proteção clínica em áreas endêmicas, limitam a parasitemia e diminuem a morbidade e mortalidade da doença. Além disso, indivíduos assintomáticos permanecem com parasitemia patente por longos períodos, e o soro de indivíduos imunes, quando transferidos para indivíduos não imunes, protegem contra as formas eritrocíticas do parasito, sem afetar a invasão dos esporozoítos (revisto em DOOLAN et al., 2009). Todas

estas evidências sugerem que o estágio eritrocítico é o principal alvo para a imunidade naturalmente adquirida. Para o estágio eritrocítico, os potenciais alvos para uma resposta imune são merozoítos livres ou eritrócitos infectados. Uma vez que as moléculas de HLA (do inglês *Human Leucocyte antigen*) estão ausentes na superfície dos eritrócitos, geralmente é assumido que a resposta imune humoral é crítica na imunidade contra os estágios sanguíneos.

Neste estágio, a resposta imune efetiva é provavelmente composta por anticorpos de alta afinidade e células T que tenham como alvo moléculas envolvidas em funções biológicas essenciais para o parasito. O parasito, por sua vez, apresenta diversidade antigênica entre diferentes isolados, pobre imunogenicidade e é capaz de sofrer variação antigênica no decorso de uma infecção, provavelmente como resultado de um processo evolutivo que permite ao parasito escapar da resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, conhecer detalhadamente a função destas moléculas é crucial para o entendimento da doença (MUELLER et al., 2013).

Para o *P. vivax*, as proteínas de merozoíto vem sendo estudadas com certa consistência nos últimos 20 anos, e incluem as RBPs (do inglês *reticulocyte binding protein*), DBP (do inglês *Duffy binding protein*), AMA-1 (do inglês *apical membrane antigen-1*) e diversas MSPs (do inglês *merozoite surface protein*). Diante do exposto, um esquema dos potenciais alvos da imunidade contra o estágio sanguíneo do *P. vivax* será apresentado (Figura 5), antes de iniciar a apresentação dos antígenos avaliados nesta tese.

1.8 Processo de invasão do eritrócito pelo *Plasmodium vivax*

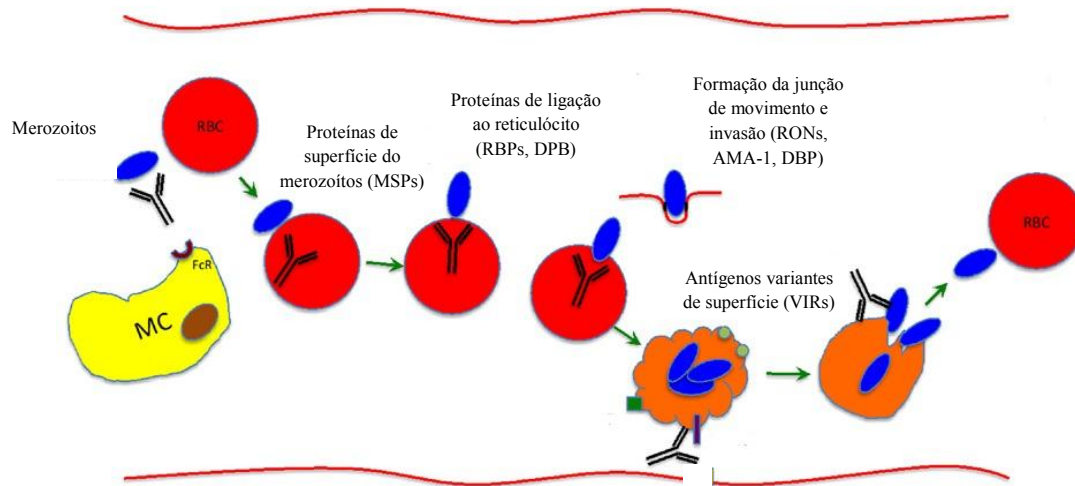


Figura 5 – Esquema do processo de invasão dos reticulócitos pelo *P. vivax* e principais alvos do sistema imune contra o estágio eritrocítico.

Fonte: adaptada de Mueller e colaboradores (2013).

Merozoítos livres na corrente sanguínea, antes de invadirem os eritrócitos, são susceptíveis a resposta imune do hospedeiro. As várias MSPs que cobrem a superfície do merozoíto podem agir no reconhecimento inicial do eritrócito, e esta ligação é de baixa afinidade, reversível e ocorre em qualquer orientação (revisto por GAUR et al., 2004). O *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos e acredita-se que esta seleção seja atribuída as RBPs. Após a reorientação do merozoíto, justapondo o polo apical em contato com a membrana do reticulócito, ocorre a formação do complexo de junção no local do contato. A formação destas junções, irreversíveis, e consequente invasão da célula, são mediadas pela interação da DBP com seu receptor DARC (do inglês *Duffy antigen receptor for chemokines*) presente na superfície do reticulócito (revisto por NTUMNGIA et al., 2012). A proteína AMA-1, juntamente com as proteínas RONs (do inglês *rhoptry neck protein*) participam da formação da junção de movimento que permite a invasão do merozoíto. As RONs- 2, 4 e 5 são inseridas junto a membrana do eritrócito, e após a ligação de AMA-1 com a RON-

2, forma-se uma estrutura em forma de anel, que em um processo impulsionado por um motor actina-miosina circunda o merozoíto, completando assim a entrada do parasito na células hospedeira (GAUR e CHITNIS, 2011). A infecção de hemácias imaturas, por *P. vivax* leva à formação de invaginações contendo antígenos altamente polimórficos codificados pelo parasito, incluindo as proteínas VIR. Todas estas proteínas que participam do processo de invasão e desenvolvimento do *P. vivax* são potenciais alvos do sistema imune do hospedeiro.

1.9 Merozoite surface protein-1 (MSP-1)

A MSP-1 é o antígeno mais abundante e melhor estudado do estágio eritrocítico. Muito do que conhecemos sobre seu papel biológico deriva de estudos com *P. falciparum* e *P. knowlesi*. Embora ainda existam dúvidas se podemos extrapolar estas observações para o *P. vivax*, é bastante provável que a função da MSP-1 seja similar para todas as espécies de *Plasmodium*.

A MSP-1 é sintetizada durante a esquizogonia como um precursor, com peso molecular variando de 180 a 230 kDa de acordo com a espécie (aproximadamente 200 kDa para o *P. vivax*). Durante a esquizogonia, a MSP-1 faz parte de um complexo no qual estão associadas às proteínas MSP-6 e MSP-7, que se ligam a superfície da membrana pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (PACHEBAT et al., 2007). No momento da liberação dos merozoítos, as proteínas que formam este complexo sofrem um processamento primário pela protease subtilisina-1 (SUB1), que cliva a MSP-1 em quatro fragmentos: um fragmento N-terminal de 83 kDa (MSP-1₈₃), dois fragmentos centrais de 30 e 38 kDa (MSP-1₃₀ e MSP-1₃₈) e um fragmento C-terminal de 42 kDa (MSP-1₄₂) (KOUSSIS et al., 2009). Antes da invasão do eritrócito, ocorre um segundo processamento, mediado pela protease SUB2, em que a MSP-1₄₂ é clivada, resultando em um fragmento solúvel de 33 kDa (MSP-1₃₃) que é liberado juntamente com o restante do complexo, e outro fragmento de 19 kDa (MSP-1₁₉)

que permanece ancorado a membrana do merozoíto pela GPI (HARRIS et al., 2005).

Embora a função biológica da MSP-1 ainda não tenha sido definitivamente esclarecida, acredita-se que ela participa do processo de invasão dos eritrócitos, uma vez que seu domínio C-terminal de 19 kDa permanece intacto e persiste durante toda esta fase do desenvolvimento do parasito. *In vitro*, anticorpos monoclonais contra a MSP-1₁₉ inibiram a invasão dos eritrócitos (CHAPPEL e HOLDER, 1993). Além disso, anticorpos contra esta mesma porção da MSP-1 presentes no soro de indivíduos imunes também foram capazes de inibir a invasão de merozoítos do *P. falciparum* (O'DONNELL et al., 2001).

Sabe-se que a MSP-1 do *P. falciparum* é capaz de se ligar em eritrócitos humanos ou de primatas do gênero *Saimiri*, que são susceptíveis a invasão por merozoítos desta espécie, enquanto que esta proteína não foi capaz de se ligar em eritrócitos de coelhos, que não são invadidos por merozoítos de *P. falciparum* (PERKINS e ROCCO, 1988). Outra importante evidência da participação da MSP-1 no processo de invasão do merozoíto ao eritrócito vem do fato de que anticorpos que previnem o processamento secundário da MSP-1 foram capazes de impedir a invasão (WOEHLBIER et al., 2010).

A estrutura primária da MSP-1 do *P. vivax* foi baseada em dois estudos. A proteína de 1726 aminoácidos foi inicialmente definida comparando-a com a MSP-1 de outras duas espécies, *P. falciparum* e *P. yoelli*, e foi dividida em dez blocos conservados entre as espécies (ICB, do inglês *Interspecies conserved blocks*) entremeados por blocos polimórficos. Sete blocos (ICB1, ICB2, ICB4, ICB5, ICB6, ICB8 e ICB10) apresentaram similaridade maior de 48% entre a MSP-1 das três espécies, enquanto que três blocos (CB3, CB7 e CB9) apresentaram similaridade acima de 50% apenas para o *P. vivax* e o *P. falciparum* (DEL PORTILLO et al., 1991).

Uma segunda classificação, atualmente mais aceita, foi baseada a partir do sequenciamento do gene de 31 isolados de *P. vivax* de diversas partes do mundo, incluindo 8 da Amazônia brasileira. Neste estudo, a MSP-1 do *P. vivax* foi dividida em 13 blocos, sendo sete conservados (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) e seis

polimórficos (2, 4, 6, 8, 10 e 12), sendo que a MSP-1₁₉ é representado pelo bloco 13, correspondente ao bloco ICB10 (PUTAPORNTIP et al., 2002).

A partir da determinação da estrutura primária da MSP-1 do *P. vivax*, várias proteínas recombinantes cobrindo as sequências que codificam as regiões N- e C-terminal foram desenvolvidas, e a resposta sorológica contra elas foi testada utilizando soros de indivíduos residentes em áreas endêmicas. Foi demonstrado que os blocos polimórficos da região N-terminal são mais frequentemente reconhecidos comparados as regiões conservadas (LEVITUS et al., 1994; SOARES et al., 1999a). A partir de estudos soroepidemiológicos conduzidos principalmente na Amazônia brasileira, também tem sido observado que indivíduos infectados e/ou que tiveram malária prévia, frequentemente apresentam anticorpos contra a MSP-1, sendo a MSP-1₁₉ mais imunogênica do que outras proteínas representando a região N-terminal (DEL PORTILLO et al., 1992; SOARES et al., 1997; SOARES et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2006; RICCIO et al., 2013).

Entretanto, associação entre proteção clínica e anticorpos contra a região N-terminal da MSP-1 do *P. vivax* foi encontrada. Neste estudo longitudinal, Nogueira et al. (2006) avaliaram a resposta sorológica de indivíduos residentes em Portuchuello, (RO) contra duas proteínas, uma C-terminal, a MSP-1₁₉ e outra N-terminal, a ICB2-5, (Figura 6) e encontraram que indivíduos com anticorpos contra a ICB2-5 possuíam menor risco de se infectarem com *P. vivax*. Ainda, indivíduos assintomáticos apresentaram maiores níveis de IgG3 contra a ICB2-5, mas não contra a MSP-1₁₉. Recentemente, um estudo semelhante foi realizado em outra localidade, Rio Pardo, no Estado do Amazonas e, novamente, indivíduos assintomáticos apresentaram maiores níveis de IgG3 contra a ICB2-5 (VERSIANI et al., 2013).

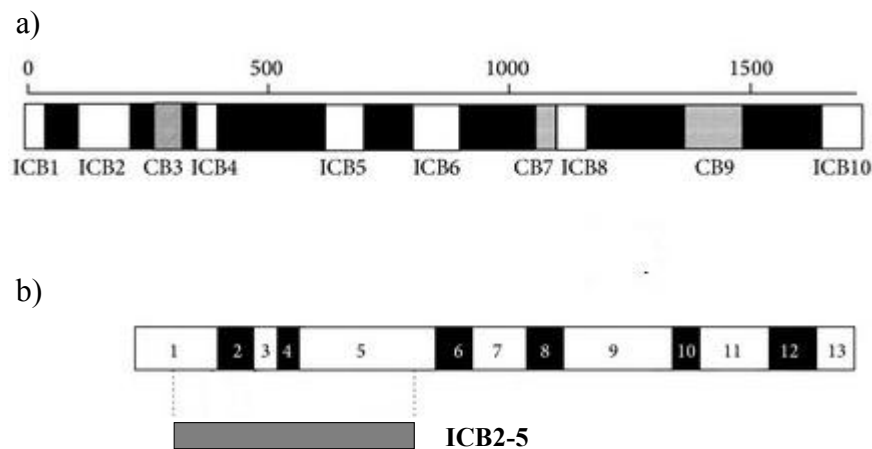


Figura 6 – Representação esquemática da PvMSP-1 seguindo del Portillo et al., 1991 (a), cujos blocos conservados entre *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelli* são apresentados em branco (ICB), os blocos conservados apenas entre *P. vivax* e *P. falciparum* são apresentados em cinza (CB) e os blocos polimórficos são apresentados em preto e, a divisão seguindo Putaporntip et al., 2002 (b), com os 7 blocos conservados (branco) e 6 blocos polimórficos (preto). Em destaque está representado a proteína recombinante ICB2-5.

Fonte: adaptado de Versiani e colaboradores (2013).

1.10 Apical membrane antigen-1 (AMA-1)

AMA-1 é uma proteína transmembrana, cujo ectodomínio, rico em cisteína, pode ser dividido em uma região N-terminal e 3 domínios (DI, DII e DIII) (Figura 7). Esta proteína está presente em todas as espécies de *Plasmodium* e também é encontrada em outras espécies do filo Apicomplexa, tais como *Toxoplasma gondii* e *Babesia bovis* (REMARQUE et al., 2007).

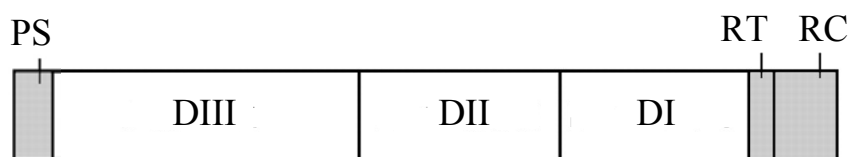


Figura 7 – Representação esquemática da proteína PvAMA-1. Em branco está representado o ectodomínio rico em cisteína, formado pelos domínios I, II e III. RC: Região citoplasmática; RT: Região transmembrana; PS: Peptídeo sinal.

Fonte: adaptado de Múfalo e colaboradores (2008).

Inicialmente, AMA-1 do *P. falciparum* é processada como um precursor de 83 kDa, presente nos micronemas do polo apical. A translocação para a superfície dos merozoítos é acompanhada pela clivagem da região N-terminal do precursor, gerando uma proteína de 66 kDa. Uma vez na superfície dos merozoítos e, momentos antes da invasão dos eritrócitos, a proteína sofre nova clivagem, que pode ocorrer em dois sítios alternativos da porção C-terminal: ou logo abaixo do domínio III, próximo a membrana do parasito, produzindo um fragmento de 48 kDa, ou entre os domínios II e III, gerando um fragmento de 44 kDa (HOWELL et al., 2005).

Apesar de não se conhecer a precisa função da AMA-1, diversos estudos demonstram o papel essencial desta proteína durante o processo de invasão dos merozoítos aos eritrócitos. Anticorpos monoclonais contra a AMA-1 foram capazes de inibir, *in vitro*, a invasão dos merozoítos de diferentes espécies, tais como *P. knowlesi*, *P. reichenowi* e *P. falciparum* (THOMAS et al., 1984; KOCKEN et al., 2000; 2002). Recentemente, anticorpos obtidos de camundongos imunizados com a PvAMA-1 inibiram a invasão do *P. vivax* aos reticulócitos (VICENTIN et al., 2013). Os mecanismos pelos quais estes anticorpos medeiam a proteção contra a invasão ainda não são bem conhecidos, mas foi demonstrando que anticorpos que impedem o processamento secundário da proteína são importantes em prevenir a invasão dos merozoítos (DUTTA et al., 2005).

Existem evidências que indicam que a AMA-1 pode atuar em três momentos diferentes durante o processo de invasão dos merozoítos aos eritrócitos. Acredita-se que uma de suas funções seja facilitar a reorientação dos merozoítos após adesão inicial. Na presença de anticorpo monoclonal contra a AMA-1 capaz de inibir a invasão, merozoítos de *P. knowlesi* foram capazes de aderir aos eritrócitos, mas não sofreram reorientação (MITCHELL et al., 2004). Segundo, é possível que a proteína AMA-1 exerça sua função ao se ligar diretamente aos eritrócitos. Oito peptídeos sintéticos abrangendo a AMA-1 do *P. falciparum* foram capazes de se ligar em eritrócitos humanos (URQUIZA et al., 2000). Células COS-7 expressando os domínios I e II da AMA-1 do *P. yoelli* (FRASER et al., 2001) ou do *P. vivax* (BARBEDO, 2007) foram capazes de se ligar em eritrócitos de ratos ou humanos, respectivamente. Mais recentemente, tem sido demonstrado que a AMA-1 participa da formação da junção de movimento, uma área de íntimo contato entre o parasito e a membrana do eritrócito. Esta junção de movimento inclui um complexo de proteínas formado pelas RON-2, -4 e -5, que são inseridas na membrana do eritrócito, e uma vez que ocorre a ligação da AMA-1 com a RON-2, inicia-se o movimento da junção ao redor do merozoíto, culminando na entrada do parasito na células hospedeira (BARGIERI et al., 2012).

Vários estudos soroepidemiológicos tem mostrado que a AMA-1 é imunogênica em infecções naturais. No Brasil, a resposta sorológica contra a AMA-1 do *P. vivax* foi avaliada em indivíduos naturalmente expostos de diferentes regiões endêmicas (RODRIGUES et al., 2005; MÚFALO et al., 2008; BUENO et al., 2011; STORTI-MELO et al., 2011). Bueno e colaboradores (2011) investigaram a resposta imune humoral contra a AMA-1 de indivíduos em Manaus e Cuiabá, e identificaram que a região II do ectodomínio (DII) possui maior potencial antigênico. IgG total e suas subclasses foram avaliadas para um peptídeo sintético correspondendo a um epítopo de células B, presente em DII, e duas proteínas recombinantes correspondendo ao ectodomínio e ao domínio DII inteiro e encontraram reatividade sorológica semelhante. Este resultado está de acordo com o obtido por Múfalo e colaboradores (2008), que avaliaram a resposta

sorológica contra os três domínios separados da AMA-1 do *P. vivax* em indivíduos do Estado do Pará, e verificaram que o reconhecimento do domínio II foi maior quando comparado com o dos outros dois domínios (DI e DIII).

1.11 Duffy Binding Protein (DBP)

A DBP do *P. vivax* é uma proteína de 140 kDa, pertencente a uma família de proteínas homólogas que se ligam aos eritrócitos, as EBPs (do inglês *erythrocyte binding protein*). A porção extracelular desta proteína pode ser dividida em seis regiões, baseadas na homologia das sequências de aminoácidos com outras EBPs. Cada proteína tem um peptídeo sinal (região I), duas regiões ricas em cisteína (regiões II e VI) e três regiões hidrofílicas (III, IV e V). O domínio transmembrana e um curto segmento citoplasmático são representados pela região VII. O ligante funcional da PvDBP encontra-se localizado na região II da proteína, possuindo aproximadamente 180 aminoácidos, situado entre as cisteínas 4 e 7 (Figura 8) (VANBUSKIRK et al., 2004).

A DBP está localizada nos micronemas e, apenas momentos antes da invasão, é liberada na superfície do merozoíto. Para que o merozoíto do *P. vivax* invada o eritrócito é necessária a interação da PvDBP com seu receptor, o antígeno Duffy receptor para quimiocinas (DARC) (HORUK et al., 1993). A importância desta ligação remonta à década de 1970, quando Miller e colaboradores (1976) postularam que indivíduos completamente refratários à infecção por *P. vivax* não possuíam o receptor sanguíneo Duffy. Entretanto, apesar da reconhecida resistência conferida pela ausência do antígeno Duffy nos eritrócitos, recentemente vários estudos relataram casos de indivíduos Duffy negativos infectados com *P. vivax* (CAVASINI et al., 2007; MÉNARD et al., 2010; MERCEREAU-PUJALON e MÉNARD, 2010; MENDES et al., 2011; CARVALHO et al., 2012; WOLDEAREGAI et al., 2013).

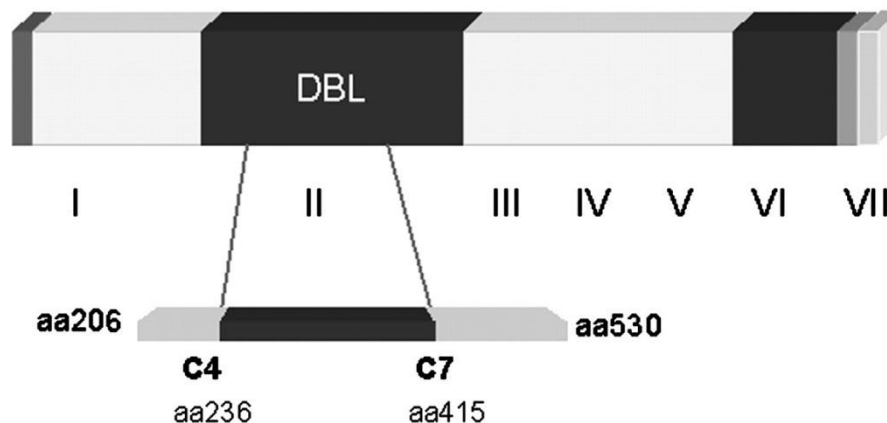


Figura 8 – Representação esquemática da proteína da PvDBP, apresentando as 6 regiões extracelulares (I a VI) e uma região transmembrana e citoplasmática (VII). Em destaque está o ligante funcional da proteína, situado entre os aminoácidos 236 e 415 no domínio II.

Fonte: Vanbuskirk e colaboradores (2004).

Anticorpos naturalmente adquiridos contra a PvDBP são encontrados em residentes de áreas onde o *P. vivax* é endêmico e estes anticorpos foram capazes de inibir a ligação da DBP (DII) e a invasão dos merozoítos nos eritrócitos, tanto em Nova Guiné, uma área de alta endemicidade (GRIMBERG et al., 2007), como na Amazônia brasileira, em área de baixa endemicidade (CERÁVOLO et al., 2008). Porém, a prevalência e os níveis de anticorpos anti PvDBP variam entre indivíduos e parecem aumentar de acordo com a idade e a exposição (VANBUSKIRK et al., 2004; CERÁVOLO et al., 2005; CHOOTONG et al., 2010). Interessantemente, cerca de 10% dos indivíduos expostos ao *P. vivax* adquirem altos títulos de anticorpos, cepa-transcendente, que estão associados com redução de 50% no risco de infecção (KING et al., 2008). Além disso, experimentos *in vitro* sugerem que os anticorpos contra a PvDBP, tanto de indivíduos naturalmente expostos, como artificialmente induzidos, bloqueiam a ligação da PvDBPII aos eritrócitos do grupo Duffy Fy^{a+} de maneira mais eficiente do que em eritrócitos Fy^{b+} , sugerindo que a eficácia de bloqueio dos anticorpos pode ser influenciado por polimorfismos do eritrócito (KING et al., 2011).

1.12 Coestimulação de linfócitos B e T

O desenvolvimento de uma resposta imune adequada depende de uma fina regulação da ativação dos linfócitos. Para isto, de maneira geral, os linfócitos requerem um duplo sinal para se tornarem ativados. O primeiro sinal é antígeno específico e é mediado pela ligação do antígeno com o receptor de células T (TCR), no caso das células T, ou pela ligação do antígeno com as imunoglobulinas presentes na superfície das células B. O segundo sinal, chamado de coestimulação, é gerado pela interação de moléculas presentes na superfície das células T e das células apresentadoras de antígeno (APCs). Na ausência de um sinal coestimulador, os linfócitos não produzem citocinas, são incapazes de proliferarem e frequentemente sofrem apoptose ou se tornam anérgicos (revisto em FRAUWIRTH e THOMPSON, 2002). As moléculas das principais vias coestimulatórias e que foram abordadas nesta tese serão apresentadas abaixo.

1.13 Moléculas associadas na coestimulação da resposta imune: CD80/CD86-CD28/CTLA-4

CD28 foi a primeira molécula coestimulatória descoberta após a consideração de que a ativação de células T requer sinais adicionais além do antígeno específico reconhecido pelo TCR. Esta molécula foi inicialmente identificada por anticorpos que reconheceram uma proteína de 44 kDa na superfície de células T (HANSEN et al., 1980), expressa como um homodímero glicosilado unido por pontes dissulfeto (ARUFFO e SEED, 1987). Em humanos, CD28 é expressa constitutivamente tanto em células T virgens quanto em células T ativadas, embora uma pequena parcela de células T CD4+ não expressam CD28 (GROSS et al., 1990; AMYES et al., 2005). Além disso, CD28 também está presente em plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos (VENUPRASAD et al., 2001; WOERLY et al., 2002).

Os estímulos dados por CD28, juntamente com o fornecido pelo TCR são responsáveis por iniciar uma cascata de sinalização que conduz a fosforilação da tirosina de várias proteínas críticas para a ativação das células T (VIOLA et al., 1999). A coestimulação de CD28 aumenta a produção de diferentes citocinas, especialmente IL-2, cuja produção é aumentada em 50 vezes por meio da regulação transcricional e pós-transcricional do gene desta citocina (FRASER et al., 1991). Além disso, a sobrevivência das células T é aumentada, em parte, pela indução da expressão de proteínas antiapoptóticas, incluindo Bcl-X_L (SPERLING et al., 1996). Assim, por uma variedade de mecanismos, a coestimulação mediada por CD28 aumenta a resposta efetora de células T ao antígeno.

Ainda, CD28 é requerida no desenvolvimento de células T regulatórias (Tregs) no timo e também contribui para a homeostase e sobrevivência destas células na periferia (SEMPLE et al., 2011; ZHANG et al., 2013). Camundongos *knockout* para CD28 apresentam um número reduzido de células Tregs no timo e desenvolvem doenças autoimunes (SALOMON et al., 2000) e com a utilização de CTLA4g, uma molécula recombinante que age como inibidor da via coestimulatória mediada por CD28, foi notada uma rápida diminuição de células Tregs periféricas e no timo (TANG et al., 2003).

Pouco tempo após a identificação de CD28, uma molécula relacionada, denominada de CTLA-4 foi descoberta em uma biblioteca de cDNA de células T CD8⁺ (BRUNET et al., 1987). O sequenciamento do gene demonstrou que esta molécula está relacionada à CD28, apresentando homologia estrutural e em suas sequências de aminoácidos, incluindo o domínio de ligação às moléculas B7, centralizado nos aminoácidos MYPPY (BALZANO et al., 1992). Dada estas similaridades, inicialmente se acreditou que CTLA-4 representava uma molécula coestimulatória adicional. Entretanto, uma série de experimentos utilizando anticorpos contra CTLA-4 sugeriram que esta molécula estava envolvida com a inibição da ativação de células T (WALUNAS et al., 1994; KEARNEY et al., 1995; KRUMMEL e ALLISON, 1995). Finalmente, a importância de CTLA-4 como um inibidor da ativação de células T foi demonstrada em camundongos

knockout para CTLA-4, cujos camundongos morreram após desenvolveram linfoproliferação de células T (TIVOL et al., 1995).

Funcionalmente, foi demonstrado o papel inibidor de CTLA-4 na proliferação de células T, progressão do ciclo celular e na produção de IL-2 (WALUNAS et al., 1994; 1996). Além disso, os sinais mediados por esta molécula influenciam a diferenciação de células T CD4⁺: camundongos deficientes em CTLA-4 apresentaram desvio da resposta imune para o tipo Th2 (KHATTRI et al., 1999). Mais recentemente, também foi demonstrado que CTLA-4 influencia a resposta imune do tipo Th17, uma vez que o bloqueio de CTLA-4 por anticorpos monoclonais resultou em um aumento da diferenciação de células Th17 e da produção de IL-17 tanto *in vivo* como *in vitro* (YING et al., 2010).

Em contraste a CD28, que é constitutivamente expressa em células T em repouso, CTLA-4 é expressa apenas em células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas, por meio de indução transcricional e redistribuição celular (PERKINS et al., 1996; EGEN e ALLISON, 2002). CTLA-4 é pré-sintetizada e armazenada em vesículas intracelulares e com o aumento dos níveis de cálcio intracelular que ocorre após a ativação das células T, CTLA-4 é liberada para a superfície das células T ativadas (SIGAL, 2012). Ambas as moléculas, CD28 e CTLA-4, compartilham os mesmos ligantes, denominados CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), sendo que a afinidade do CTLA-4, comparada a CD28, é de 500 a 2.500 vezes maior (SIGAL, 2012). Dessa forma, uma das maneiras que CTLA-4 pode agir como um regulador negativo é devido a competição direta com CD28 para os seus ligantes, impedindo assim a sinalização por CD28. Além disso, a ligação de B7 a CTLA-4 emite um sinal inibitório à célula T ativada por meio de seu domínio intracitoplasmático, alterando tanto a sinalização mediada por CD28 como pelo TCR (CARRENO et al., 2000; ENGLEHARDT et al., 2006). Outra maneira pela qual CTLA-4 pode inibir a ativação de células T é decorrente do envio de um sinal às APCs por meio dos ligantes B7, que induz estas células a produzirem a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), o que leva a depleção do aminoácido triptofano, que é essencial para a proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (MUNN et al., 2004)

Os ligantes CD80 e CD86 são provavelmente as moléculas coestimulatórias mais bem caracterizadas. CD80, originalmente descoberto em células B esplênicas, é uma proteína transmembrana altamente glicosilada, membro da superfamília de imunoglobulinas, com 45-60 kDa (FREEMAN et al., 1989). Alguns anos após a descoberta de CD80, uma segunda molécula da família B7 foi clonada e caracterizada funcionalmente, passando a ser conhecida como CD86, uma proteína transmembrana de 70 kDa (FREEMAN et al., 1993).

Ambas, CD80 e CD86 são expressas predominantemente na superfície das APCs, tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B ativados. No entanto, existem diferenças na expressão destas moléculas nas APCs. O mRNA de CD86 é constitutivamente expresso em células B, enquanto que a transcrição de CD80 é aumentada apenas após a ativação das células B (FREEMAN et al., 1993). A expressão de ambas as moléculas é aumentada com a interação das APCs com o linfócito T após estímulos fornecidos pelo antígeno, citocinas, CD40L e CD28, sendo a expressão de CD80 induzida posteriormente ao aumento da expressão de CD86.

O importante papel desta via de coestimulação na ativação das células T é evidenciado por uma série de experimentos. *In vitro*, células T CD4⁺ respondem com a secreção de citocinas e proliferação quando o antígeno é apresentado por APCs que expressam as moléculas CD80 e CD86, mas não quando o antígeno é apresentado por APCs sem estas moléculas. Em diversos modelos animais de doenças cuja ativação de células T é crítica, o bloqueio de CD80 e CD86 inibiu o desenvolvimento das doenças (BUONO et al., 2004; VINH et al., 2010; SHI et al., 2011; YAO et al., 2012).

Ainda, tem sido demonstrado que CD80 e CD86 regulam a diferenciação das células T CD4⁺ para os padrões de resposta Th1 ou Th2. Várias evidências sugerem que CD80 promove uma resposta mais voltada ao padrão Th1, enquanto que CD86 promove uma resposta mais voltada ao padrão Th2 (LENSCHOW et al., 1996; SCHWEITZER e SHARPE, 1998; ODOBASIC et al., 2005). Estudos utilizando camundongos deficientes em CD80 e CD86 também mostram que estas moléculas são importantes para a produção de anticorpos e troca de isotipo

(BORRIELO et al., 1997; ODOBASIC et al., 2005). Novos dados demonstraram que CD86 nas células B pode transmitir sinais bidirecionais. CD86 estimula CD28 nas células T e transduzem sinais positivos para as células B que aumentam a produção de IgG1 e IgE (PODOJIL e SANDERS, 2003; PODOJIL et al., 2004).

1.13.1 CD80/CD86-CD28/CTLA-4 e malária

Existem estudos indicando que a diferenciação das células T CD4+ auxiliares para os padrões de resposta Th1 ou Th2 sofre influência dos níveis de expressão de CD80 e/ou CD86 das APCs. Em um modelo utilizando camundongos com encefalomielite autoimune experimental, a injeção de mAb anti-CD80 alterou o padrão de resposta para Th2, enquanto que a injeção com mAb anti-CD86 alterou o padrão de resposta para Th1. A mais simples interpretação destes dados é que CD80 age como um coestimulador para a geração de células Th1 e CD86 promove a geração de células Th2 (KUCHROO et al., 1995). Outros autores também relataram o papel de CD86 no desvio da resposta imune para o tipo Th2 em outras doenças, tais como leishmaniose cutânea e glomerulonefrite progressiva (BROWN et al., 1996; ODOBASIC et al., 2005).

No entanto, este padrão de diferenciação envolvendo as moléculas CD80 e CD86 nem sempre ocorre. Por exemplo, em modelo de diabetes autoimune em camundongos não obesos, onde o fenótipo Th1 predomina, o bloqueio de CD86 preveniu o aparecimento de diabetes (LENSCHOW et al., 1995). Em um recente estudo, a sinalização por CD86 afetou a polarização para Th1, uma vez que seu bloqueio reduziu em 10 vezes a capacidade das células T em secretar IFN- γ (LICHTENEGGER et al., 2012).

Uma resposta protetora contra a malária envolve diferentes mecanismos. Tem sido proposto que durante a infecção, as células Th1 secretoras de IFN- γ são fundamentais para o controle inicial da multiplicação intraeritrocitária dos parasitos (TAYLOR-ROBINSON et al., 1993; STEVENSON et al., 1995),

enquanto que no decorrer da infecção o desenvolvimento da resposta mediada por anticorpos (Th2) é crucial para o clareamento de baixas parasitemias e resolução da fase crônica (TAYLOR-ROBINSON et al., 1993; VON DER WEID et al., 1996).

Consistente com a função de CD86 na diferenciação da resposta Th2, o tratamento de camundongos com mAb anti-CD86 aboliu a produção de IL-4 e aumentou a produção de IFN- γ pelas células T em resposta a infecção pelo *P. chabaudi*. Esta alteração não foi evidenciada quando os camundongos foram tratados apenas com mAb anti-CD80 (TAYLOR-ROBINSON e SMITH, 1999). Além disso, o bloqueio de CD86 foi associado com diminuição da subclasse IgG1, representativa da resposta Th2. No entanto, alterações não foram evidenciadas na produção de IgG2a (Th1), cujos níveis permaneceram baixos, tanto em camundongos tratados com mAb anti-CD86 como com anti-CD80. A parasitemia dos camundongos tratados com mAb anti-CD86 foi inicialmente similar a dos camundongos controles ou tratados com mAb anti-CD80. Entretanto, enquanto estes últimos foram capazes de resolver a infecção, os camundongos deficientes em CD86 mantiveram parasitemia patente, resultando em infecção crônica de baixo grau (TAYLOR-ROBINSON e SMITH, 1999).

De acordo com estes resultados, quando camundongos *knockout* para o gene *CD28* foram infectados com *P. chabaudi*, eles foram incapazes de resolver a infecção, permanecendo com baixos níveis de parasitemia por semanas após a infecção (RUMMEL et al., 2004, ELIAS et al., 2005). Em conjunto, estes resultados indicam que a interação CD86-CD28 é crucial para o clareamento da parasitemia. Possivelmente, esta baixa parasitemia seja mantida devido a alterações na produção de anticorpos por estes camundongos. De fato, camundongos CD28^{-/-} produziram menores quantidades de anticorpos contra AMA-1 e MSP-1₄₂ e, enquanto os camundongos controles produziram anticorpos de todos os isotipos avaliados, com predomínio de IgG2b e IgG2c, IgM representou 90% dos anticorpos mensurados no soro dos camundongos CD28^{-/-} infectados, sugerindo que a troca de isotipo foi deficiente nos camundongos *knockout* (RUMMEL et al., 2004).

Na infecção de camundongos com *P. chabaudi* observa-se uma intensa ativação policlonal das células T e B esplênicas que se caracteriza pela produção de IFN- γ , IgM e IgG2a (D'IMPÉRIO LIMA et al., 1996; SARDINHA et al., 2002). A sinalização mediada por CD28 também parece ser importante na ativação policlonal dos linfócitos, uma vez que CD69, um dos primeiros antígenos expresso na superfície dos linfócitos após a ativação é encontrado em menores proporções em camundongos CD28^{-/-} infectados com *P. chabaudi* quando comparados com camundongos controles (ELIAS et al., 2005). Neste estudo, para avaliar se a sinalização de CD28 influencia a produção de Abs policlonais, células esplênicas secretoras de IgM e IgG2a foram comparadas entre camundongos CD28^{-/-} e CD28^{+/+}, e notou-se que embora CD28 tenha pouca influência na produção de IgM, a produção de IgG2a foi significativamente menor na ausência de CD28, corroborando com estudos prévios que demonstram que a produção de IgM é produzida independente de células T enquanto que a produção de IgG2a é principalmente T dependente (FALANGA et al., 1987; SARDINHA et al., 2002). Além disso, quando camundongos CD28^{-/-}, incapazes de erradicar os parasitos, receberam soro contendo IgG2a dos camundongos controles, a infecção foi eliminada.

A sinalização de CD28 também é importante na ativação de células T $\gamma\delta$. É conhecido que tanto em humanos como em camundongos infectados com *Plasmodium* ocorre expansão das células T $\gamma\delta$ (HO et al., 1990; DIELI et al., 2001), e estas células são importantes produtoras de IFN- γ em pacientes de áreas endêmicas (D'OMBRAIN, et al., 2007). Utilizando um modelo de malária grave induzida em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, foi demonstrado que a proliferação das células T $\gamma\delta$ foi reduzida em camundongos *knockout* para o gene *CD28*. Adicionalmente, um menor número de células $\gamma\delta$ produzindo IFN- γ e IL-17 foi observado (RIBOT et al., 2012).

O fato do bloqueio de CD86, que também se liga ao receptor CTLA-4, resultar em um aumento da produção de IFN- γ (TAYLOR-ROBINSON et al., 1999), enquanto que o bloqueio de CD28, que facilita a ligação das moléculas CD80 e CD86 com CTLA-4, resultar em um decréscimo na produção de IFN- γ ,

sugere que CTLA-4 participe no controle da produção de IFN- γ em infecções por *Plasmodium* (ELIAS et al., 2005). Em camundongos infectados com *P. berghei*, uma grande proporção de células T CD4⁺ expressando CTLA-4 foi induzida durante a infecção (JACOBS et al., 2002), semelhante ao que ocorre em humanos infectados com *P. falciparum* e/ou *P. vivax* (SCHLOTMANN et al., 2000).

Em camundongos infectados com *P. berghei*, ocorre inflamação do fígado, associado à infiltração de células T, embora pouco dano tecidual possa ser observado (JACOBS et al., 2004). No entanto, quando os camundongos são administrados com anticorpos anti-CTLA-4, nota-se uma acentuada lesão hepática, provavelmente decorrente de maior produção de IFN- γ , uma vez que em camundongos deficientes de IFN- γ tais alterações não puderam ser evidenciadas e um aumento de células hepáticas produtoras de IFN- γ foi observado nos camundongos deficientes para CTLA-4 quando comparados com os controles (JACOBS et al., 2004).

Durante a imunização de camundongos com um epítipo da CSP de *P. berghei*, o bloqueio de CTLA-4 antes da administração da vacina levou a um aumento na produção de células T CD8⁺ CSP específicas e na proporção de células produtoras de IFN- γ . Embora os camundongos não apresentaram qualquer proteção clínica quando vacinados apenas com o epítipo, a estratégia de bloquear CTLA-4 promoveu a proteção clínica em cerca de 60% dos camundongos desafiados com *P. berghei* (TARTZ et al., 2006).

É curioso notar que o bloqueio de CTLA-4 em camundongos infectados com *P. berghei* apresente resultados distintos durante o estágio eritrocítico. Além da já mencionada lesão hepática, a maior proliferação de células T CD4⁺ conduz a exacerbação da doença. A grande maioria dos camundongos infectados com *P. berghei* desenvolveram altas parasitemias e anemia severa, mas sobreviveram a infecção, e apenas 20% dos camundongos morreram com baixas parasitemias e malária cerebral. Em contraste, quando a via CTLA-4 foi bloqueada, todos os camundongos morreram com sinais de malária cerebral (JACOBS et al., 2002).

Além disso, resultados distintos também são observados em infecções com duas cepas diferentes de *P. yoelli*, uma não letal (Py17NL) e outra com maior

letalidade (Py-lethal). Em camundongos infectados com a cepa não letal, o bloqueio de CTLA-4 aumentou a ativação de células T CD4+, os camundongos apresentaram menores parasitemias e foram capazes de resolver a infecção antes dos camundongos controles. Níveis aumentados de IFN- γ foram observados, bem como de IL-4 e IL-10 (LEPENIES et al., 2007). Já nos camundongos infectados com a cepa letal, o bloqueio de CTLA-4 também conduziu a maior produção de IFN- γ , mas também de TNF- α , provocando maior mortalidade (LEPENIES et al., 2007).

Sabe-se que CTLA-4 é expresso na superfície de células T ativadas, mas também é expresso constitutivamente na superfície de células Tregs. As células Tregs são importantes na manutenção da homeostase imune, controlando respostas imunes excessivas, mas também podem favorecer a sobrevivência dos patógenos. Maiores frequências de células Tregs tem sido associado com maiores parasitemias em pacientes infectados com *P. falciparum* (MINIGO et al., 2009; SCHOLZEN et al., 2009), enquanto que em modelos murinos as células Tregs estão associadas a proteção contra malária cerebral (AMANTE et al., 2007; NIE et al., 2007), principalmente via CTLA-4 (HAQUE et al., 2010).

Em um elegante estudo, a expressão de diferentes genes envolvidos na resposta imune foi comparada entre indivíduos de duas etnias simpátricas, Fulani e Mossi. Apesar da similaridade dos níveis de exposição, indivíduos da etnia Fulani produzem mais anticorpos e são mais resistentes à infecção por *Plasmodium* (BOLAD et al., 2005). Nos Fulani, foi evidenciado redução na expressão de CTLA-4 e FOXP3, sugerindo que o déficit funcional de células Tregs pode estar associado a proteção à malária neste grupo étnico (TORCIA et al., 2008).

1.14 Moléculas associadas na coestimulação do linfócito B: CD40-CD40L

CD40 é uma proteína transmembrânica tipo I, de aproximadamente 50 KDa, membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral

(TNFR). Apesar desta proteína ser expressa principalmente na superfície de células apresentadoras de antígenos, tais como células B, macrófagos, monócitos e células dendríticas (DCs) (CHATZIGEORGIOU et al., 2009), ela também é expressa por células não imunes, incluindo células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e plaquetas (SCHONBECK e LIBBY, 2001; DANESE et al., 2004). O ligante da molécula CD40 (CD40L) é uma proteína transmembrânica de aproximadamente 39 KDa pertencente a família do TNF, expressa na superfície de células T CD4+ ativadas, podendo ainda ser expressa na superfície de células T CD8+, eosinófilos, mastócitos, DCs, macrófagos e células NK (SCHONBECK e LIBBY, 2001; DANESE et al., 2004). Além disso, formas solúveis de CD40L também tem sido descritas (LUDEWIG et al., 1996; WYKES et al., 1998), sendo a proteína com 18 KDa, formada após perda da porção citoplasmática, transmembrânica e parte do domínio extracelular, funcional e capaz de se ligar ao seu receptor, CD40 (LUDEWIG et al., 1996; WYKES et al., 1998).

A via de sinalização CD40/CD40L foi inicialmente descrita como responsável pela ativação e diferenciação de células B (CLARK e LEDBETTER, 1986). Atualmente se sabe que a interação entre estas duas moléculas é fundamental tanto para o desenvolvimento de uma resposta imune humoral quanto celular. As primeiras evidências das funções biológicas da ligação de CD40 vieram de pacientes possuindo mutações no gene *CD40L*, causando uma doença conhecida como síndrome da hiper-IgM, cujas células B são incapazes de realizarem a troca na classe de imunoglobulinas de IgM para IgG ou IgA (revisto em QAMAR e FULEIHAN, 2013). No início da década de 90, outras evidências apoiaram a ideia de que a interação CD40/CD40L é necessária para a ativação e proliferação de células B: 1) anticorpos monoclonais contra CD40L inibiram a ativação de células B por células T helper (NOELLE et al., 1992); 2) camundongos deficientes em CD40L não formam centros germinativos em resposta a antígenos timo-dependentes (XU et al., 1994); e 3) camundongos sem CD40L foram incapazes de realizarem troca de isotipo em resposta a antígenos timo-dependentes (RENSHAW et al., 1994).

Além dos diferentes aspectos da interação CD40-CD40L na imunidade humoral, tem sido provado que esta interação também é fundamental na resposta imune mediada por células (CHATZIGEORGIOU et al., 2009; GOMMERMAN e SUMMERS DELUCA, 2011). O engajamento de CD40L com seu receptor CD40 é necessário para a ativação de células T e pode regular a expressão de moléculas coestimulatórias (FOY et al., 1995; GREWAL et al., 1996). CD40L regula a atividade coestimulatória das APCs, aumentando a expressão de moléculas de superfície tais como CD80 e CD86 nas células B e estimula as DCs a expressar CD86, CD54 e MHC II (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; FRLETA et al., 2003). A ligação de CD40 nas APCs não apenas ajuda as células T a se tornarem ativadas, mas também participa na ativação das próprias APCs, especialmente as DCs, induzindo estas células a produzirem várias citocinas, tais como IL-6, IL-8, IL-10, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α , TNF- α (CAUX et al., 1994; BURDIN et al., 1995; MUNROE e BISHOP, 2007) assim como IL-12, uma citocina crucial na polarização da resposta imune para Th1 (CELLA et al., 1996). Adicionalmente, a ligação de CD40 em monócitos e DCs conduzem a secreção de metaloproteinases de matriz (MMP), óxido nítrico e aumento da atividade tumoricida (CAUX et al., 1994; TIAN et al., 1995; MALIK et al., 1996).

Atualmente, o requerimento de CD40 em respostas por células T CD8⁺ é bem documentado, sendo fundamental para muitas respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) (GOMMERMAN e SUMMERS DELUCA, 2011), geração de células T CD8⁺ de memória (XYDIA et al., 2011) e permite as células T CD8⁺ executar funções *helper* tais como ativação de APCs e exibirem expressão de citocinas similar a de células CD4⁺ (FRENTSCH et al., 2013).

1.14.1 CD40-CD40L e malária

A resposta inicial do hospedeiro contra infecções pelo parasito da malária é caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α (JACOBS et al., 1996; de SOUZA et al., 1997). Estas citocinas pró-inflamatórias são produzidas em sua

maioria por células NKs e T CD4⁺ após o estímulo de IL-12, produzida por DCs ativadas (MACATONIA et al., 1995; HEUFLER et al., 1996). A produção de IL-12 pelas DCs é induzida pela ligação de CD40 com seu ligante CD40L (CELLA et al., 1996). No entanto, em camundongos, *P. chabaudi chabaudi* é capaz de ativar diretamente as DCs, sem o requerimento da ligação de CD40 (SEIXAS et al., 2001). Em outro modelo, utilizando camundongos infectados com uma cepa não letal de *P. berghei*, foi demonstrado que as células T $\gamma\delta$ são importantes na resolução da infecção, aumentando a ativação das DCs por meio da sinalização CD40/CD40L. Apesar dos camundongos controles serem capazes de se curarem dentro de 30 dias após a infecção, camundongos *knockout* para o gene *TCR δ* apresentaram maiores parasitemias e morreram. Ao injetar anticorpos agonistas para CD40, ativando este receptor, os camundongos *knockout* foram capazes de eliminar a parasitemia e sobreviveram (INOUE et al., 2012).

Ainda mais interessante, dependendo se as DCs estão em contato com eritrócitos infectados, ou com merozoítos livres no sangue, a via de sinalização CD40/CD40L pode ativar as DCs de maneira diferente. Se colocadas em cultura apenas com merozoítos livres, ou com eritrócitos infectados com *P. falciparum*, as células dendríticas não foram ativadas. Quando foi adicionado CD40L solúvel (sCD40L), as DCs expostas aos merozoítos expressaram menos CD40, CD80 e HLA-DR, enquanto que a expressão destas moléculas foi aumentada nas DCs expostas aos eritrócitos infectados. Ainda, o estímulo com sCD40L resultou em maior produção de IL-12, IL-6 e TNF- α das DCs expostas aos eritrócitos infectados e redução na expressão de IL-12 e aumento de IL-10 pelas DCs expostas aos merozoítos. Juntos, estes resultados sugerem que a exposição das DCs aos merozoítos livres produz uma resposta imune do tipo Th2, e se expostas a eritrócitos infectados, induz uma resposta do tipo Th1, mediada pela sinalização via CD40 (MUKHERJEE e CHAUHAN, 2008).

O papel de CD40 também tem sido demonstrado na malária grave. Camundongos *knockout* CD40^{-/-} ou CD40L^{-/-} infectados com *P. berghei* ANKA sobreviveram por mais dias, quando comparados aos camundongos controles, que sucumbem a infecção até o oitavo dia após a infecção. Nos camundongos cuja via

de sinalização CD40/CD40L permaneceu intacta, houve mais ruptura da barreira hematoencefálica e a esplenomegalia e a perda de plaquetas foram mais pronunciadas (PIGUET et al., 2001). Quando os camundongos foram tratados com mAbs anti-CD40, a trombocitopenia e a quantidade de micropartículas foram diminuídas (PIGUET et al., 2002).

A interação CD40/CD40L é crítica para o estabelecimento de uma resposta imune humoral, em particular para a troca de isotipo, maturação de células de memória e formação dos centros germinativos. A produção de anticorpos contra proteínas recombinantes de *P. falciparum* por PBMCs de indivíduos residentes em áreas de malária holo- ou mesoendêmicas foi avaliada *in vitro*, e observou-se que a proporção de respondedores contra as proteínas R23, PfEB200, MSP-2 e MSP-1₁₉ foi aumentada quando a coestimulação com sCD40L foi fornecida. No entanto, a distribuição das subclasses de IgG não foi alterada quando IL-6, sCD40L ou mAbs anti-CD40 foram adicionados (GARRAUD et al., 2002).

1.15 Molécula associada na coestimulação do linfócito B: BLyS

A descoberta de BLyS (do inglês *B lymphocyte stimulator*), também conhecido como BAFF, no final da década de 1990, possibilitou grandes avanços no entendimento das atividades dos linfócitos B e homeostase. A sobrevivência das células B depende de sinais gerados da ligação de BLyS com seu receptor BR3 (também conhecido como BAFF-R) (THOMPSON et al., 2001). Além de BR3, BLyS pode se ligar a outros dois receptores, denominados TACI (do inglês *transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor*) e BMCA (do inglês *B-cell maturation fator*) (GROSS et al., 2000).

BLyS é expressa principalmente sobre monócitos, macrófagos, neutrófilos e células T ativadas, mas baixa expressão também é observada sobre células de diferentes tecidos (MOORE et al., 1999; SCHNEIDER et al., 1999). BLyS é uma proteína transmembrana do tipo II, com 285 aminoácidos, podendo ser encontrada na forma solúvel (183 aminoácidos) após clivagem por proteases do tipo furina.

Alguns estudos demonstraram que a expressão de BLyS é regulada em resposta a outras citocinas, especificamente IFN- α , IFN- γ , IL-10 e CD40L (NARDELLI et al., 2001; LITINSKIY et al., 2002).

A principal função de BLyS é fornecer sinais para garantir a sobrevivência de células B imaturas e maduras. Após saírem da medula óssea, as células B dependem de sinais derivados do receptor de células B (BCR) e da interação entre BLyS com seu receptor BR3 para o amadurecimento nos folículos e zona marginal (STADANLICK e CANCRO, 2008). Camundongos com deleção do gene *BLYS* não têm células B maduras, resultando em baixos níveis de anticorpos circulantes e diminuição da resposta imune mediada por anticorpos (GROSS et al., 2001). Se camundongos ou pacientes são tratados com agentes que podem neutralizar BLyS, é observado que este tratamento conduz a perda de células B maduras (MACKAY e SCHNEIDER, 2009).

BLyS também afeta o início e a severidade das doenças autoimunes. A produção excessiva de BLyS ajuda a sobrevivência de células B autoreativas e de baixa afinidade levando a um colapso da tolerância de células B. Níveis aumentados desta citocina são observados no soro de pacientes com diferentes doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide (ROCHAS et al., 2009), lúpus eritematoso sistêmico (PERS et al., 2005) e síndrome de Sjögren (YOUINOU et al., 2012).

Apesar do papel essencial para BLyS ser bem estabelecida no desenvolvimento das células B, resultados contraditórios sobre suas funções são relatados na literatura. Por exemplo, concentrações séricas elevadas de BLyS foram relacionadas com produção de anticorpos auto reativos por alguns investigadores (MARIETTE et al., 2003; PERS et al., 2005) mas não por outros (COLLINS et al., 2006). Provavelmente, estes resultados conflitantes sejam fruto da complexidade biológica decorrente da ligação de BLyS com seus três receptores, somado ainda a existência de outros ligantes, denominados APRIL (do inglês *a proliferation-inducing ligand*) e TWEAK (do inglês *TNF-like weak inducer of apoptosis*) que compartilham com BLyS os receptores TACI e BMCA. Os exatos papéis destes receptores ainda não estão completamente elucidados.

Ausência da sinalização fornecida por TACI está relacionada a diminuição da resposta imune humoral, ilustrada pela acentuada diminuição de resposta T-independente contra antígenos polissacarídeos. Concordante com esta observação é o fato de TACI ser expresso predominantemente em células B presentes na zona marginal, que desempenham papel importante na resposta contra antígenos T-independentes (VON BÜLOW et al., 2001). Devido ao fato de camundongos deficientes em TACI terem maior quantidade de células B, foi proposto que TACI age como um regulador negativo na sobrevivência de células B, diferente de BR3, que fornece sinais de sobrevivência. Consistente com isto, camundongos TACI^{-/-} desenvolvem linfoproliferação e doenças autoimunes com altos títulos de anticorpos (YAN et al., 2001; SESHASAYEE et al., 2003). Pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID) apresentam as mesmas características imunológicas de camundongos TACI^{-/-}, incluindo imunodeficiência e autoimunidade. De fato, de 5% a 10% dos pacientes com CVID possuem no mínimo uma mutação no gene *TACI* (SALZER et al., 2005). Células B destes pacientes não realizam troca de isotipo e baixos níveis de IgG e IgA são observados nestes indivíduos (SALZER et al., 2005).

Já o papel do receptor BCMA é ainda menos claro. Inicialmente, este receptor foi considerado funcionalmente redundante, uma vez que camundongos BCMA^{-/-} não apresentaram fenótipo discernível de camundongos normais (XU e LAM, 2001). No entanto, estudos posteriores indicam que BCMA pode ter dupla função, atuando tanto na sobrevivência de plasmócitos na medula óssea como também agindo em sinergia com Fas no controle da proliferação de células B (O'CONNOR et al., 2004; JIANG et al., 2011).

1.15.1 BLyS e malária

BLyS é uma citocina crítica para a sobrevivência e diferenciação das células B. Citocinas que estimulam a produção de BLyS incluem IL-10 e IFN- γ (CRAXTON et al., 2003), as quais são produzidas durante a infecção por agentes

da malária (WALTHER et al., 2006). De fato os níveis de BLyS foram aumentados em crianças com malária aguda e correlacionado positivamente com os níveis de IL-10 e IFN- γ (NDUATI et al., 2011). No tecido placentário de grávidas com malária, níveis aumentados de BLyS também foram encontrados, e foram negativamente associados com perda de peso dos recém-nascidos (MUEHLENBACHS et al., 2007). *In vitro*, hemozoína e antígenos solúveis do *P. falciparum* induziram a expressão de BLyS na superfície de monócitos e promoveram a proliferação e produção de anticorpos IgG de células B (KUMSIRI et al., 2010).

Entretanto, diferentemente da maior produção de BLyS, reduzida expressão do receptor BR3 foi observada nas células B periféricas de crianças com malária aguda (NDUATI et al., 2011). Isto é semelhante ao observado para outras doenças onde ocorre maior produção de BLyS (SELLAM et al., 2007; FONTAINE et al., 2011) e possivelmente reflete a manutenção da homeostase quando o ligante BLyS está disponível em excesso, o que pode impedir a sobrevivência de células B (SELLAM et al., 2007). De fato, crianças com malária que mantiveram células B expressando mais BR3 produziram mais anticorpos IgM e IgG específicos (NDUATI et al., 2011).

Em um interessante estudo conduzido por Liu e colaboradores (2012), foram utilizados modelos murinos para avaliar o papel de DCs e BLyS na manutenção de células B de memória. As DCs são fundamentais na ativação, proliferação e sobrevivência tanto de células B virgens como de células B de memória, e em parte, sua função é atribuível a produção de BLyS (MACKAY e BROWNING, 2002; AVERY et al., 2003). Liu e colaboradores (2012) demonstraram que apesar da geração de células B de memória em resposta a vacinação com MSP-1₁₉, a função destas células foram anuladas devido a falta de expressão de BLyS nas DCs em camundongos infectados com *P. yoelli*. Os autores utilizaram diferentes ferramentas para confirmar que a expressão de BLyS é essencial para geração de células B de memória específicas para MSP-1₁₉ durante a malária. Primeiro, A transferência de DCs expressando BLyS foi capaz de estimular as células B de memória em camundongos vacinados.

Posteriormente, os autores utilizaram camundongos BLYS-Tg, que expressam BLYS constitutivamente, e verificaram que BLYS aumenta a sobrevivência de células B específicas para a MSP-1₁₉. Além disso, os camundongos BLYS-Tg sobreviveram a infecções de cepas letais de *P. yoelli*, mesmo na ausência de vacinação, demonstrando assim o papel protetor de BLYS. Por último, em uma linhagem de camundongo *knockout* (TRAF3KO), cuja células B não dependem da sinalização por BLYS para sobreviverem, o número de células B específicas para MSP-1₁₉ foi maior do que o visto em camundongos selvagens, após a infecção com *P. yoelli*.

1.16 Molécula associada na coestimulação da resposta imune: ICOS

Outra importante molécula coestimulatória, homóloga a CD28, é chamada ICOS (do inglês *inducible costimulator*). ICOS é expressa em células T CD4⁺ e T CD8⁺ após a ativação e está presente em células T efetoras e de memória (COYLE et al., 2000). O ligante desta molécula, denominado ICOSL, é produzido em células dendríticas, monócitos e células B ativadas. Além dos sinais fornecidos pelo TCR, citocinas tais como IL-12 e IL-23 podem aumentar a produção de ICOS (WASSINK et al., 2004) e apesar dos sinais fornecidos por CD28 não serem necessários para a indução de ICOS, eles aumentam a expressão desta molécula (VAN BERKEL et al., 2005). Notavelmente, a expressão de ICOS parece ser maior em células T CD4⁺ Th2 quando comparado a células T CD4⁺ Th1 (COYLE et al., 2000).

Assim como CD28, a ligação de ICOS aumenta a diferenciação de células T e a produção de citocinas. Inicialmente, ICOS foi relacionado com a produção de altos níveis de IL-10 e IL-4, mas estudos em diferentes modelos também demonstraram a importância desta molécula na produção de citocinas Th1 (McADAM et al., 2000; MAK et al., 2003). Löhning et al. (2003) examinaram e categorizaram células T de órgãos linfoides secundários de ratos de acordo com a expressão de ICOS como alta expressão (ICOS^{high}), média expressão (ICOS^{medium})

e baixa expressão (ICOS^{low}). Curiosamente, os níveis de ICOS foram correlacionados com o padrão de citocinas produzidos. Células ICOS^{low} foram associadas com a produção de IL-3, IL-6 e IFN- γ , células ICOS^{medium}, a grande maioria das células T ICOS⁺ *in vivo*, foram associadas com a produção de citocinas Th2, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 enquanto que células ICOS^{high} foram associadas com a produção de IL-10. Interessantemente, esta observação está de acordo com outros dois estudos que demonstraram que a presença de ICOS é fundamental para que células Tregs produzam IL-10 (AKBARI et al., 2002).

Diferentemente de CD28, ICOS não possui o motivo de ligação para a proteína Grb2 em sua cauda citoplasmática, que é crítica para a produção de IL-2 (OKAMOTO et al., 2003). Apesar disso, alguns estudos reportaram diminuição na proliferação de células T deficientes de ICOS, embora esta redução não tenha sido tão pronunciada comparada a de células T deficientes em CD28 (NURIEVA et al., 2003). Células T murinas proliferaram quando estimuladas por sinais via TCR e ICOS, mas apenas quando IL-2 foi fornecido (VAN BERKEL et al., 2005). Diferentemente das células murinas, células T periféricas humanas foram ativadas *in vitro* sem a necessidade de adição de IL-2, e o bloqueio de ICOS resultou em redução na proliferação de células T (RILEY et al., 2001).

O sinal coestimulatório fornecido pela ligação de ICOS também atua na resposta imune humoral. Vários estudos demonstraram o importante papel desta via coestimulatória na diferenciação de células B, troca de isotipo de imunoglobulina, formação de centros germinativos e desenvolvimento de células B de memória (revisto em SIMPSON et al., 2010). Camundongos ICOS^{-/-} formam centros germinativos menores quando comparados a camundongos selvagens, acompanhado de redução nos níveis séricos de IgG1 e IgG2a (MAK et al., 2003).

O papel de ICOS em humanos foi melhor evidenciado quando pesquisadores descobriram quatro pacientes com deleção homozigota do gene *ICOS*. Embora as células T destes pacientes tenham apresentado resposta linfoproliferativa normal, redução do número de células B de memória e plasmócitos em órgãos linfóides periféricos, bem como diminuição dos níveis

séricos de imunoglobulinas foram observados (SALZER et al., 2004; SALZER e GRIMBACHER, 2006).

1.17 Região cromossômica 2q33: Polimorfismos e estrutura dos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*

CD28 e *CTLA4* são genes vizinhos, localizados na região cromossômica 2q33, que foram identificados no final da década de 1980 (ARUFFO e SEED, 1987; DARIAVACH et al., 1988). Uma década depois, um terceiro gene, *ICOS*, foi identificado muito próximo a *CD28* e *CTLA4* (HUTLOFF et al., 1999). Entretanto, apenas em 2003 a região de 300 kb que abriga estes genes foi inteiramente sequenciada e a distância exata entre estes três genes foi confirmada (UEDA et al., 2003).

O comprimento e a composição dos exons de *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* são bem conservados. *CD28* e *CTLA4* possuem 4 exons: o exon 1 codifica o peptídeo sinal, o exon 2 codifica o domínio extracelular, o exon 3 codifica a região transmembrânica e o exon 4 codifica o domínio citoplasmático (LEE et al., 1990). *ICOS* contém 5 exons, sendo os 4 primeiros semelhantes aos dos genes *CD28* e *CTLA4*, enquanto que o quinto exon é curto e codifica o domínio citoplasmático juntamente com o exon 4 (Figura 9) (LING et al., 2001).



Figura 9 – Estrutura dos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* presentes na região cromossômica 2q33. Os blocos pretos indicam as regiões codificantes e os blocos brancos indicam as regiões não codificantes dos exons. Os introns são indicados pelas linhas horizontais entre os exons.

Fonte: adaptado de Haimila e colaboradores (2004).

Diversos polimorfismos nos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* já foram identificados. Na região codificadora do gene *CD28*, três SNPs são não sinônimos: *CD28c. 73G>A* (Gly25Arg) (rs3181099) no exon 1; *CD28c. 224G>A* (Ser75Asn) (rs35290181) no exon 2 e *CD28c. 272G>A* (Gly91Asp) (rs75899942) que também está no exon 2. Além disso, mais quatro SNPs sinônimos foram encontrados, todos no terceiro exon (KARABON e FRYDECKA, 2012). No íntron do gene, 11 SNPs foram identificados, mas o SNP *CD28 17T>C* (rs3116496) é o mais estudado no contexto de doenças autoimunes e neoplásicas. Este polimorfismo se encontra próximo a um sítio de recomposição (*splicing*) e pode influenciar a eficiência de recomposição do mRNA, afetando assim a expressão da proteína (AHMED et al., 2001). Além disso, este SNP já foi associado a alguns tipos de câncer (SUWALSKA et al. 2008; CHEN et al. 2011), artrite reumatoide (LEDEZMA-LOZANO et al. 2011) e diabetes tipo I (IHARA et al., 2001).

Polimorfismos situados na região promotora do gene também podem regular a expressão do gene. O efeito funcional do SNP *CD28 -372G>A* (rs35593994) ainda precisa ser elucidado, mas uma busca por sítios de ligação para fatores de transcrição sugere que o alelo *A* difere do alelo *G* ao criar um sítio de ligação (CCAAT) para uma proteína acentuadora (TEUSCH et al., 2004). Entretanto, apesar do possível efeito funcional na expressão do gene, este polimorfismo tem sido raramente investigado, com exceção de um estudo realizado por Teusch e colaboradores (2004), que não encontrou associação deste SNP com esclerose múltipla na população australiana e outro estudo conduzido por Dalla-Costa e colaboradores (2010) na população brasileira, que não encontrou associação com pênfigo foliáceo.

O primeiro relato de associação entre polimorfismos no gene *CTLA4* com doenças autoimunes veio de um estudo em uma população caucasiana portando a doença de Graves, utilizando marcadores microsatélites (YANAGAWA et al., 1995). Vinte e um alelos (repetições AT na região 3' UTR do exon 4) foram identificados, com tamanhos variando de 88 a 134 pb, sendo que o alelo de 106 pb foi mais frequente na amostra de doentes quando comparado com indivíduos

controle, produzindo um *odds ratio* (OR) de 2,82 (YANAGAWA et al., 1995). No entanto, estes marcadores microssatélites não parecem ser importantes em termos de expressão gênica ou na função da proteína, e possivelmente a associação encontrada seja decorrente de desequilíbrio de ligação entre este microssatélite com alguma variante causal da doença (GOUGH et al., 2005).

Posteriormente, um novo estudo encontrou associação entre um SNP no exon 1 (rs231775) tanto com diabetes tipo 1 como com doença de Graves (NISTICO et al., 1996). Este polimorfismo, uma transição $G>A$ na posição +49 do exon 1, leva a uma troca do aminoácido Ala por Thr na posição 17 do peptídeo sinal e foi encontrado em forte desequilíbrio de ligação com o microssatélite anteriormente citado. Mäurer e colaboradores (2002) avaliaram a alteração funcional envolvendo o SNP *CTLA4* +49 $G>A$ com a ativação de células T, e notaram que indivíduos com o genótipo *AA* apresentaram diminuição da ativação e proliferação de células T. Este maior efeito inibitório pode estar relacionado ao fato da proteína codificada pelo alelo *A* possuir maior afinidade por CD80 quando comparada com a proteína codificada pelo alelo *G* (SUN et al., 2008). Além disso, também foi demonstrado que o alelo *G* provoca alteração do tráfego intracelular de CTLA-4 devido a alterações no processo de glicosilação da proteína, reduzindo sua expressão na superfície celular (ANJOS et al., 2002).

Estudos subsequentes encontraram associação deste SNP com diversas doenças autoimunes, tais como doença de Addison (DONNER et al., 1997; KEMP et al., 1998), hipotireoidismo autoimune (NITHIYANANTHAN et al., 2002), doença celíaca (DJILALI-SAIAH et al., 1998), esclerose biliar primária (AGARWAL et al., 2000), lúpus eritematoso sistêmico (CHANG et al., 2012; HUGHES et al., 2012), esclerose múltipla progressiva primária (MAURER et al., 2002), artrite reumatoide (VAIDYA et al., 2002; LI et al., 2012), diabetes tipo I (BENMANSOUR et al., 2010), pênfigo foliáceo (DALLA-COSTA et al., 2010) e esclerose sistêmica (SONG e LEE, 2013).

Outro SNP (rs5742909) foi identificado na posição -318 na região promotora do gene *CTLA4*, uma troca de citocina por timina. Este polimorfismo também tem efeito funcional já descrito, sendo o alelo *T* associado com maior

atividade promotora, provavelmente devido a criação de um sítio de ligação de um fator de transcrição, LEF-1 (fator estimulador linfoide-1) (CHISTIAKOV et al., 2006, de ALMEIDA e PETZL-ERLER, 2013). Este alelo também foi associado com aumento de mRNA e expressão de CTLA-4 (LIGERS et al, 2001; ANJOS et al, 2002). Assim como o SNP *CTLA4 +49G>A*, este polimorfismo foi amplamente investigado em diversas doenças, e associação foi encontrada com brucelose (ESKANDARI-NASAB et al., 2013), câncer cervical (XIONG et al., 2013), hepatite C (KHORSHIED et al., 2013) e doença de Graves (PARK et al., 2000).

No gene *ICOS*, dois microssatélites no quarto íntron e 31 SNPs já foram identificados (KARABON e FRYDECKA, 2012). Nenhum destes SNPs altera a sequência de aminoácidos da proteína, mas alterações funcionais já foram demonstradas para alguns. O SNP *ICOS 1624C>T* (rs10932037) influenciou os níveis de mRNA de ICOS (KAARTINEN et al, 2007). Os autores deste trabalho demonstraram que células T CD4+ de homocigotos *CC* para este SNP possuíam maior quantidade de mRNA de ICOS 1 e 3 horas após a ativação comparadas com as células T CD4+ de indivíduos heterocigotos e homocigotos para o alelo *T*. Três SNPs, *ICOS 1624C>T*, *ICOS 1564C>T* (rs4404254) e *ICOS 2373G>C* (rs10183087), localizados na região 3' não traduzida também influenciam os níveis de mRNA do gene (CASTELLI et al., 2007). Além disso, três principais haplótipos, que foram associados com alterações na secreção de IL-10, também foram identificados neste estudo (CASTELLI et al., 2007). Em recente estudo do tipo caso-controle, Pendeloski e colaboradores (2011) relataram associação entre o SNP *ICOS 1564C>T* em mulheres com pré-eclâmpsia. Haimila e colaboradores (2009) verificaram que o genótipo *TT* para este mesmo SNP em indivíduos que receberam transplante renal está relacionado a menores níveis de ICOS e atraso na função do enxerto.

1.18 Polimorfismos e estrutura do gene *CD86*

O gene *CD86* está localizado no cromossomo 3q21 e contém 8 exons, possuindo mais de 22 Kb. Os exons 1 e 2 sofrem um processo de recomposição alternativa e não são traduzidos, o exon 3 codifica o peptídeo sinal, os exons 4 e 5 codificam o domínio extracelular, o exon 6 codifica a região transmembrânica e parte do domínio intracelular, juntamente com os exons 7 e 8 (Figura 10) (JELLIS et al., 1995).

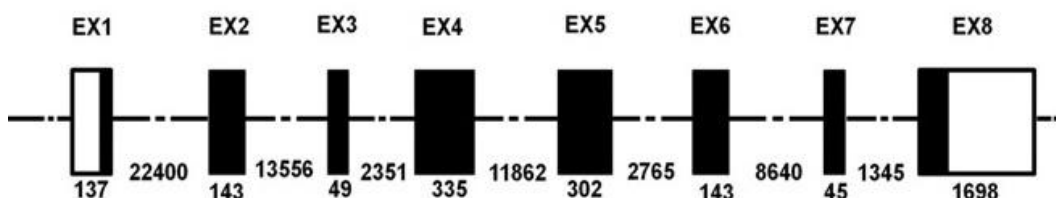


Figura 10 – Estrutura do gene *CD86*. Os blocos pretos indicam as regiões codificantes e os blocos brancos indicam as regiões não codificantes dos exons. Os íntrons são indicados pelas linhas horizontais entre os exons.

Fonte: adaptado de Dalla Costa e colaboradores (2010).

Dois SNPs não sinônimos foram identificados no gene, *CD86 +1057G>A* (rs1129055), localizado no exon 8, que leva a substituição do aminoácido alanina por treonina na posição 304 da proteína, e outro SNP, localizado no exon 5, que leva a troca da isoleucina por valina na posição 179 da proteína, e foi associado com aumento na produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 (CORYDON et al., 2007).

O SNP *CD86 +1057G>A* introduz um sítio potencial de fosforilação na região citoplasmática da molécula (DELNESTE et al., 2000). Este SNP está presente em alta frequência em populações caucasoides e asiáticas, e é quase ausente em populações ameríndias (BELTRAME et al., 2012). No entanto, até o momento, o único estudo que avaliou o possível efeito funcional deste SNP não encontrou qualquer alteração na expressão do mRNA ou da molécula CD86 (de

ALMEIDA e PETZL-ERLER, 2013). Este polimorfismo continua sendo extensivamente avaliado em estudos de associação com doenças autoimunes e neoplásicas e diferentes resultados foram encontrados. Estudos do tipo caso-controle evidenciaram associação entre este polimorfismo com pênfigo foliáceo (DALLA-COSTA et al., 2010), câncer no pâncreas (XIANG et al., 2012), sarcoma de Ewing (WANG et al., 2012), osteossarcoma (WANG et al., 2011), câncer colorretal (PAN et al., 2010), mas não com artrite reumatoide (MATSUSHITA et al., 2000; LIU et al., 2013), esclerose sistêmica (TEUTSCH et al., 2004), lúpus eritematoso sistêmico (MATSUSHITA et al., 2000) e diabetes tipo I (TURPEINEN et al., 2002).

1.19 Polimorfismos e estrutura dos genes *CD40* e *CD40L*

O gene *CD40* se localiza em 20q12-13.2 e possui 9 exons com tamanho variando de 29 a 412 pb. O exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região intracelular é codificada pelos exons 2 a 6, o exon 7 codifica a região transmembrânica enquanto que o domínio extracelular é codificado pelos exons 8 e 9 (Figura 11). O gene codifica um mRNA de 1,5 kb e a fase de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) de sua sequência contem 831 pb (VAN KOOTEN e BANCHEREAU, 2000).

Mais de 300 SNPs já foram identificados no gene, mas poucos foram avaliados em relação a possíveis implicações funcionais e associação com doenças. Sem dúvida, o SNP mais amplamente estudado se encontra na região 5' não traduzida, localizado na posição -1 do códon de iniciação. Este SNP, *CD40 - IC>T* (rs1883832), afeta a sequência de Kozak, uma curta sequência que cerca o códon de iniciação, que é fundamental para o processo de tradução proteica (TOMER et al., 2002). Por interferir com a capacidade do ribossomo em iniciar o processo de tradução, sabe-se que o alelo *T* é responsável pela redução de 15-30% na expressão de *CD40* (JACOBSON et al., 2005).



Figura 11 – Estrutura do gene *CD40*. Os blocos pretos indicam as regiões codificantes e os blocos brancos indicam as regiões não codificantes dos exons. Os íntrons são indicados pelas linhas horizontais entre os exons.

Fonte: adaptado de van Kooten e Banchereau (2000).

Em recente meta-análise, Li e colaboradores. (2012) confirmaram a associação do genótipo *TT* com resistência a doença de Graves, anteriormente observada em diferentes grupos étnicos, incluindo europeus (TOMER et al., 2002), coreanos (KIM et al., 2003) e japoneses (BAN et al., 2006). O alelo *T* também tem sido associado com proteção a artrite reumatoide (GARCÍA-BERMÚDEZ et al., 2012). No entanto, é importante notar que este alelo protetor pode estar associado a susceptibilidade a outras doenças autoimunes. Korobko e colaboradores (2013) verificaram que o alelo *T* está correlacionado com a progressão da esclerose múltipla. Além disso, a frequência deste alelo foi maior em pacientes com esclerose múltipla e doença de Crohn, sugerindo que mecanismos moleculares distintos estão envolvidos na etiologia destas doenças (BLANCO-KELLY et al., 2010).

O gene *CD40L* se localiza no cromossomo X, na posição Xq26.3. Este gene possui 5 exons e 4 íntrons, com um total de aproximadamente 12 kb (Figura 12). A maior parte da proteína, representada pela região extracelular, é codificada pelos exons 2 a 5, enquanto que o exon 1 codifica os domínios intracelulares e transmembrana (VILLA et al., 1994).

Sabet e colaboradores (2002) sequenciaram a região promotora, bem como o exon 1 e parte do íntron 1 do gene, e encontraram apenas dois SNPs, *CD40L -726T>C* (rs3092945), localizado na região promotora, e *CD40L +220C>T*, uma troca sinônima no exon 1. Neste mesmo trabalho, os autores investigaram a associação destes dois SNPs com formas graves de malária por *P. falciparum*, e constataram que o alelo *CD40L -726C* foi associado com proteção à malária cerebral e anemia severa em homens hemizigotos. Estudos subsequentes

avaliaram se esta associação, observada inicialmente no Gâmbia, era reprodutível em outras populações africanas. Em Mali, não foi observada associação entre este SNP na incidência de malária grave (TOURE et al., 2012). Na Tanzânia, mulheres com o genótipo *CC*, diagnosticadas com malária grave, tiveram cinco vezes mais chance de apresentarem síndrome da angústia respiratória aguda quando comparadas com aquelas com os genótipos *TC* ou *TT* (MANJURANO et al., 2012). Outro estudo, mais recente, originado de um consórcio envolvendo diferentes instituições, avaliou se este SNP estava associado a episódios de convulsões em crianças infectadas com *P. falciparum*, em quatro países africanos: Gana, Quênia, Tanzânia e Malawi (KARIUKI et al., 2013). Em Malawi, mulheres heterozigotas apresentaram oito vezes mais chances de terem episódios de convulsões enquanto que no Quênia, mulheres com o genótipo *CC* foram associadas com menos episódios de convulsões.

Apenas dois estudos avaliaram este SNP fora do continente africano. Malheiros e Petzl-Erler (2009) encontraram uma frequência muito menor do alelo *C* em pacientes com pênfigo foliáceo, quando comparados com indivíduos controle na população da região sul do Brasil, gerando um *odds ratio* de 0,27. Este efeito protetor foi semelhante tanto em homozigotos como em heterozigotos, sugerindo um efeito dominante do alelo *C*. Já em outro estudo realizado na região Amazônica brasileira, Capobianco e colaboradores (2013) não encontraram associação deste SNP com malária vivax em indivíduos infectados no Estado do Amapá.

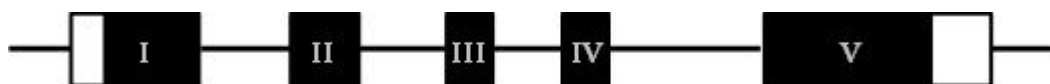


Figura 12 – Estrutura do gene *CD40L*. Os blocos pretos indicam as regiões codificantes e os blocos brancos indicam as regiões não codificantes dos exons. Os íntrons são indicados pelas linhas horizontais entre os exons.

Fonte: adaptado de van Kooten e Banchereau (2000).

1.20 Polimorfismos e estrutura do gene *BLYS*

O gene *BLYS* está localizado em 13q33.3 e contém 6 exons e 5 íntrons, correspondendo a 39 kb. O principal transcrito do gene possui 1204 pb com uma ORF de 858 pb (Figura 13) (LAHIRI et al., 2012). A região promotora, de 1020 pb pode ser ativada por muitos fatores de transcrição (FU et al., 2006). Poucos autores investigaram se o aumento da expressão da proteína poderia ser determinado geneticamente. Uma triagem nas regiões codificadora, 5' e 3' não codificadas e promotora do gene possibilitou a identificação de 4 SNPs na região promotora (-1283G>A, -871G>T, -514T>C e -353G>C), um SNP no íntron 1 (IVSI-45 C>G) e um SNP não sinônimo no exon 1 (Ala105Thr) (KAWASAKI et al., 2002). Neste mesmo estudo não foi encontrada associação entre nenhum destes SNPs com lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide, mas houve uma tendência de aumento na proporção do genótipo -871 *TT* em pacientes com lúpus. Além disso, os níveis de mRNA do gene foram significativamente maiores nos monócitos dos indivíduos com o alelo *T*.

Provavelmente, em vista destes resultados, o SNP *BLYS* -871C>T (rs9514828) vem sendo mais investigado. A posição -871 corresponde a um sítio de ligação para o fator de transcrição MZF1, e é possível assim que este SNP possa influenciar os níveis de mRNA de *BLYS*. A expressão da proteína foi comparada em diferentes células de indivíduos saudáveis, possuindo diferentes genótipos para este SNP, e foi observado que células T CD8+, monócitos e células NK de indivíduos com o genótipo *CC* expressavam mais *BLYS* (de ALMEIDA e PETZL-ERLER, 2013). Além disso, este SNP foi também associado a lúpus eritematoso sistêmico (ZAYED et al., 2013), síndrome de Sjögren (NEZOS et al., 2013), infertilidade idiopática (CHRISTOFOLINI et al., 2011) e púrpura trombocitopênica idiopática (EMMERICH et al., 2007).

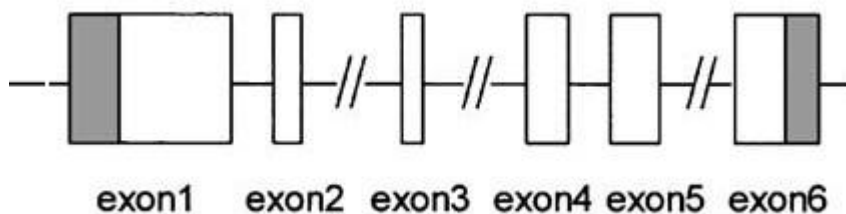


Figura 13 – Estrutura do gene *BLYS*. Os blocos brancos indicam as regiões codificantes e os blocos cinzas indicam as regiões não codificantes dos exons. Os introns são indicados pelas linhas horizontais entre os exons.

Fonte: adaptado de Kawasaki e colaboradores (2002).

1.21 Estudos de Associação e Ancestralidade

Os estudos de associação são amplamente utilizados para identificar a base genética de características quantitativas, como por exemplo, a susceptibilidade a doenças complexas ou ainda fenótipos de uma determinada doença. Existem diferentes métodos usados para a detecção de genes que contribuem para um determinado traço, mas sem dúvida o tipo de estudo mais empregado são aqueles que examinam diferenças na frequência de polimorfismos entre os indivíduos que apresentam determinado fenótipo (caso) com indivíduos que não o apresentam (controle).

Apesar da maioria da variação genética não apresentar qualquer função biológica conhecida, alguns polimorfismos podem afetar o fenótipo de um indivíduo. Ainda, tais polimorfismos não funcionais podem ser úteis marcadores em estudos genéticos ao estarem localizados próximos e não segregarem de maneira independente do verdadeiro alelo causal do fenótipo (FOULKES, 2009).

Dentre os diferentes marcadores genéticos (variação no número de cópias [CNV], inserção-deleção [INDEL], microssatélites), os mais empregados em estudos de associação são do tipo SNP, que consiste na alteração de um único nucleotídeo por outro. Apesar de poderem ser bi, tri ou tetra-aliélicos, existem geralmente na forma bialélica. Os SNPs representam a fonte mais abundante de variabilidade do genoma humano, e atualmente já foram descritos mais de onze

milhões espalhados em regiões codificantes, podendo assim alterar a função da proteína, em regiões promotoras, podendo afetar a expressão do gene, ou ainda em regiões não codificantes (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

Entretanto, em estudos de associação do tipo caso-controle, existe o risco de se encontrar associações espúrias, termo utilizado para descrever associação estatística entre um marcador e um fenótipo sem que tal marcador esteja realmente associado ao fenótipo. Geralmente associações espúrias são decorrentes da estratificação populacional, que ocorre em grupos que possuem frequências alélicas diferentes entre e dentro dos subgrupos ou em populações miscigenadas com diferentes frações de ancestralidade (FOULKES, 2009). Dessa forma, nos estudos de associação deve-se considerar a análise de ancestralidade para eliminar a possibilidade de a associação ser consequência do *background* genético da população estudada. Com este intuito, marcadores genéticos que capturem diferenças nas frequências alélicas entre populações continentais que possam atribuir a ancestralidade de um indivíduo, ou ainda estimar proporções de populações parentais em populações miscigenadas, estão sendo cada vez mais utilizados e são designados de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs, do inglês *ancestry informative markers*).

Esta observação é de grande relevância quando se pretende realizar estudos em populações miscigenadas como a brasileira. Geralmente, indicadores de aparência física, especialmente a cor da pele, são utilizados para determinar a ancestralidade. Entretanto, como consequência da intensa miscigenação da população brasileira, resultado de cinco séculos de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos e ameríndios, estes indicadores são pobres descritores da ancestralidade genômica (PARRA et al. 2003; PENA et al. 2011; CARDENA et al. 2013). Dessa forma, faz-se necessário a utilização de AIMs ao se realizar estudos de associação na população brasileira.

1.22 Hipótese

Polimorfismos em genes coestimulatórios do sistema imune humano podem influenciar os níveis e prevalência de anticorpos contra proteínas de estágio sanguíneo do *P. vivax*.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta de anticorpos IgG contra antígenos de estágio sanguíneo do *P. vivax* e avaliar a influência de polimorfismos em genes coestimulatórios na resposta imune humoral do hospedeiro.

2.2 Objetivos específicos

1. Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de variantes nos genes *CD28*, *CTLA4*, *ICOS*, *CD40*, *CD40L*, *CD86* e *BLYS* em amostras de pacientes infectados por *P. vivax*;
2. Analisar a distribuição dos polimorfismos de nos genes coestimulatórios na população brasileira em relação à ancestralidade genética, por meio de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs);
3. Avaliar a relação entre os polimorfismos nos genes coestimulatórios com a parasitemia;
4. Avaliar a prevalência e níveis de IgG total em pacientes infectados com *P. vivax* contra os seguintes antígenos de superfície do *P. vivax*: MSP-1₁₉, DBP e AMA-1;
5. Avaliar a prevalência de anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG contra uma proteína N-terminal da MSP-1 do *P. vivax* (ICB2-5);
6. Descrever o perfil imunoepidemiológico da aquisição de anticorpos IgG de acordo com a idade, tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária e tempo decorrido desde o último episódio de malária

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no município de Goianésia do Pará, (03°50'33" S; 49°05'49" W), que está localizado na mesorregião do sudeste paraense, limitando com os municípios de Breu Branco, Novo Repartimento, Dom Eliseu, Ipixuna do Pará, Jacundá e Rondon do Pará, distante da capital Belém em aproximadamente 300 Km, cujo principal acesso é pela rodovia estadual PA-150. O município de Goianésia do Pará tem uma extensão territorial de 7.021 Km², com população estimada em 2011 de 28.583 habitantes (IBGE, 2012). O clima é tropical semiúmido, com temperatura média anual de 26,3°C e precipitação média anual em torno de 2.000 mm³.

Nos anos de 2011 e 2012, o número de casos de malária foi de 2.856 e 1.136, respectivamente, sendo a maioria ocasionada pelo *P. vivax* (79,0%). Em 2011, ocorreram mais de cem casos de malária em todos os meses ao longo do ano, e os maiores números foram registrados nos meses de janeiro e agosto (355 e 339, respectivamente). Em 2012 os casos de malária ocorreram de maneira constante ao longo do ano, com exceção do primeiro trimestre, onde foram registrados 261, 207 e 137 casos nos meses de janeiro, fevereiro e março, respectivamente (Figura 14) (BRASIL, 2013). O vetor de malária predominante no município é o *Anopheles darlingi* Root, 1926 e o índice de picada por homem por hora foi de 0,33 e 0,34 em 2011 e 2012, respectivamente (PRIMO et al., dados não publicados).

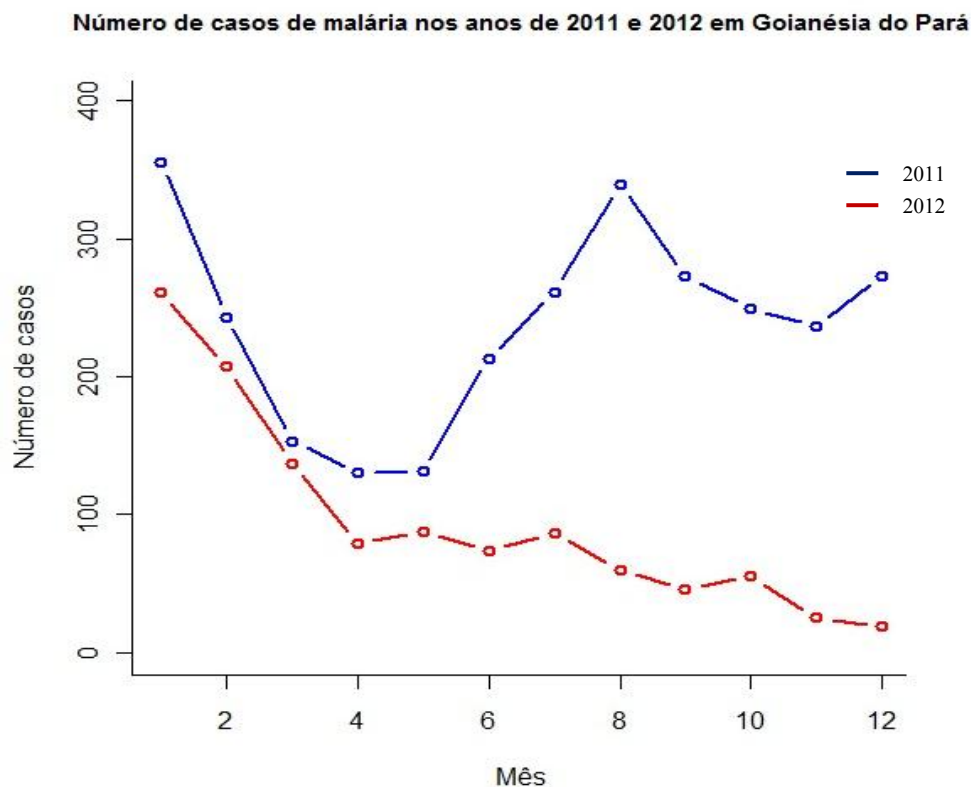


Figura 14 – Número de casos mês a mês registrados no município de Goianésia do Pará nos anos de 2011 e 2012.

3.2 Amostras

Foram coletadas 223 amostras de indivíduos maiores de 10 anos, sendo 153 do sexo masculino (68,6%) e 70 do sexo feminino (31,4%). Os indivíduos foram entrevistados, registrando-se dados sobre idade, tempo de residência na área endêmica e aquisição prévia de malária (quantidade e tempo decorrido desde a última infecção).

As amostras foram coletadas no principal posto de diagnóstico de malária do município após a confirmação de infecção por *P. vivax*, diagnosticada pela gota espessa, antes dos pacientes iniciarem o tratamento. O sangue foi colhido por venopunção periférica, com agulha e seringa descartáveis ou por aspiração a vácuo em tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, CA, EUA). Coletou-se

aproximadamente 10 mL de sangue, sendo o material dividido em tubos com e sem anticoagulante EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*). O sangue foi centrifugado para a obtenção do plasma e soro, que foram estocados em tubos *Eppendorf* e mantidos congelados a -20°C .

Com o objetivo de se avaliar as frequências genóticas e alélicas dos SNPs estudados, bem como a influência da ancestralidade na distribuição destes, além das amostras coletadas dos indivíduos infectados com *P. vivax*, foram coletadas 50 amostras de sangue de indivíduos saudáveis residentes no município de Goianésia do Pará.

Todos os participantes ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (n° 4599/2011) (Anexo I).

3.3 Diagnóstico e determinação da parasitemia por microscopia

O diagnóstico de malária bem como a parasitemia foram realizados pelo método da gota espessa coradas com a técnica de Walker, conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005). Pelo menos 100 campos microscópicos foram examinados antes de se definir o resultado de cada lâmina. Para determinação da parasitemia assumiu-se que 100 campos equivalem a $0,2\text{ mm}^3$ de sangue. Assim, a quantidade de parasitos por mm^3 se deu multiplicando por 5 o número de parasitos encontrados nos 100 campos.

3.4 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit Easy-DNA (Invitrogen, CA, EUA) com pequenas modificações das especificações do fabricante. Em 280 μL de sangue, foram adicionados 450 μL de solução de lise

(Solução A), e a mistura foi homogeneizada em vórtex. Após incubação a 65°C por 6 minutos no bloco térmico, foram adicionados 650 µL de clorofórmio. Realizou-se nova homogeneização em vórtex até a mistura apresentar uma coloração achocolatada. Em seguida adicionaram-se 150 µL de solução de precipitação (Solução B) e homogeneizou-se no vórtex até a mistura ficar homogênea. Realizou-se a centrifugação da amostra a 20.000 g por 10 minutos e transferência do sobrenadante para tubo *Eppendorf* de 1,5 µL. Foi então adicionado 1 mL de etanol 100% gelado e a mistura foi homogeneizada por inversões suaves e deixada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 20.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação a 20.000 g por 2 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 *nuclease free* (Invitrogen, CA, EUA). A quantidade e pureza do DNA foram verificadas após eletroforese em gel de Agarose 1,5% ou por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

3.5 Diagnóstico molecular das espécies de *Plasmodium*

Para a confirmação da espécie de *Plasmodium* foram realizadas reações de nested-PCR de acordo com a técnica desenvolvida por Snounou e colaboradores (1993), com modificações. Este protocolo utiliza iniciadores específicos da região da subunidade menor do RNA ribossomal, cuja primeira reação é utilizada para a identificação do gênero *Plasmodium*, enquanto a segunda reação de PCR é realizada para a identificação das espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale* (neste estudo não foi utilizado iniciadores para a identificação do *P. ovale*, uma vez que esta espécie não é transmitida no Brasil). Os iniciadores utilizados, bem como o tamanho dos fragmentos formados estão descritos na Tabela 1.

Na primeira reação de PCR foi utilizado 1 µL do DNA extraído em um volume final de 50 µL de solução com os seguintes reagentes: tampão 1X (Tris-HCl pH 8,8 100mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 0,125 mM de cada dNTP, 2,5 mM de cada iniciador PLU5 e PLU6, e 1 unidade (U) de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Vilnius, Lituânia). As amplificações foram realizadas no termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Germany) sob as seguintes condições: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 2 minutos a 72°C, encerrando com um ciclo de 55°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Na segunda reação, preparou-se um tubo para cada espécie de *Plasmodium*, cada um contendo 49 µL de solução com reagentes em concentrações idênticas as da primeira reação, excetuando a concentração dos iniciadores que, para o *P. vivax* e o *P. falciparum* foi de 1,75 mM enquanto que para o *P. malariae* foi de 2,25 mM. Em cada tubo, foi adicionado 1 µL do produto amplificado na primeira reação diluído em água estéril na proporção 1:50. As condições de ciclagem foram iguais as da primeira reação de PCR. Em cada reação foram incluídos controles positivos das três espécies avaliadas, e água estéril foi utilizada como controle negativo.

Tabela 1 – Sequência de iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados na nested-PCR

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Alvo	Tamanho do fragmento (pb)
PLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	<i>Plasmodium sp.</i>	1.200
PLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG		
VIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	<i>P. vivax</i>	120
VIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
FAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	<i>P. falciparum</i>	205
FAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC		
MAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	<i>P. malariae</i>	144
MAL2	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA		

Fonte: Snounou e colaboradores (1993).

Cinco microlitros de cada amostra foram aplicados juntamente com 1,5 µL de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol e 40% de sucrose em água destilada) em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM com pH 8,3). Em todas as eletroforeses realizadas, foram utilizados como marcadores de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

3.6 Genotipagem dos SNPs nos genes coestimulatórios

Todos os SNPs deste estudo foram genotipados pelo método de PCR-RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*). As reações de PCR foram realizadas no termociclador DNA MasterCycler, Eppendorf, e os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen. Para a visualização do produto de PCR para todos os SNPs, 5 µL de cada amostra foram aplicados juntamente com 1,5 µL de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol e 40% de sucrose em água destilada) em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Para a visualização dos fragmentos da RFLP, com exceção dos SNPs *CD40 -1C>T* (rs1883832) e *CTLA4 -318C>T* (rs5742909), 10 µL do produto de PCR após a digestão enzimática foram aplicados em gel de agarose 2,5% corados com GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por 80 minutos à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Em todas as eletroforeses realizadas, foram utilizados como marcadores de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

3.6.1 Genotipagem de *CD28* -372G>A (rs35593994)

A identificação dos alelos *G* e *A* do SNP rs35593994 foi realizada seguindo o protocolo descrito em Teutsch e colaboradores (2004), com modificações. A mistura de 25 μ L da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – TTC TCA TTC TGT TGC CCT GGC – 3' e 5' – CAC CAT CCC CTT AGG GCA CAT – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 546 pares de base (pb) foi submetido a digestão com a enzima de restrição *HinfI* seguindo as instruções do fabricante. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de tampão 1X, 1 μ L da enzima FastDigest *HinfI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 μ L do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Apenas o fragmento amplificado que contém o alelo *G* é clivado, resultando em fragmentos de 78 e 468 pb (Figura 15).

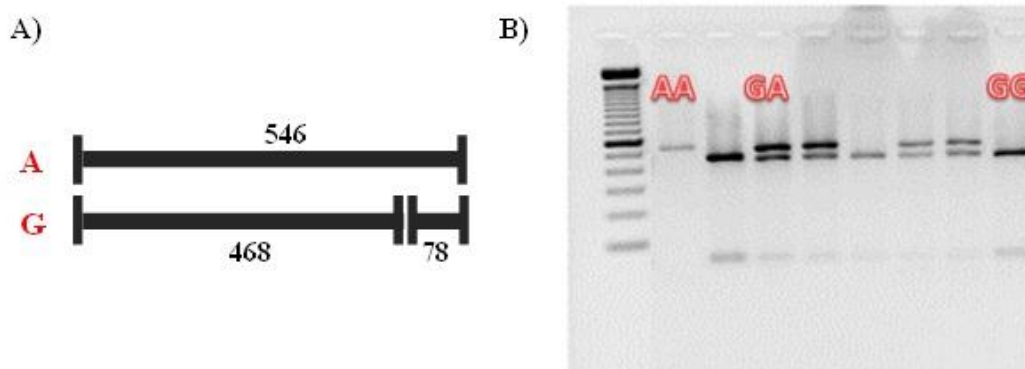


Figura 15 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CD28* -372G>A com a enzima *HinfI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *AA* (segundo poço), *GA* (quarto poço) e *GG* (nono poço). O Peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.6.2 Genotipagem de *CD28 +17T>C* (rs3116496)

A identificação dos alelos *T* e *C* do SNP rs35593994 foi realizada seguindo o protocolo descrito em Dalla-Costa e colaboradores (2010), com modificações. A mistura de 25 μ L da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – GAA ACA CCT TTG TCC AAG TC – 3' e 5' – CTC AAT GCC TTC TGG GAA ATC – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 333 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *AciI*. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de tampão 1X, 0,3 μ L da enzima *AciI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 μ L do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 16 horas. Apenas o fragmento amplificado que contém o alelo *C* é clivado, resultando em fragmentos de 193 e 140 pb (Figura 16).

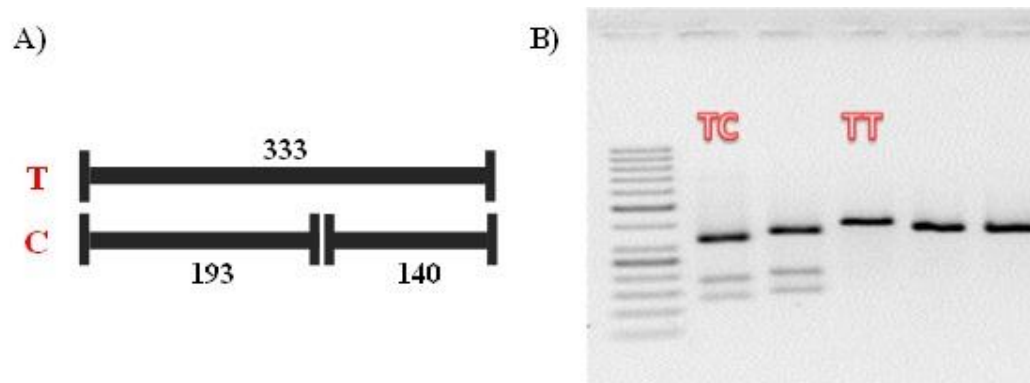


Figura 16 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CD28 -17T>C* com a enzima *AciI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *TC* (segundo poço) e *TT* (quarto poço). O peso molecular de 50 pb está representado no primeiro poço.

3.6.3 Genotipagem de *CTLA4* -318C>T (rs5742909)

Para a identificação dos alelos *C* e *T* do SNP rs5742909, os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A mistura de 25 µL da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 µL de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – GGG ATT TAG GAG GAC CCT TG – 3' e 5' – GTG CAC ACA CAG AAG GCA CT – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 244 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *MseI*. A mistura da reação de 30 µL foi composta de tampão 1X, 1 µL da enzima FastDigest *MseI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 µL do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Apenas o fragmento amplificado que contém o alelo *T* é clivado, resultando em fragmentos de 179 e 65 pb (Figura 17). Para a visualização da RFLP, 10 µL do produto da digestão foram aplicados em gel de poliacrilamida 12,5% corado com brometo de etídeo e submetidos à eletroforese vertical por 400 minutos à corrente elétrica de 100 V constantes, conduzida em tampão TEB 1X. Em todas as eletroforeses realizadas, foram utilizados como marcadores o DNA Peso molecular de 50 e 100 pb (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os géis de poliacrilamida foram visualizados sob luz UV e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

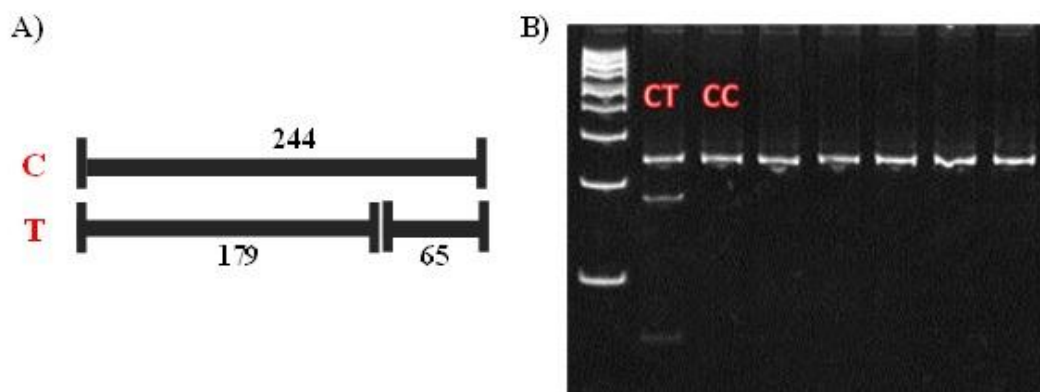


Figura 17 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CTLA4* -318C>T com a enzima *MseI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% para o genótipo *CT* (segundo poço) e o genótipo *CC* (demais poços). O Peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.6.4 Genotipagem de *CTLA4* +49A>G (rs231775)

Para a identificação dos alelos *A* e *G* do SNP rs231775, os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A mistura de 25 μ L da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 μ M de cada iniciador, 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – CTG AAC ACC GCT CCC ATA AA – 3' e 5' – CAC TGC CTT TGA CTG CTG AA – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 215 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *BbvI*. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de tampão 1X, 1 μ L da enzima FastDigest *BbvI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 μ L do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Apenas o fragmento amplificado que contém o alelo *G* é clivado, resultando em fragmentos de 159 e 56 pb (Figura 18).

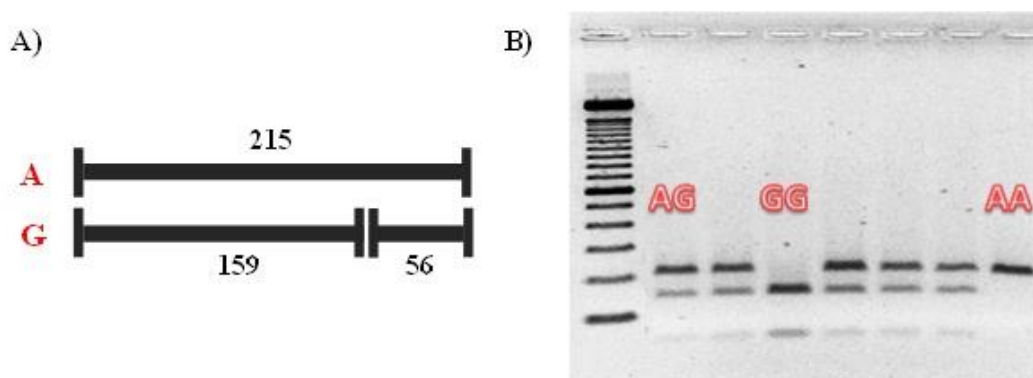


Figura 18 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CTLA4 +49A>G* com a enzima *BbvI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *AG* (segundo poço), *GG* (quarto poço) e *AA* (oitavo poço). O Peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.6.5 Genotipagem de *ICOS +1564T>C* (rs4404254)

A identificação dos alelos *T* e *C* do SNP rs4404254 foi realizada seguindo o protocolo descrito em Guzman e colaboradores (2005), com modificações. A mistura de 25 μ L da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 μ M de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – TTA CCA AGA CTT TAG ATG CTT TCT T – 3' e 5' – GAA TCT TTC TAG CCA AAT CAT ATT C – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 823 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *AluI*. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de tampão 1X, 1 μ L da enzima FastDigest *AluI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 μ L do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. O fragmento amplificado que contém o alelo *T* é clivado, resultando em

fragmentos de 385, 339 e 99 pb, enquanto que o fragmento que contém o alelo C é clivado em 339, 289, 99 e 96 pb (Figura 19)

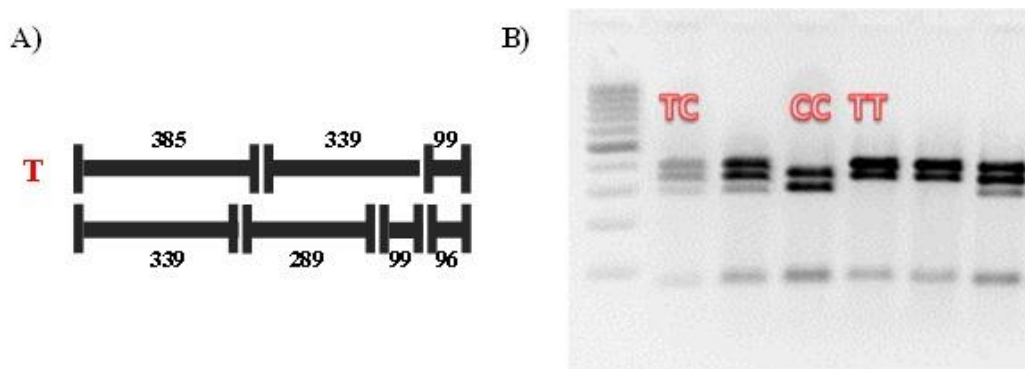


Figura 19 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *ICOS +1564T>C* com a enzima *AluI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *TC* (segundo poço), *CC* (quarto poço) e *TT* (quinto poço). O peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.6.6 Genotipagem de *CD86 +1057G>A* (rs1129055)

Para a identificação dos alelos *G* e *A* do SNP rs1129055, os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A mistura de 25 μ L da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), glicerol 10%, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – CTG TTC CAA TGG CAA CCT CT – 3' e 5' – GGT TGC CCA GGA ACT TAC AA – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 266 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *CviKI-1*. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de

tampão 1X, 0,5 µL da enzima *CviKI-I* (New England Biolabs, MA, EUA) e 10 µL do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 16 horas. O fragmento amplificado que contém o alelo *G* é clivado, resultando em fragmentos de 79, 75, 58 e 54 pb, enquanto que o fragmento que contém o alelo *A* é clivado em 154, 58 e 54 pb (Figura 20).

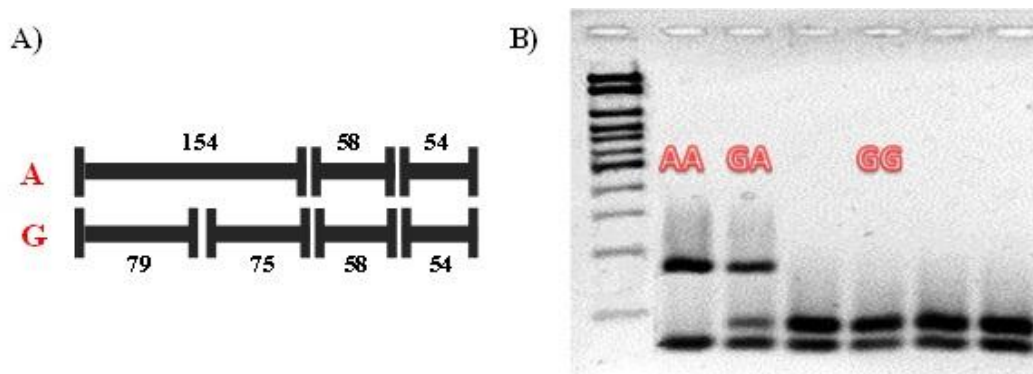


Figura 20 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CD86 +1057G>A* com a enzima *CviKI-I*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *AA* (segundo poço), *GA* (terceiro poço) e *GG* (quinto poço). O Peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.6.7 Genotipagem de *BLYS -871C>T* (rs9514828)

Para a identificação dos alelos *C* e *T* do SNP rs9514828, os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A mistura de 25 µL da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 2 µL de DNA. As seqüências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – TGG CTC TTG TGT GAT CAA GG – 3' e 5' – GCC TGG TCT CAG CTT TTC TG – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 210 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Mbi*I. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de tampão 1X, 0,8 μ L da enzima FastDigest *Mbi*I (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 μ L do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Apenas o fragmento amplificado que contém o alelo *C* é clivado, resultando em fragmentos de 162 e 48 pb (Figura 21).

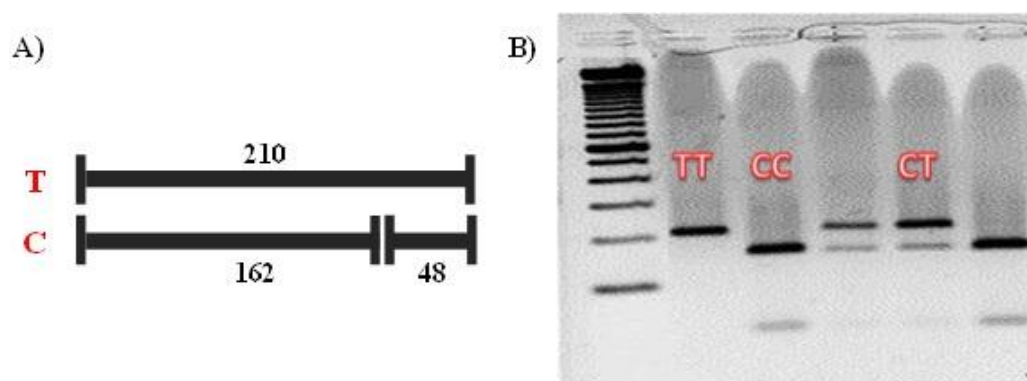


Figura 21 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *BLYS* -871C>T com a enzima *Mbi*I. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *TT* (segundo poço), *CC* (terceiro poço) e *CT* (quinto poço). O peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.6.8 Genotipagem de *CD40* -1C>T (rs1883832)

A identificação dos alelos *C* e *T* do SNP rs1883832 foi realizada seguindo o protocolo descrito em Malheiros e Petzl-Erler (2009), com modificações. A mistura de 25 μ L da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), glicerol 10%, MgCl₂ 2,0 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – GAA ACT CCT GCG CGG TGA AT – 3' e 5' – CCT CTT CCC CGA AGT CTT CC – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial

de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 303 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *StyI*. A mistura da reação de 30 µL foi composta de tampão 1X, 1 µL da enzima FastDigest *StyI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 µL do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. O fragmento amplificado que contém o alelo *C* é clivado, resultando em fragmentos de 133, 96 e 74 pb, enquanto que o fragmento que contém o alelo *T* é clivado em 207 e 96 pb (Figura 22). Para a visualização dos fragmentos, o produto da digestão foi aplicado e corado de maneira idêntica a descrita na seção 3.6.3.

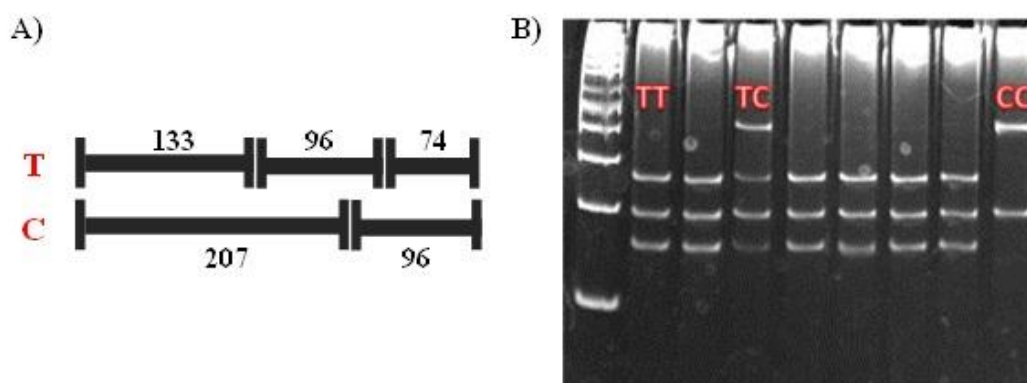


Figura 22 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CD40 -IT>C* com a enzima *StyI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% para o genótipo *TT* (segundo poço), o genótipo *TC* (quarto poço) e o genótipo *CC* (nono poço). O peso molecular de 50 pb está representado no primeiro poço.

3.6.9 Genotipagem de *CD40L -726T>C* (rs3092945)

A identificação dos alelos *T* e *C* do SNP rs3092945 foi realizada seguindo o protocolo descrito em Malheiros e Petzl-Erler (2009), com modificações. A mistura de 25 µL da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 2,0 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 µM de

cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA. As seqüências dos iniciadores *forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5' – ATC TTC ACA GCA ACC TAC – 3' e 5' – CAC TAA ACT CAA TGA AAG CC – 3'. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

Após a PCR, o produto amplificado de 446 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *LweI*. A mistura da reação de 30 μ L foi composta de tampão 1X, 0,3 μ L da enzima *LweI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 10 μ L do produto de PCR. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C por 16 horas. Apenas o fragmento amplificado que contem o alelo *T* é clivado, resultando em fragmentos de 251 e 195 pb (Figura 23).

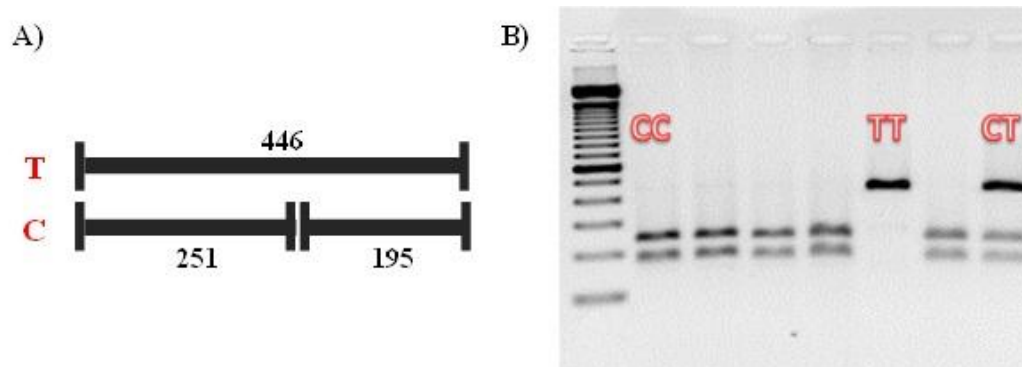


Figura 23 – A) Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado do SNP *CD40-ICT* com a enzima *LweI*. B) Padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2,5%, indicando para os genótipos *CC* (ou *C*, para homens) (segundo poço), *TT* (ou *T*, para homens) (sexto poço) e *CT* (oitavo poço). O Peso molecular de 100 pb está representado no primeiro poço.

3.7 Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs)

A determinação da ancestralidade (europeu, africana e ameríndia) dos indivíduos participantes do estudo foi realizada no Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, sob supervisão do Dr. Sidney

Emanuel Batista dos Santos, seguindo o protocolo descrito em Santos e colaboradores (2010).

3.7.1 INDEL

Foram genotipados 48 marcadores do tipo INDEL, que apresentam as seguintes características: 1) grande diferencial de frequências alélicas entre africanos, europeus e/ ou ameríndios ($\delta \geq 40\%$); 2) estarem presentes em diferentes cromossomos ou em regiões físicas distantes quando no mesmo cromossomo; 3) possuírem variação de tamanho entre 3 a 40 pb, possibilitando assim a genotipagem simultânea de vários marcadores.

As amplificações por PCR foram realizadas em três sistemas *multiplex*, cada um contendo iniciadores para a identificação de 16 INDELs. O protocolo de amplificação para os três sistemas foi o mesmo, realizada em reações de 12,5 μ L contendo: tampão 1X (Tris-HCl pH 8,3 100 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 3 mM, 125 mM de cada dNTP, concentração de iniciadores conforme descrito no artigo Santos e colaboradores (2010), 2 U de Ampli Taq Platinum Polimerase (Invitrogen, CA, EUA) e 10 ng de DNA. As condições para a PCR foram de um ciclo de 11 minutos a 95°C seguida de 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2 minutos a 70°C. Em seguida, mais 17 ciclos de 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 60°C e 2 minutos a 70°C, finalizando com um ciclo final de 60 minutos a 60°C.

Antes da eletroforese capilar, 1 μ L do produto de PCR foi misturado com 8,5 μ L de formamida deionizada Hi-Di™ e 0,5 μ L do marcador *GeneScan 500 Liz Size Standard* (Applied Biosystems, CA, EUA), e submetido a desnaturação por 3 minutos a 95°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a eletroforese no analisador automático de DNA ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, CA, EUA) e analisados com o programa GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems, CA, EUA) (Figura 24).

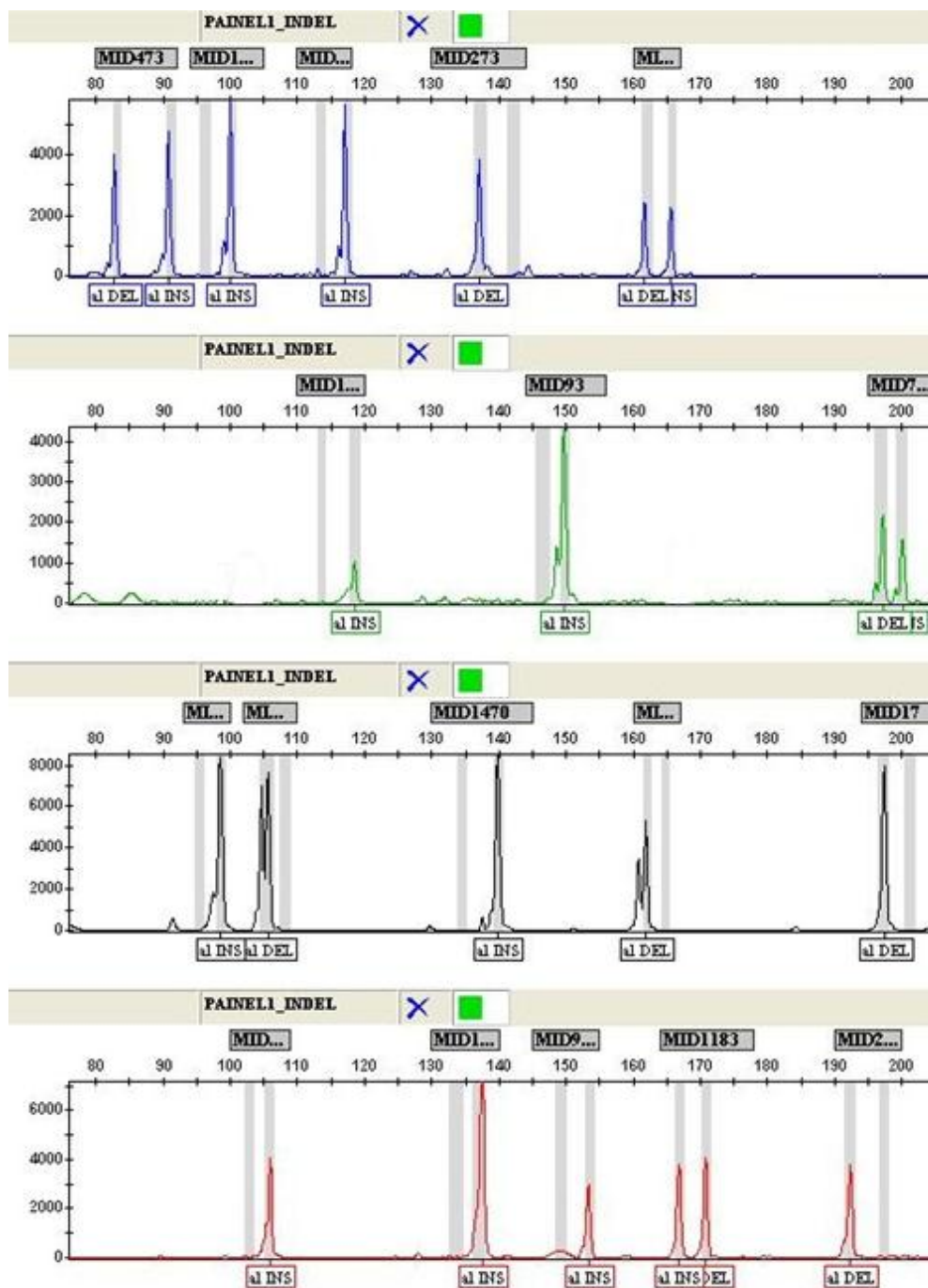


Figura 24 – Exemplo de resultado gerado da genotipagem dos AIMs, pelo programa GeneMapper ID v. 3.2. Cada cor representa um fluorocromo. Os picos representam os alelo (inserção e deleção).

3.7.2 Estimativa de miscigenação individual

Para a estimativa de miscigenação individual, foi utilizado o programa *Structure* v. 3.1 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>), especificando o número de populações parentais ($K = 3$), a partir das frequências genotípicas encontradas em Santos e colaboradores (2010) para africanos (189 indivíduos de Angola, Moçambique, Zaire, Camarões e Costa do Marfim), europeus (161 indivíduos, principalmente de Portugal) e ameríndios (243 indivíduos de diferentes tribos da Amazônia). Os genótipos das amostras de Goianésia do Pará e das populações parentais foram analisados em conjunto utilizando os seguintes parâmetros: 100.000 interações para o *burn-in period* e 100.000 repetições extras.

3.8 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.8.1 PvMSP-1₁₉

A avaliação de anticorpos IgG total contra a MSP-1₁₉ foi realizada na Universidade Federal do Pará, sob supervisão da Dra. Maristela Gomes da Cunha, seguindo o protocolo de Cunha e colaboradores (2001). A proteína recombinante (His6-MSP-1₁₉) representando os aminoácidos 1616-1704 (bloco 13, Figura 6b) da MSP-1 do *P. vivax* (cepa Belém) expressa em *Escherichia coli* foi gentilmente cedida pela Dra. Irene Soares.

Os 96 poços das placas de ELISA (Costar, Corning Inc., NY, EUA) foram sensibilizados com 50 µL da proteína His-MSP-1₁₉ (4 µg/mL) diluída em tampão carbonato 0,05 M pH 9,0 (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 34,9 mM), por 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) Tween 0,05% e bloqueadas com 200 µL de PBS leite 5% (Molico, Nestlé®). Após 2 horas a 37°C, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e 50 µL do plasma, diluído 1:100 em PBS leite 5%, foram adicionados em cada poço, em duplicata, e as placas foram incubadas por 16 horas

a temperatura ambiente. Após nova lavagem das placas com PBS Tween 0,05%, foram adicionados, em cada poço, 50 µL de conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (DAKO polyclonal rabbit, Glostrup, Dinamarca), diluído 1:10.000 em PBS leite 5%, e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, após nova lavagem com PBS Tween 0,05%, as placas foram reveladas com a adição de 100 µL de OPD (orto-fenilenodiamina) (1 mg/mL) diluído em tampão fosfato-citrato (NaH₂PO₄ 0,2 M, C₆H₈O₇ 0,2 M, pH 5,0) contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. Essa reação foi mantida no escuro e interrompida após 10 minutos pela adição de 25 uL de H₂SO₄ 4 N em cada poço. A densidade ótica (OD) foi quantificada em leitora de ELISA (EL800 Bio Tek, Winooski, EUA) em um comprimento de onda de 490 nm.

Para definição das amostras negativas ou positivas, foi calculado o índice de reatividade (IR), determinado pela divisão do valor da OD da amostra pelo ponto de corte. Amostras com $IR \geq 1$ foram consideradas positivas, enquanto que amostras com $IR < 1$ foram consideradas negativas. O ponto de corte foi estabelecido pela média das ODs de 40 amostras de plasma de indivíduos sem histórico de malária, residentes em São José do Rio Preto, interior do Estado de São Paulo (área não endêmica de malária) acrescida de três desvios padrões.

3.8.2 Região N-terminal da PvMSP-1 (ICB2-5)

A avaliação de anticorpos IgM, IgG total e subclasses contra a região N-terminal da PvMSP-1 foi realizada no Centro de Pesquisas Leonidas e Maria Deane, sob supervisão do Dr. Paulo Afonso Nogueira, seguindo o protocolo de Soares e colaboradores (1997). A proteína recombinante (ICB2-5) (Figura 6b) foi expressa em *E. coli* fusionada com glutathione S-transferase (GST). Tanto a proteína ICB2-5 como a GST foram gentilmente cedidas pelo Dr. Paulo Nogueira.

Os 96 poços das placas de ELISA (Costar, Corning Inc., NY, EUA) foram sensibilizados com 50 µL da proteína ICB2-5 (4 µg/mL) diluída em tampão carbonato 0,05 M pH 9,4, por 16 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e bloqueadas com 300 µL de PBS leite 5%

(Molico, Nestlé®). Após 2 horas a 37°C, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e 50 µL do plasma, diluído 1:100 em PBS leite 5%, foram adicionados em cada poço, em duplicata, e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem das placas com PBS Tween 0,05%, foram adicionados, em cada poço, 50 µL de conjugado anti-IgG, ou IgM humano ligado a peroxidase (KPL, MD, EUA), diluído 1:1.000 em PBS leite 5%, para a detecção de IgG total ou IgM, respectivamente, e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, após nova lavagem com PBS Tween 0,05%, as placas foram reveladas com a adição de 50 µL de TMB (tetrametilbenzidina) diluído 1:50 em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0 contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. Essa reação foi mantida no escuro e interrompida após 10 minutos pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 2 N em cada poço.

Para a determinação das subclasses de IgG, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado, com exceção de que nestes ensaios foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo direcionados a cada subclasse de IgG humana (Sigma, MO, EUA) diluído de acordo com a subclasse testada: 1:3.000 (IgG1); 1:2.500 (IgG2); 1:3.000 (IgG3) e 1:5.000 (IgG4). Todos os soros foram testados em diluições de 1:100, e a ligação do anticorpo monoclonal foi detectado com imunoglobulina anti-camundongo conjugada com peroxidase (Sigma, MO, EUA).

A densidade ótica (OD) foi quantificada em leitora de ELISA (Thermo Scientific, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm. Para cada amostra, a média da OD obtida contra a GST foi subtraída da OD média obtida contra a proteína ICB2-5. O IR foi obtido de acordo com o descrito na seção 3.8.1.

3.8.3 PvAMA-1

A avaliação de anticorpos IgG total contra a PvAMA-1 foi realizada na Universidade de São Paulo, sob supervisão da Dra. Irene Soares, seguindo o protocolo de Vicentin e colaboradores (2013). A proteína recombinante representando o ectodomínio da proteína (aminoácidos 43 a 487) AMA-1 do *P.*

vivax (cepa Belém) expressa em *Pichia pastoris* foi gentilmente cedida pela Dra. Irene Soares.

Os 96 poços das placas de ELISA (Costar, Corning Inc., NY, EUA) foram sensibilizados com 50 µL da proteína PvAMA-1 (2 µg/mL) diluída em tampão carbonato 0,05 M pH 9,0, por 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e bloqueadas com 200 µL de PBS leite 5%. Após 2 horas a 37°C, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e 50 µL do plasma, diluído 1:100 em PBS leite 5%, foram adicionados em cada poço, em duplicata, e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem das placas com PBS Tween 0,05%, foram adicionados, em cada poço, 50 µL de conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (Sigma 0170, MO, EUA), diluído 1:5.000 em PBS leite 5%, e as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, após nova lavagem com PBS Tween 0,05%, as placas foram reveladas com a adição de 100 µL de OPD (1 mg/mL) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. Essa reação foi mantida no escuro e interrompida após 10 minutos pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 4N em cada poço. A densidade ótica (OD) foi quantificada em leitora de ELISA (Awareness Technology, Stat Fax 2100, FL, EUA) em um comprimento de onda de 492 nm. O IR foi obtido de acordo com o descrito na seção 3.8.1.

3.8.4 PvDBP

A avaliação de anticorpos IgG total contra a PvDBP_{II} foi realizada no Laboratório de Malária no Centro de Pesquisas René Rachou, sob supervisão da Dra. Luzia Helena Carvalho. A proteína recombinante representando o domínio II da proteína DBP do *P. vivax* (Figura 8) (cepa Sall) expressa em *E. coli* foi obtida segundo o protocolo de Ntumngia e colaboradores (2012), e gentilmente cedida pela Dra. Flora Kano.

Os 96 poços das placas de ELISA (Maxysorp, Nunc, Dinamarca) foram sensibilizados com 100 µL da proteína PvDBP_{II} (3 µg/mL) diluída em PBS 1X,

por 16 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e bloqueadas com 200 µL de PBS leite 5%. Após 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e 50 µL do plasma, diluído 1:100 em PBS Tween 0,05% + leite 3%, foram adicionados em cada poço, em duplicata, e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem das placas com PBS Tween 0,05%, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (Sigma 0170, MO, EUA), diluído 1:4.000 em PBS Tween 0,05% + leite 3%, e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, após nova lavagem com PBS Tween 0,05%, as placas foram reveladas com a adição de 100 µL de OPD (0,2 mg/mL) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. Essa reação foi mantida no escuro e interrompida após 20 minutos pela adição de 50 uL de H₂SO₄ 4N em cada poço. A densidade ótica (OD) foi quantificada em leitora de ELISA (Awareness Technology, Stat Fax 2100, FL, EUA) em um comprimento de onda de 492 nm. O IR foi obtido de acordo com o descrito na seção 3.8.1.

3.9 Análises estatísticas

Toda a análise estatística foi realizada com o programa R v 2.11.1 (<http://www.r-project.org>). As frequências genotípicas e alélicas para cada variante foram obtidas por meio do pacote *genetics* (WERNES et al., 2011). Utilizando este pacote, foram avaliados desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste do Qui-quadrado e foi analisado o desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* com o parâmetro D'. As frequências haplotípicas foram estimadas pelo método da máxima verossimilhança que utiliza o algoritmo EM (do inglês *expectation-maximization*), que faz parte do pacote *haplo.stats* (SINNWELL e SCHAID, 2009). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar diferenças na parasitemia em relação aos genótipos. Diferenças nas médias de IR de acordo com a idade, número de episódios prévios de malária, tempo decorrido desde a última infecção e tempo de residência foram testadas pelo teste de ANOVA. Para avaliar diferenças na frequência de respondedores, foi utilizado

um modelo de regressão logística multivariada, utilizando a função `glm`, na qual o genótipo homocigoto selvagem foi a categoria de referência e os outros genótipos foram comparados em relação a ele. Em todos os testes, o valor de p foi ajustado para as variáveis idade e número de episódios prévios de malária (variáveis que foram associadas nas análises univariadas). Além disso, em todos os testes, os valores obtidos para a ancestralidade genômica (seção 3.7.2) foram avaliados como covariáveis, evitando assim a possibilidade de se encontrar associações espúrias devido a estratificação da população. Para avaliar diferenças nas médias de IR em relação aos genótipos, foi empregado o teste de covariância (ANCOVA), com a ancestralidade, idade e número de episódios prévios avaliados como covariáveis. Modelos genéticos (dominante, recessivo e heterocigoto) também foram construídos e avaliados de maneira semelhante a avaliação dos genótipos. No modelo dominante, indivíduos com o genótipo AA são somados aos indivíduos com o genótipo Aa e comparados com o grupo de indivíduos aa . No modelo recessivo, indivíduos com o genótipo aa são somados aos indivíduos com o genótipo Aa e comparados com o grupo de indivíduos AA . No modelo heterocigoto, soma-se o grupo AA e aa e o compara com o grupo Aa . O alelo selvagem de cada SNP é o primeiro a ser indicado. Por exemplo, para o SNP $CD28 -372G>A$, o alelo G é o alelo selvagem, enquanto que o alelo A é o mutante. A associação entre haplótipos e a resposta de anticorpos também foi avaliada por regressão logística, utilizando a função `haplo.glm`, do pacote *haplo.stats*. Este método fornece testes globais de associação, bem como permite avaliar o significado estatístico de cada haplótipo, comparando suas frequências entre os grupos de respondedores e não respondedores. Este método também permite avaliar diferenças na proporção do IR de diferentes haplótipos comparados com um haplótipo de referência (neste caso, o haplótipo mais frequente). Para as análises de associação com os haplótipos, o p também foi controlado para as covariáveis. Os gráficos foram desenhados com o auxílio do pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2009). Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significantes.

Resultados

4. Resultados

As frequências alélicas, genóticas e haplotípicas, bem como a distribuição destes em relação a ancestralidade genômica estão apresentadas no Artigo “*Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population*” (Anexo II).

4.1 Associação da parasitemia com os polimorfismos estudados

A densidade parasitária foi avaliada entre os diferentes genótipos e modelos (dominante, recessivo e heterozigoto). Apesar do teste de Kruskal-Wallis ter evidenciado uma tendência entre a presença do alelo *A* no SNP *CD28 - 372G>A* com maior parasitemia ($p = 0,06$), não foram observadas diferenças significativas na parasitemia entre os genótipos (Figura 25) e os modelos (dados não mostrados).

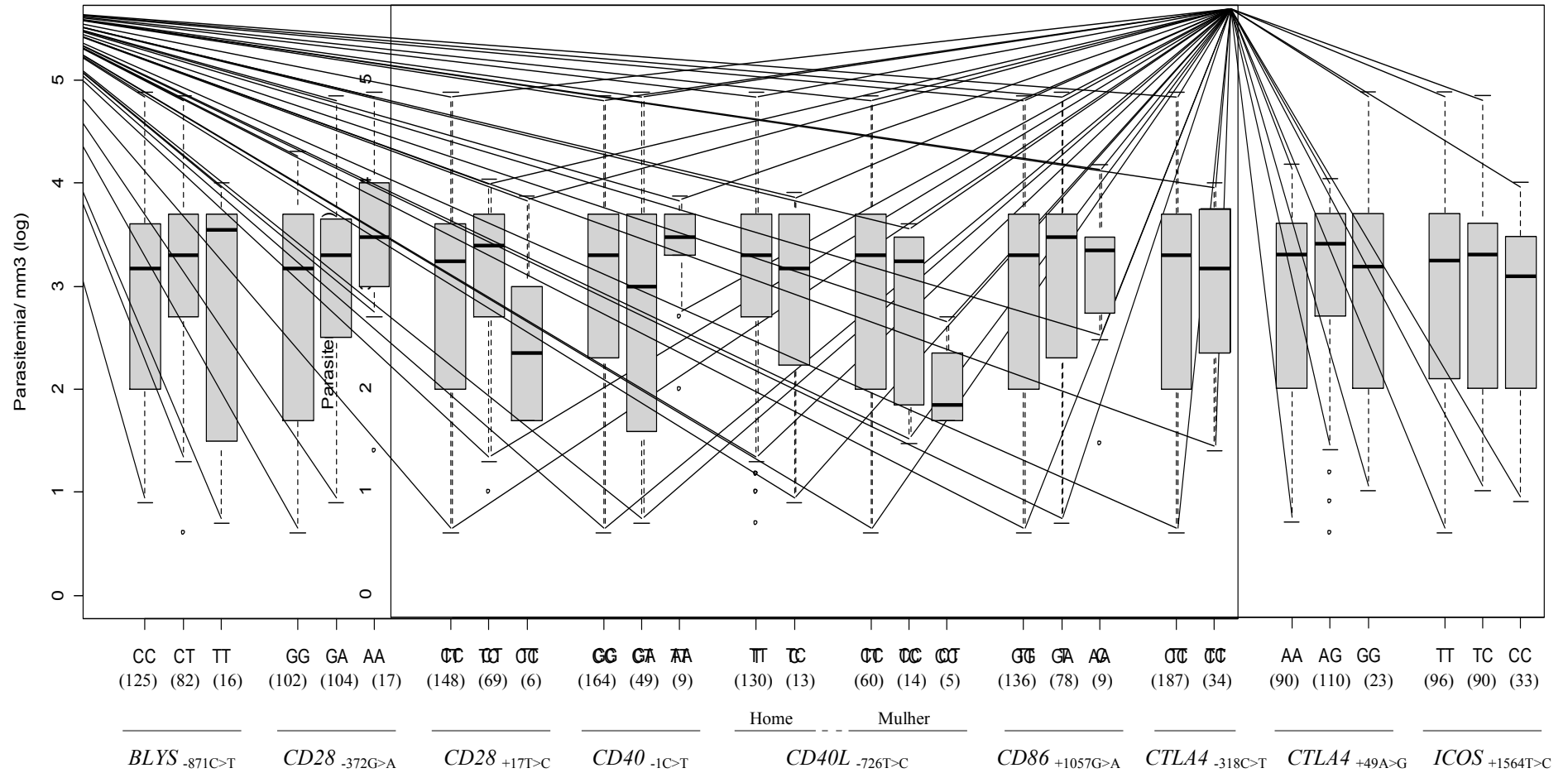


Figura 25 – Associação entre os genótipos e parasitemia representado nos Boxplots. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para cada SNP e separadamente entre homens e mulheres para o SNP *CD40L* -726T>C por este se encontrar no cromossomo X. Dentro dos parênteses estão indicados o número de amostras para cada genótipo.

4.2 Resposta de IgG total

A resposta específica de IgG total foi avaliada para 4 proteínas: MSP-1₁₉, DBP, AMA-1 e ICB2-5. Dentre todos os indivíduos avaliados, 92,4% apresentaram resposta ao menos contra uma proteína e 35,9% responderam para todas as proteínas. A frequência de respondedores para a proteína MSP-1₁₉ (83,1%) foi maior do que a observada para a DBP (75,5%), AMA-1 (67,0%) e ICB2-5 (50,6%) (Figura 26). A média do IR para a MSP-1₁₉ foi de 4,7 (variando de 0,01 a 9,17), para a DBP foi de 5,9 (variando de 0,56 a 29,7), para a AMA-1 foi de 1,88 (variando de 0 a 3,2) e para a ICB2-5 foi de 1,03 (variando de 0 a 1,89).

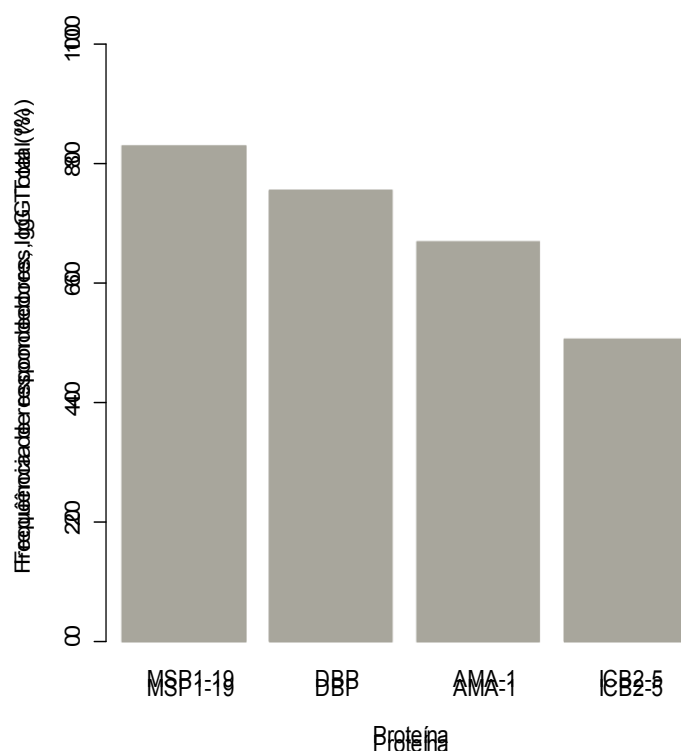


Figura 26 – Prevalência da resposta de anticorpos IgG total contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5.

4.3 Resposta de IgM e subclasses de IgG para a proteína ICB2-5

A resposta específica de IgM contra a proteína ICB2-5 foi avaliada em 173 amostras de soros dos indivíduos infectados com *P. vivax*. Já em relação as subclasses de IgG, 90 amostras de soros que possuíam IgG total contra a ICB2-5 foram avaliadas. A prevalência de respondedores para IgM foi de 28,3%. Considerando todas as amostras avaliadas quanto a resposta de IgG total contra a ICB2-5, foi verificado uma prevalência de respondedores de 23, 13,5, 6,2 e 6,2% para as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente (Figura 27). Em relação apenas as amostras positivas para a IgG total contra a ICB2-5, a prevalência de respondedores para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi de 45,6, 26,7, 12,2 e 12,2%, respectivamente. A média do IR para a IgM foi de 0,78, enquanto que para as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi de 1,08, 0,91, 0,79 e 0,79, respectivamente. Tanto a frequência de respondedores quanto os níveis de anticorpos foram maiores para IgG1 comparado com as outras subclasses ($p < 0,0001$). O IR da subclasse IgG2 também foi significativamente maior comparado com as subclasses IgG3 e IgG4 ($p < 0,001$).

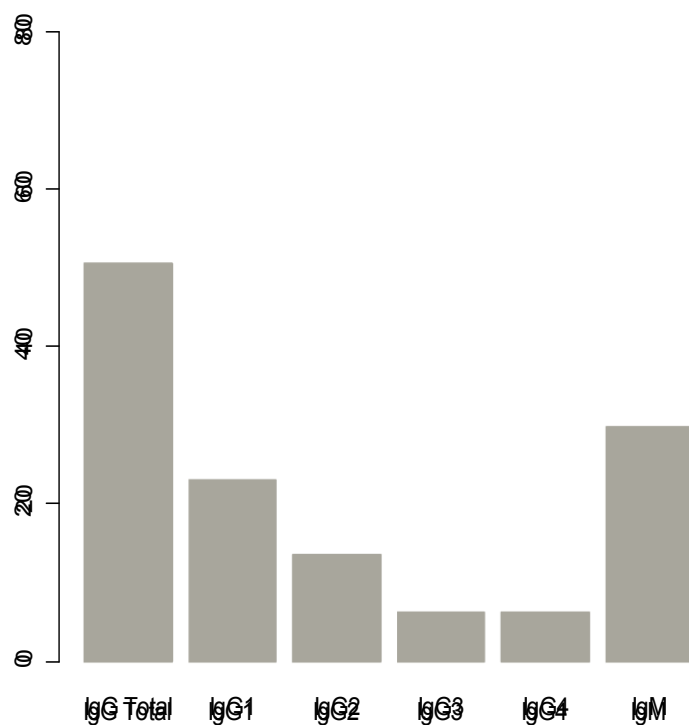


Figura 27 – Prevalência da resposta de anticorpos IgM, IgG total e subclasses contra a proteína ICB2-5.

4.4 Influência da idade e exposição na aquisição de IgG total

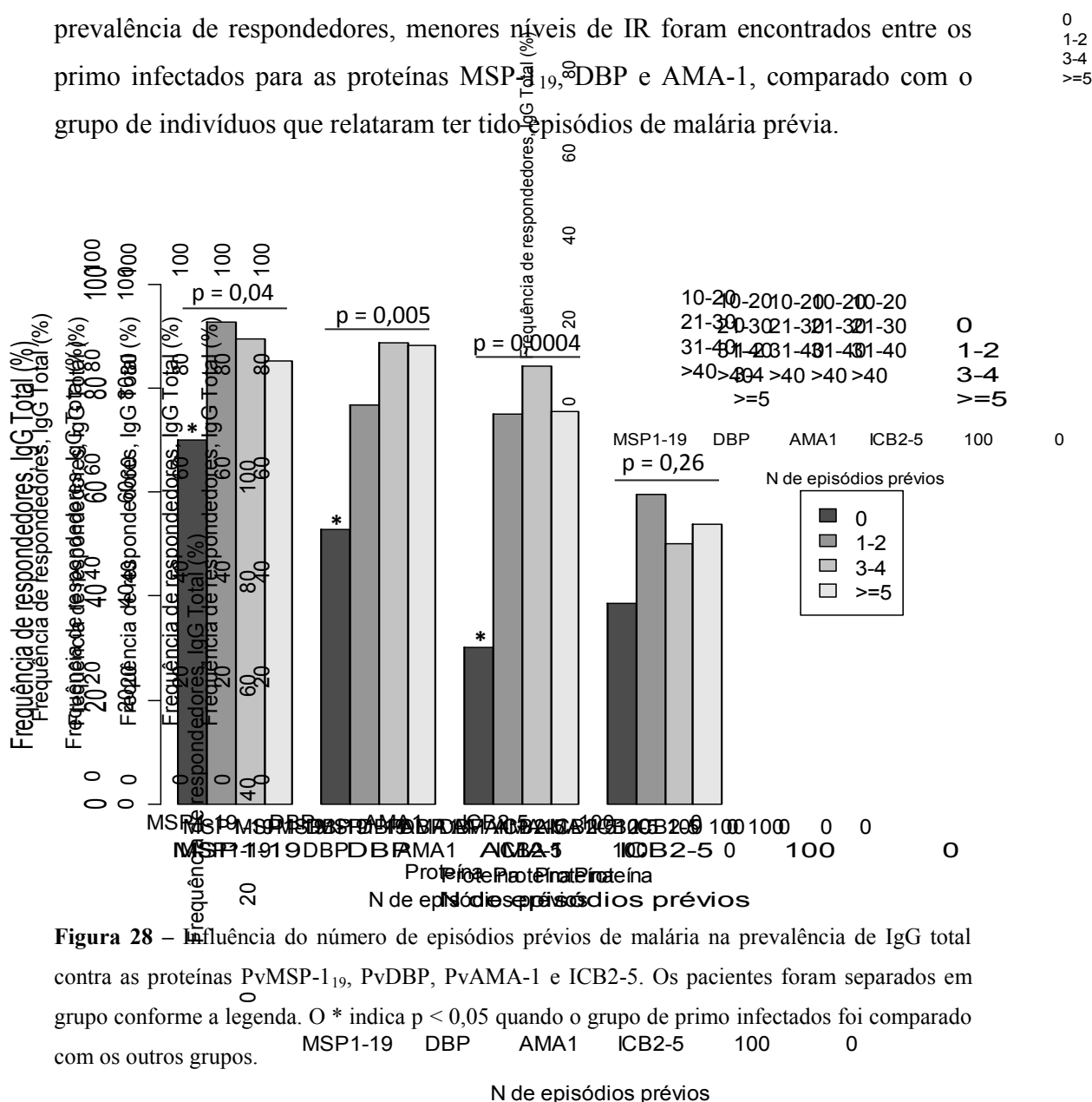
Com o objetivo de avaliar a influência da exposição na aquisição de IgG total contra as proteínas avaliadas, as seguintes informações foram obtidas no momento da coleta das amostras: número de infecções prévias, tempo decorrido desde o último episódio de malária e tempo de residência na área endêmica.

4.4.1 Episódios prévios

Com o objetivo de se avaliar a influência do número de episódios prévios na aquisição de anticorpos IgG total, os indivíduos foram separados em quatro grupos: (1) primo infectados; (2) com 1 ou 2 malárias prévias; (3) com 3 ou 4 malárias prévias e; (4) que tiveram mais de 5 casos de malária. A análise da

prevalência de IgG total contra as proteínas entre estes diferentes grupos revelou que, para a MSP-1₁₉, a DBP e a AMA-1, a frequência de respondedores foi significativamente menor no grupo dos primo infectados comparada com indivíduos que relataram terem tido malária prévia (p = 0,04, 0,005, 0,0004, respectivamente). Não houve diferenças significativas entre os outros grupos (Figura 28).

Em relação aos níveis de anticorpos, a média do IR obtido para cada proteína entre os diferentes grupos estão apresentados na Tabela 2. Semelhante a prevalência de respondedores, menores níveis de IR foram encontrados entre os primo infectados para as proteínas MSP-1₁₉, DBP e AMA-1, comparado com o grupo de indivíduos que relataram ter tido episódios de malária prévia.



4.4.2 Tempo decorrido desde o último episódio de malária

Com o objetivo de se avaliar a influência do tempo decorrido desde o último episódio de malária na aquisição de IgG total, os indivíduos foram separados em dois grupos: (1) que tiveram malária nos últimos seis meses e; (2) que tiveram malária há mais de seis meses. Não houve diferença estatisticamente significativa entre esta variável com a frequência e níveis de anticorpos para nenhuma proteína (Figura 29 e Tabela 2, respectivamente).

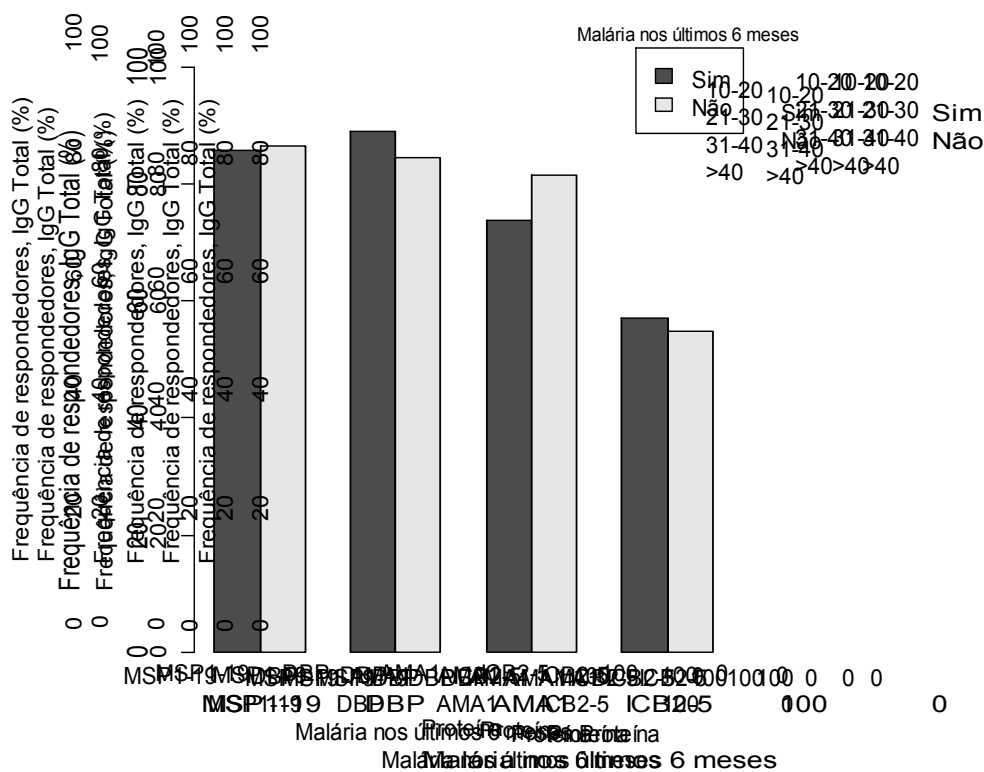


Figura 29 – Prevalência de anticorpos IgG total contra a PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os indivíduos que tiveram malária nos últimos seis meses comparado com indivíduos que não contraíram malária nos últimos seis meses.

4.4.3 Tempo de residência na área endêmica

Com o objetivo de se avaliar a influência do tempo de residência na área endêmica na aquisição de IgG total, os indivíduos foram separados em cinco

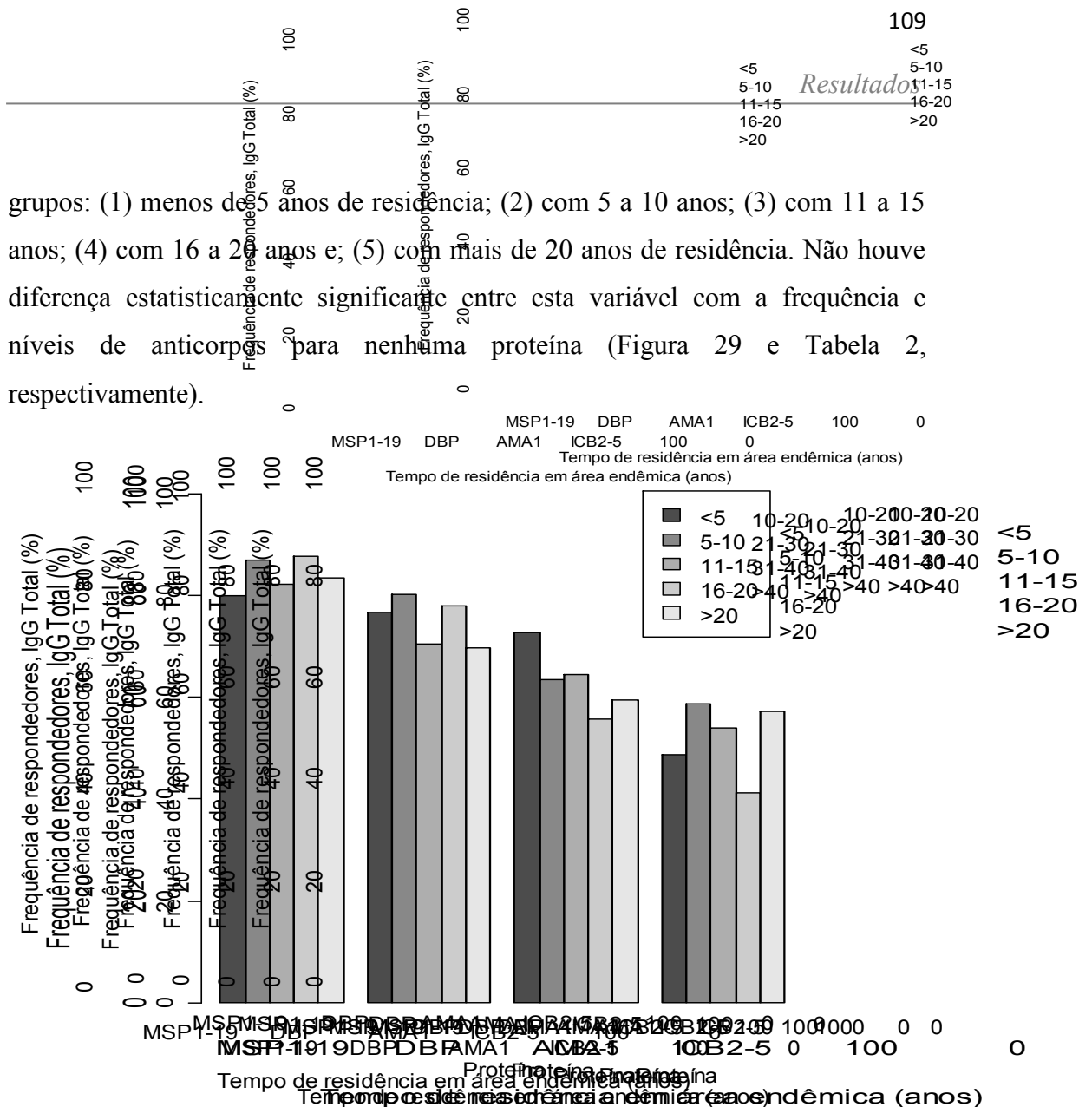


Figura 30 – Influência do tempo de residência na área endêmica na prevalência de IgG total contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5. Os pacientes foram separados em grupo conforme a legenda.

4.4.4 Idade

Com o objetivo de se avaliar a influência da idade na aquisição de IgG total, os indivíduos foram separados em quatro grupos: (1) com 10 a 20 anos; (2) com 21 a 30; (3) com 31 a 40 anos; (4) com mais de 40 anos de idade. Para a ICB2-5, a frequência de respondedores diferiu significativamente de acordo com a idade ($p = 0,04$). A análise de comparação par a par dentro do grupo revelou que

esta diferença ocorreu devido a maior prevalência de respondedores entre o grupo com mais de 40 anos de idade em relação ao grupo na faixa de 10 a 20 anos ($p = 0,02$) (Figura 31). Apesar do grupo com mais de 40 anos possuir maiores níveis de anticorpos, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 2). Em relação as outras proteínas, não houve diferenças significativas, tanto na frequência de respondedores como nos níveis de anticorpos.

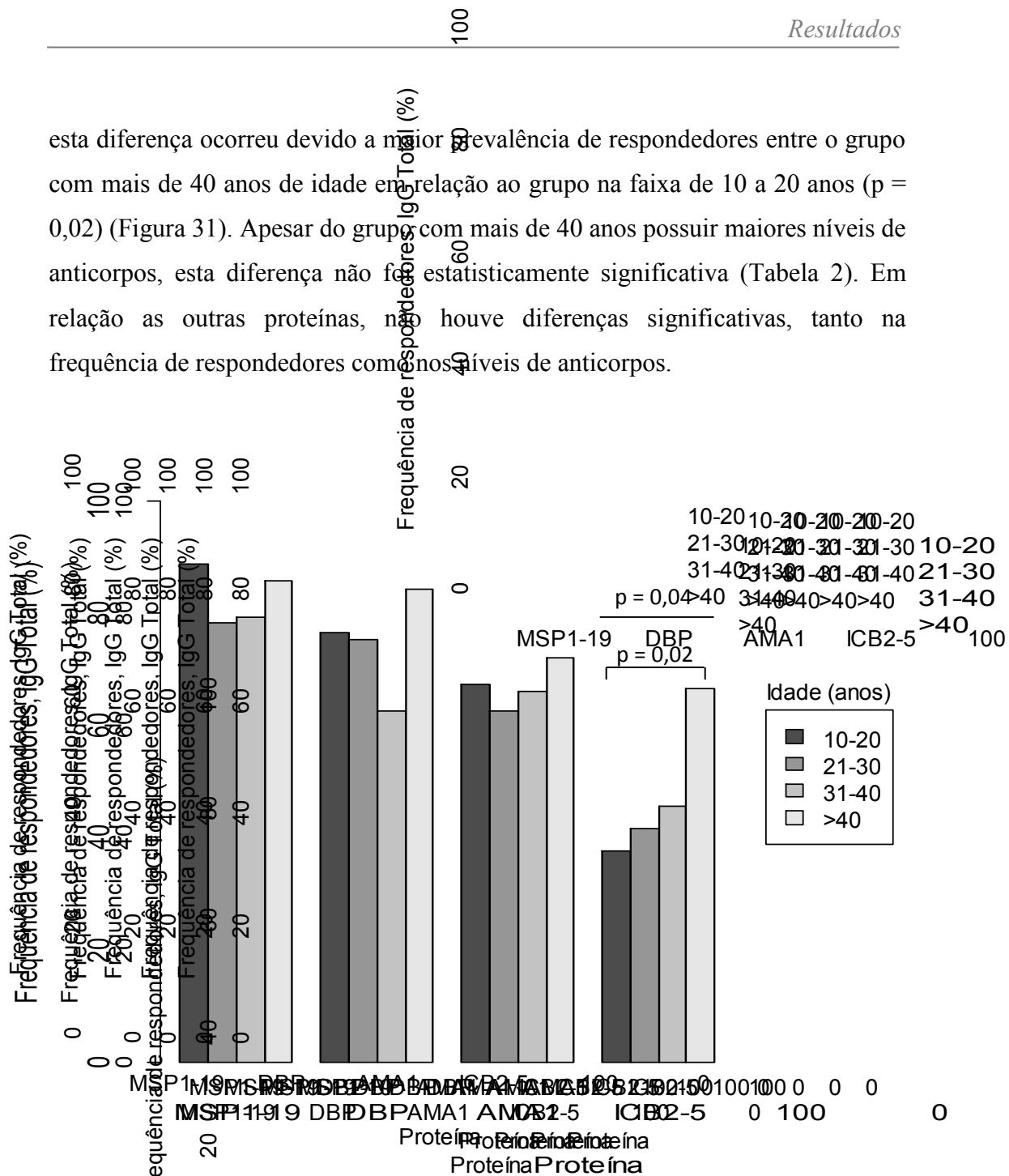


Figura 31 - Influência da idade na prevalência de IgG total contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5. Os pacientes foram separados em grupo conforme a legenda. Indivíduos com mais de 40 anos apresentaram maior prevalência de anticorpos contra a ICB2-5 em relação aos indivíduos com 10 a 20 anos.

Proteína

Tabela 2 – Níveis de anticorpos (IR) para a PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 de acordo com a idade, tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, tempo decorrido desde o último episódio de malária e primo infecção.

Variável independente	MSP-1 ₁₉			DBP			AMA-1			ICB2-5		
	n	IR†	p	n	IR	p	n	IR	p	n	IR	p
Idade (anos)			0,57			0,14			0,82			0,16
10-20	45	5,17 (4,28-6,05)		45	5,12 (3,51-6,72)		46	1,94 (1,60-2,28)		43	1,04 (0,88-1,19)	
21-30	55	4,61 (3,76-5,46)		53	7,20 (4,88-9,51)		56	1,87 (1,56-2,18)		48	1,00 (0,89-1,12)	
31-40	48	4,47 (3,63-5,32)		48	4,78 (2,90-6,67)		50	1,79 (1,47-2,11)		46	0,98 (0,84-1,09)	
>40	47	4,65 (3,80-5,50)		38	6,84 (4,62-9,05)		43	1,93 (1,60-2,25)		36	1,16 (0,99-1,34)	
Anos de residência em área endêmica			0,85			0,83			0,66			0,78
>5	79	4,71 (4,02-5,39)		77	6,76 (5,00-8,51)		80	1,99 (1,74-2,24)		78	1,04 (0,93-1,14)	
5-10	30	4,89 (3,86-5,91)		30	5,29 (3,10-7,49)		30	1,71 (1,31-2,11)		29	1,13 (0,96-1,29)	
11-15	28	4,34 (3,20-5,47)		27	5,32 (2,84-7,80)		28	1,83 (1,42-2,25)		26	1,03 (0,83-1,23)	
16-20	16	4,53 (3,00-6,06)		18	3,63 (1,82-5,44)		18	1,70 (1,14-2,27)		17	0,89 (0,60-1,19)	
>20	24	5,18 (3,81-6,54)		23	4,20 (2,35-6,06)		25	1,96 (1,46-2,46)		21	1,06 (0,88-1,25)	
Número de episódios prévios de malária			0,0001			0,07			0,0002			0,41
0	20	3,28 (1,88-4,68)		17	4,36 (1,06-7,67)		20	1,00 (0,50-1,51)		13	0,87 (0,58-1,16)	
1-2	42	6,12 (5,30-6,94)		41	5,35 (3,42-7,28)		44	2,28 (1,96-2,59)		42	1,09 (0,93-1,24)	
3-4	19	5,84 (4,49-7,19)		18	8,01 (3,76-12,26)		19	2,18 (1,70-2,66)		14	1,10 (0,85-1,35)	
≥5	96	4,64 (4,06-5,21)		94	6,86 (5,39-8,33)		99	2,01 (1,81-2,21)		91	1,06 (0,97-1,15)	
Malária nos últimos 6 meses			0,17			0,09			0,06			0,69
Não	85	4,74 (4,10-5,38)		83	7,38 (5,78-8,99)		88	1,94 (1,73-2,16)		79	1,11 (1,02-1,20)	
Sim	52	5,48 (4,70-6,27)		52	5,67 (3,85-7,48)		54	2,31 (2,05-2,57)		51	1,08 (0,94-1,20)	
Primo infectados			0,01			0,03			<0,0001			0,11
Não	157	5,18 (4,73-5,63)		153	6,59 (5,46-7,72)		162	2,10 (1,95-2,26)		147	1,07 (1,00-1,15)	
Sim	20	3,28 (1,88-4,68)		17	4,36 (1,06-7,67)		20	1,00 (0,50-1,51)		13	0,87 (0,58-1,16)	

† IR expresso como média (95% IC)

4.5 Influência da idade e exposição na aquisição de IgM e subclasses de IgG contra a ICB2-5

Devido ao fato do tamanho amostral reduzido para as subclasses de IgG, bem como o baixo número de respondedores, não foi avaliada a influência da idade e exposição na prevalência de respondedores. Para a IgM, não houve diferença estatística significativa em relação a prevalência de respondedores com idade e exposição (dados não mostrados).

Em relação aos níveis de anticorpos da IgM e subclasses de IgG, a média do IR entre os diferentes grupos está apresentada na Tabela 3. Indivíduos que tiveram mais de 5 episódios de malária apresentaram menores níveis de anticorpos IgG2 comparado aos indivíduos que tiveram menos de 5 episódios de malária ($p = 0,01$). Não houve associações significativas entre os IR das subclasses com os outros parâmetros avaliados. No entanto, uma tendência foi observada entre maiores níveis de IgG2 em residentes a menos de cinco anos na área endêmica ($p = 0,1$). Outra tendência não significativa também foi notada, com indivíduos menores de 20 anos de idade apresentando maiores níveis de IgG4 ($p = 0,07$).

Tabela 3 – Níveis de anticorpos (IR) IgM e subclasses de IgG contra a proteína ICB2-5 de acordo com a idade, tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, tempo decorrido desde o último episódio de malária.

Variável independente	IgG1			IgG2		IgG3		IgG4		IgM		
	n	IR [†]	p	IR	p	IR	p	IR	p	n	IR	p
Idade (anos)			0,37		0,30		0,46		0,07			0,15
10-20	23	1,26 (0,76-1,75)		0,96 (0,79-1,13)		0,79 (0,67-0,90)		0,93 (0,73-1,14)		42	0,95 (0,72-1,19)	
21-30	19	1,15 (0,70-1,61)		0,90 (0,74-1,05)		0,69 (0,60-0,73)		0,73 (0,65-0,81)		46	0,66 (0,45-0,86)	
31-40	21	1,00 (0,91-1,09)		0,94 (0,73-1,15)		0,92 (0,54-1,29)		0,71 (0,66-0,76)		44	0,74 (0,51-0,96)	
>40	24	0,94 (0,86-1,01)		0,85 (0,70-1,01)		0,79 (0,69-0,89)		0,79 (0,69-0,89)		35	0,79 (0,56-1,02)	
Anos de residência em área endêmica			0,54		0,10		0,10		0,50			0,21
>5	38	1,10 (0,87-1,32)		0,99 (0,85-1,12)		0,83 (0,71-0,94)		0,80 (0,72-0,88)		76	0,65 (0,50-0,80)	
5-10	17	1,31 (0,63-1,99)		0,90 (0,68-1,12)		0,87 (0,44-1,29)		0,82 (0,56-1,08)		29	0,68 (0,48-0,88)	
11-15	14	0,95 (0,88-1,02)		0,82 (0,72-0,91)		0,74 (0,61-0,88)		0,79 (0,70-0,88)		26	1,03 (0,66-1,39)	
>15	18	0,95 (0,84-1,06)		0,87 (0,67-1,07)		0,68 (0,54-0,82)		0,76 (0,63-0,88)		36	0,92 (0,65-1,19)	
Número de episódios prévios de malária			0,53		0,01		0,69		0,44			0,44
<5	36	1,10 (0,87-1,33)		0,97 (0,84-1,10)		0,77 (0,66-0,89)		0,79 (0,71-0,87)		66	0,90 (0,69-1,10)	
≥5	49	1,08 (0,85-1,31)		0,88 (0,76-0,99)		0,82 (0,67-0,97)		0,80 (0,70-0,90)		87	0,73 (0,60-0,87)	
Malária nos últimos 6 meses			0,37		0,81		0,12		0,56			0,32
Não	46	1,07 (0,83-1,32)		0,93 (0,80-1,06)		0,78 (0,62-0,94)		0,80 (0,69-0,91)		77	0,74 (0,56-0,91)	
Sim	26	1,00 (0,93-1,07)		0,90 (0,75-1,05)		0,86 (0,69-1,02)		0,78 (0,69-0,86)		49	0,82 (0,62-1,02)	

† IR expresso como média (95% IC)

4.6 Associação entre a resposta de IgG total e os SNPs

4.6.1 Prevalência de anticorpos IgG total entre os genótipos

Com o objetivo de avaliar a influência dos genótipos na prevalência de respondedores de IgG total contra as proteínas avaliadas neste estudo, foi realizada uma análise de regressão logística multivariada. Nesta análise, os genótipos heterozigoto e homozigoto para o alelo mutante foram comparados em relação ao genótipo homozigoto selvagem, que ficou como referência. Assim, a chance do indivíduo responder a proteína ficou representada como razão de chance (OR, do inglês *odds ratio*) em relação ao genótipo referência. O OR dos genótipos de todos os SNPs avaliados contra as proteínas MSP-1₁₉, DBP, AMA-1 e ICB2-5 estão apresentados na Tabela 4. Nas tabelas também estão indicados os valores de p ajustados de acordo com a ancestralidade, idade e número de episódios prévios de malária. Duas associações significativas foram encontradas: indivíduos com o genótipo *GA* para o SNP *CD28 -372G>A* apresentaram menor chance de responder contra a proteína DBP comparados com os indivíduos possuindo o genótipo *GG* (OR = 0,34, p ajustado = 0,03), e indivíduos com o genótipo *TC* para o SNP *ICOS +1564T>C* também apresentaram menor chance de responder contra a DBP comparados com indivíduos possuindo o genótipo *TT* (OR = 0,29, p ajustado = 0,01).

Tabela 4 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes genótipos avaliados neste estudo

Variável independente	continua											
	MSP-1 ₁₉			DBP			AMA-1			ICB2-5		
	n	OR	p	n	OR	p	n	OR	p	n	OR	p
<i>BLYS -871C>T</i>												
CC	115	Referência		110	Referência		119	Referência		103	Referência	
CT	67	1,31 (0,50-3,46)	0,58	66	1,31 (0,53-3,23)	0,56	65	1,37 (0,66-2,86)	0,39	62	1,30 (0,68-2,51)	0,43
TT	13	0,87 (0,17-4,57)	0,87	12	2,90 (0,28-29,7)	0,37	15	5,17 (0,61-43,0)	0,13	13	0,81 (0,24-2,71)	0,74
<i>CD28 -372G>A</i>												
GG	92	Referência		90	Referência		94	Referência		86	Referência	
GA	89	0,64 (0,26-1,56)	0,33	85	0,34 (0,13-0,90)	0,03	91	0,55 (0,27-1,11)	0,10	80	0,87 (0,46-1,66)	0,68
AA	14	1,55 (0,18-13,5)	0,69	13	1,96 (0,20-19,2)	0,56	15	1,14 (0,27-4,81)	0,86	12	2,05 (0,57-7,43)	0,27
<i>CD28 +17T>C</i>												
TT	128	Referência		125	Referência		132	Referência		138	Referência	
TC	62	0,75 (0,30-1,85)	0,53	57	1,02 (0,42-2,52)	0,96	62	1,21 (0,58-2,51)	0,61	54	1,0 (0,51-1,95)	0,99
CC	5	0,20 (0,03-1,40)	0,10	6	0,68 (0,10-4,75)	0,70	6	1,04 (0,16-6,66)	0,97	6	0,2 (0,02-1,80)	0,15
<i>CD40 -1C>T</i>												
CC	146	Referência		140	Referência		150	Referência		137	Referência	
CT	41	1,36 (0,43-4,32)	0,60	42	0,58 (0,22-1,50)	0,26	42	0,74 (0,33-1,67)	0,46	37	1,21 (0,58-2,54)	0,61
TT	8	1,19 (0,14-11,0)	0,87	6	0,32 (0,05-2,09)	0,23	8	2,62 (0,30-22,7)	0,38	6	2,00 (0,35-11,5)	0,44
<i>CD40L -726T>C*</i>												
Homens												
T	112	Referência		108	Referência		115	Referência		107	Referência	
C	13	1,49 (0,16-11,35)	0,72	12	0,32 (0,07-1,43)	0,13	13	0,65 (0,16-2,59)	0,55	12	2,71 (0,70-10,4)	0,15

Tabela 4 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos contra as proteínas MSP-1₁₉, DBP, AMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes genótipos avaliados neste estudo

Variável independente	MSP-1 ₁₉			DBP			AMA-1			ICB2-5			conclusão
	n	OR	p	n	OR	p	n	OR	p	n	OR	p	
Mulheres													
TT	53	Referência		51	Referência		55	Referência		45	Referência		
TC	13	0,44 (0,08-2,26)	0,33	12	0,67 (0,08-5,13)	0,70	13	0,60 (0,12-3,03)	0,54	10	0,39 (0,08-1,79)	0,23	
CC	4	0,37 (0,03-4,71)	0,45	5	0,40 (0,05-3,43)	0,40	5	0,92 (0,12-7,16)	0,94	4	2,88 (0,23-35,8)	0,41	
<i>CD86 +1057G>A</i>													
GG	120	Referência		115	Referência		122	Referência		110	Referência		
GA	77	0,54 (0,27-1,29)	0,17	68	1,60 (0,64-4,05)	0,32	70	1,0 (0,49-2,03)	1,0	50	1,18 (0,61-2,28)	0,62	
AA	8	5,56 (0-15,5)	0,99	8	1,91 (0,19-19,0)	0,58	8	2,44 (0,27-22,0)	0,43	8	2,19 (0,47-10,1)	0,31	
<i>CTLA4 -318C>T</i>													
CC	165	Referência		158	Referência		169	Referência		151	Referência		
CT	30	1,0 (0,31-3,21)	1,0	30	1,09 (0,38-3,14)	0,87	31	1,54 (0,59-4,02)	0,37	27	1,34 (0,57-3,17)	0,50	
<i>CTLA4 +49A>G</i>													
AA	78	Referência		76	Referência		81	Referência		75	Referência		
AG	97	1,05 (0,42-2,62)	0,91	91	2,00 (0,81-4,97)	0,13	88	0,82 (0,41-1,66)	0,58	84	0,77 (0,41-1,47)	0,43	
GG	20	0,82 (0,20-3,42)	0,79	21	0,65 (0,18-2,31)	0,51	28	1,44 (0,41-5,09)	0,57	19	0,61 (0,21-1,75)	0,36	
<i>ICOS +1564T>C</i>													
TT	86	Referência		81	Referência		87	Referência		77	Referência		
TC	80	2,16 (0,80-5,82)	0,13	78	0,29 (0,11-0,78)	0,01	82	0,88 (0,43-1,83)	0,71	73	1,14 (0,59-2,23)	0,69	
CC	28	1,39 (0,40-4,86)	0,60	28	0,61 (0,17-2,20)	0,45	30	1,55 (0,55-4,40)	0,37	27	1,70 (0,67-4,30)	0,26	

*As análises foram realizadas separadamente entre homens e mulheres para o SNP *CD40L -726T>C* por este se encontrar no cromossomo X

4.6.2 Prevalência de anticorpos IgG total de acordo com o modelo genético

Conforme explicado na seção 3.9, foi avaliado a prevalência de anticorpos IgG total contra as quatro proteínas estudadas de acordo com o modelo genético. Semelhantemente a análise dos genótipos, neste caso também foi realizada uma regressão logística múltipla controlando para as variáveis: ancestralidade, idade e número de episódios prévios de malária. O OR, bem como o p ajustado para cada proteína entre os diferentes modelos estão apresentados na Tabela 5. Indivíduos heterozigotos para o SNP *CD28* -372G>A apresentaram menor chance de responder contra a DBP em relação aos indivíduos homozigotos (OR = 0,32, p ajustado = 0,01). Em relação ao SNP *CD40L* -726T>C, seguindo um modelo dominante, homens e mulheres possuindo o alelo *T* tiveram maior chance de apresentarem anticorpos contra a DBP comparados aos homens hemizigotos e mulheres homozigotas para o alelo *C*. Para o SNP *ICOS* +1564T>C, tanto indivíduos heterozigotos, como homozigotos para o alelo *C* apresentaram menor chance de responderem contra a DBP (OR = 0,34, p ajustado = 0,01 e OR = 0,36, p ajustado = 0,03, respectivamente).

Tabela 5 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes modelos genéticos

Variável independente	MSP-1 ₁₉		DBP		AMA-1		ICB2-5	
	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
continua								
<i>BLYS -871C>T</i>								
Dominante ^a	1,26 (0,25-6,38)	0,78	0,38 (0,04-3,78)	0,41	0,21 (0,02-1,80)	0,16	1,35 (0,41-4,40)	0,62
Recessivo ^b	1,22 (0,50-2,99)	0,66	1,44 (0,60-3,46)	0,41	1,60 (0,79-3,25)	0,19	1,20 (0,65-2,22)	0,56
Heterozigoto ^c	1,33 (0,52-3,44)	0,55	1,21 (0,49-2,99)	0,67	1,23 (0,60-2,54)	0,57	1,33 (0,70-2,53)	0,38
<i>CD28 -372G>A</i>								
Dominante	0,52 (0,06-4,25)	0,54	0,31 (0,03-2,77)	0,29	0,66 (0,16-2,62)	0,55	0,46 (0,13-1,60)	0,22
Recessivo	0,70 (0,29-1,69)	0,43	0,42 (0,17-1,06)	0,07	0,60 (0,30-1,20)	0,15	0,99 (0,53-1,83)	0,97
Heterozigoto	0,61 (0,25-1,46)	0,27	0,32 (0,12-0,81)	0,01	0,54 (0,27-1,07)	0,08	0,80 (0,43-1,50)	0,48
<i>CD28 +17T>C</i>								
Dominante	4,59 (0,66-31,7)	0,12	1,47 (0,21-10,0)	0,69	1,02 (0,16-6,48)	0,98	4,99 (0,56-4,44)	0,15
Recessivo	0,65 (0,27-1,54)	0,33	0,97 (0,41-2,27)	0,95	1,19 (0,59-2,41)	0,63	0,86 (0,45-1,65)	0,65
Heterozigoto	0,83 (0,34-2,01)	0,68	1,05 (0,43-2,55)	0,92	1,21 (0,58-2,49)	0,61	1,06 (0,54-2,07)	0,86
<i>CD40 -1C>T</i>								
Dominante	0,89 (0,10-7,62)	0,92	2,71 (0,42-17,3)	0,29	0,36 (0,04-3,07)	0,35	0,52 (0,09-2,99)	0,47
Recessivo	1,33 (0,46-3,81)	0,60	0,53 (0,22-1,29)	0,16	0,88 (0,41-1,91)	0,75	1,29 (0,64-2,61)	0,47
Heterozigoto	1,35 (0,43-4,25)	0,61	0,62 (0,24-1,58)	0,32	0,71 (0,31-1,59)	0,40	1,17 (0,56-2,45)	0,67
<i>CD40L -726T>C</i>								
Dominante	0,82 (0,17-4,0)	0,81	3,39 (1,02-11,2)	0,04	1,40 (0,46-4,24)	0,55	0,38 (0,12-1,20)	0,10
Recessivo	0,66 (0,22-2,02)	0,47	0,44 (0,16-1,23)	0,12	0,64 (0,26-1,59)	0,34	1,23 (0,52-2,91)	0,63
Heterozigoto	0,47 (0,09-2,39)	0,37	0,76 (0,10-5,69)	0,79	0,61 (0,12-3,02)	0,54	0,36 (0,08-1,64)	0,19

Tabela 5 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes modelos genéticos

Variável independente	MSP-1 ₁₉		DBP		AMA-1		ICB2-5		conclusão
	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p	
Heterozigoto <i>CD86 +1057G>A</i>	0,47 (0,09-2,39)	0,37	0,76 (0,10-5,69)	0,79	0,61 (0,12-3,02)	0,54	0,36 (0,08-1,64)	0,19	
Dominante	1,42 (0-65,0)	0,99	0,60 (0,06-5,91)	0,67	0,41 (0,05-3,66)	0,42	0,48 (0,11-2,19)	0,35	
Recessivo	0,62 (0,26-1,47)	0,28	1,63 (0,67-3,98)	0,28	1,08 (0,54-2,14)	0,83	1,27 (0,68-2,39)	0,45	
Heterozigoto <i>CTLA4 +49A>G</i>	0,51 (0,21-1,21)	0,13	1,55 (0,62-3,88)	0,35	0,96 (0,48-1,94)	0,92	1,12 (0,58-2,14)	0,73	
Dominante	1,25 (0,33-4,73)	0,74	2,16 (0,65-7,13)	0,21	0,62 (0,19-2,05)	0,43	1,43 (0,53-3,88)	0,48	
Recessivo	1,01 (0,42-2,41)	0,98	1,56 (0,68-3,58)	0,29	0,90 (0,45-1,77)	0,75	0,74 (0,40-1,37)	0,34	
Heterozigoto <i>ICOS +1564T>C</i>	1,10 (0,47-2,58)	0,83	2,20 (0,93-5,18)	0,07	0,77 (0,39-1,49)	0,43	0,85 (0,47-1,56)	0,61	
Dominante	0,99 (0,30-3,27)	0,99	0,83 (0,27-2,57)	0,75	0,60 (0,23-1,60)	0,31	0,63 (0,26-1,50)	0,30	
Recessivo	1,89 (0,70-4,51)	0,15	0,36 (0,14-0,91)	0,03	1,03 (0,52-2,03)	0,94	1,27 (0,69-2,35)	0,44	
Heterozigoto	1,99 (0,72-5,15)	0,15	0,34 (0,14-0,82)	0,01	0,79 (0,40-1,55)	0,49	1,00 (0,99-1,04)	0,99	

^aNo modelo dominante, indivíduos com os genótipos *AA* e *Aa* são reunidos e comparados contra o grupo *aa*, sendo *A* o alelo selvagem e *a* o alelo mutante

^bNo modelo recessivo, indivíduos com os genótipos *aa* e *Aa* são reunidos e comparados contra o grupo *AA*, sendo *A* o alelo selvagem e *a* o alelo mutante

^cNo modelo heterozigoto, indivíduos com os genótipos *AA* e *aa* são reunidos e comparados contra o grupo *Aa*, sendo *A* o alelo selvagem e *a* o alelo mutante

4.6.3 Níveis de anticorpos IgG total entre os genótipos e os modelos genéticos

A associação entre os genótipos com os níveis de anticorpos para as proteínas MSP-1₁₉, DBP, AMA-1 e ICB2-5 estão apresentadas nas Figuras 32, 33, 34 e 35, respectivamente. Houve associação entre o SNP *CD40 -1C>T* e os níveis de MSP-1₁₉ ($p = 0,03$). A análise par a par revelou que indivíduos com o genótipo *CT* apresentaram menores níveis de anticorpos comparados com indivíduos com o genótipo *CC* ($p = 0,02$) e *TT* ($p = 0,01$). A análise de modelos confirmou que indivíduos com o genótipo *TC* apresentaram menores níveis de anticorpos comparados aos outros indivíduos agrupados ($p = 0,04$). Em relação ao SNP *CD86 +1057G>A*, houve associação com os níveis de anticorpos contra a MSP-1₁₉ ($p = 0,04$). A análise par a par revelou que indivíduos com o genótipo *AA* apresentaram maiores níveis de anticorpos em relação aos indivíduos com o genótipo *GG* ($p = 0,006$) ou *GA* ($p = 0,04$). O modelo genético recessivo manteve a diferença significativa entre os indivíduos *AA* contra os indivíduos *GG* e *GA* agrupados ($p = 0,02$).

Nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos com os níveis de anticorpos contra as proteínas DBP, AMA-1 e ICB2-5, independente do modelo genético analisado.

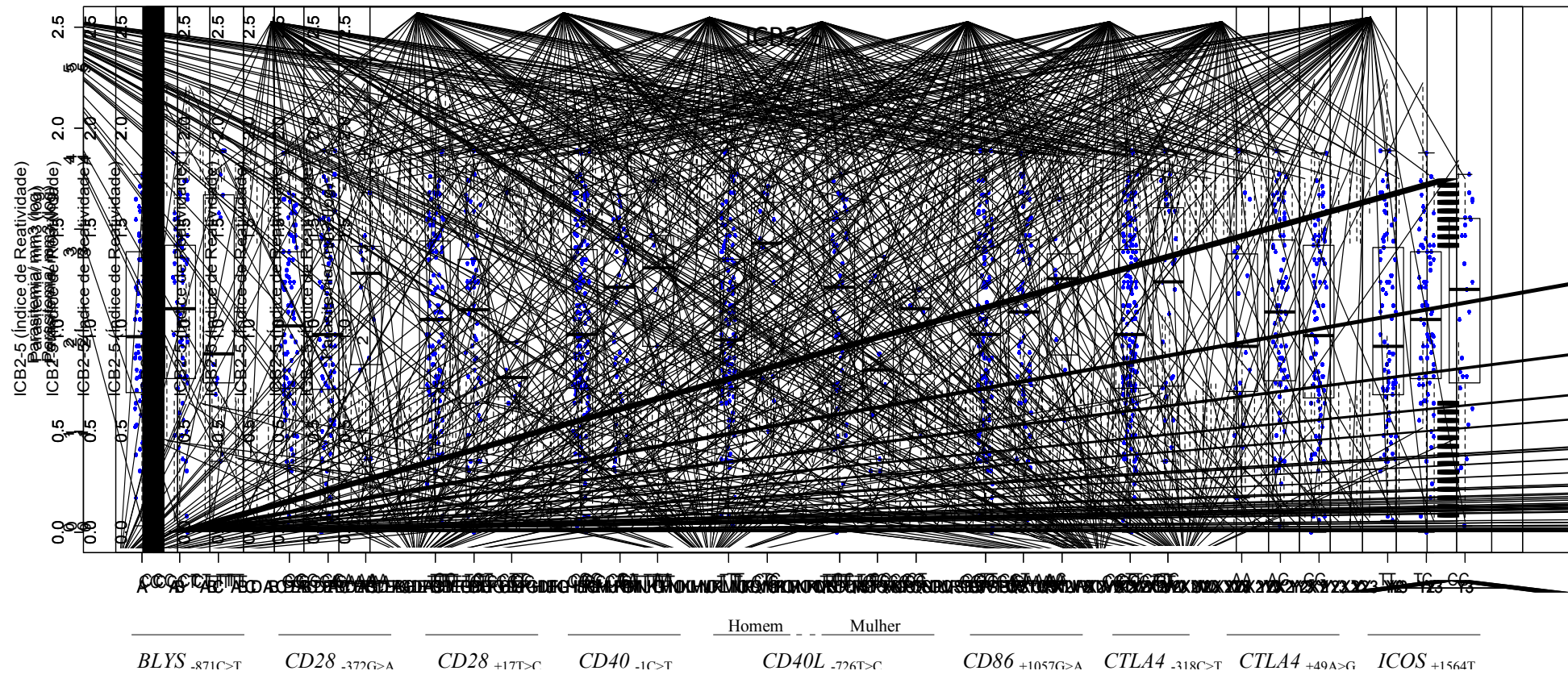


Figura 35 – Associação entre os genótipos e IR contra a ICB2-5 representada nos Boxplots. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado dentro de cada SNP e separadamente entre homens e mulheres para o SNP *CD40L* _{-726T>C} por este se encontrar no cromossomo X. Os valores individuais são representados pelos pontos azuis.

4.7 Associação entre a resposta de IgM e subclasses de IgG com os SNPs

4.7.1 Prevalência e níveis de anticorpos IgM e subclasses de IgG entre os genótipos e modelos genéticos

Uma análise de regressão logística multivariada semelhante a realizada para IgG total foi conduzida para avaliar possíveis associações entre os genótipos com a prevalência de IgM e subclasses de IgG contra a ICB2-5. Em relação a IgM, a única associação encontrada entre os genótipos foi para o SNP *CD28 - 372G>A*, cujos indivíduos possuindo o genótipo *AA* apresentaram maior chance de terem anticorpos em relação aos indivíduos com o genótipo *GG* (OR = 4,36, p ajustado = 0,03) (Tabela 6). Em relação aos modelos genéticos, o modelo dominante para este mesmo SNP foi associado com menor chance de apresentar anticorpos IgM (OR = 0,26, p ajustado = 0,03) enquanto que o modelo recessivo foi associado com maior prevalência de IgM (OR = 2,18, p ajustado = 0,03). Outro modelo associado com menor chance de apresentar IgM foi encontrado para o SNP *CD40 -1C>T*, cujo modelo dominante apresentou um OR de 0,16 (p ajustado = 0,04) (Tabela 7). Nenhuma associação entre os níveis de IgM com qualquer SNP foi encontrada (dados não mostrados).

Já para as subclasses de IgG, não foram observadas associações entre a prevalência e IR com os genótipos e modelos estudados (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos de IgM e subclasses de IgG contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes genótipos avaliados neste estudo

continua

Variável independente	IgM			IgG1			IgG2		IgG3		IgG4	
	n	OR	p	n	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
<i>BLYS -871C>T</i>												
CC	97	Referência		48	Referência		Referência		Referência		Referência	
CT	61	1,34 (0,62-2,90)	0,46	37	0,89 (0,36-2,19)	0,79	0,96 (0,31-2,94)	0,95	0,18 (0,03-1,27)	0,08	0,99 (0,22-4,49)	0,99
TT	13	1,78 (0,45-6,99)	0,41	6	0,80 (0,12-5,17)	0,81	1,91 (0,25-14,3)	0,53	0,27 (0,01-6,94)	0,42	1,62 (0,10-26,0)	0,73
<i>CD28 -372G>A</i>												
GG	80	Referência		42	Referência		Referência		Referência		Referência	
GA	79	1,99 (0,89-4,45)	0,09	39	0,55 (0,22-1,38)	0,20	1,39 (0,47-4,18)	0,55	1,94 (0,43-8,86)	0,39	1,26 (0,26-6,07)	0,77
AA	12	4,36 (1,09-17,5)	0,03	8	0,85 (0,18-3,96)	0,84	0,08 (0-44,8)	0,99	0,01 (0-45,8)	0,99	1,34 (0,11-16,6)	0,82
<i>CD28 +17T>C</i>												
TT	116	Referência		60	Referência		Referência		Referência		Referência	
TC	51	0,55 (0,23-1,31)	0,18	28	0,93 (0,37-2,34)	0,89	1,98 (0,67-5,87)	0,22	0,60 (0,12-3,05)	0,54	0,23 (0,02-2,32)	0,21
CC	4	1,27 (0,12-14,2)	0,84		-*		-		-			
<i>CD40 -1C>T</i>												
CC	128	Referência		65	Referência		Referência		Referência		Referência	
CT	37	0,75 (0,30-1,89)	0,54	20	1,35 (0,48-3,79)	0,57	1,32 (0,40-4,40)	0,64	1,02 (0,17-6,0)	0,98	0,01 (0-78,9)	0,99
TT	6	4,67 (0,68-31,9)	0,12	4	0,34 (0,03-3,57)	0,37	0,04 (0-56,4)	0,99	0,02 (0-60,2)	0,99	5,69 (0,32-20,0)	0,23
<i>CD40L -726T>C</i>												
Homens												
T	103	Referência		49	Referência		Referência		Referência		Referência	
C	12	0,73 (0,17-3,16)	0,67	8	3,11 (0,52-18,4)	0,21	1,69 (0,23-12,2)	0,60	0,93 (0,07-12,1)	0,96	3,33 (0,22-49,6)	0,38

Tabela 6 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos de IgM e subclasses de IgG contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5 entre os diferentes genótipos avaliados neste estudo

Variável independente	conclusão											
	IgM			IgG1			IgG2		IgG3		IgG4	
	n	OR	p	n	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
Mulheres												
TT	43	Referência		-			-		-		-	
TC	9	1,06 (0,09-12,0)	0,96	-			-		-		-	
CC	4	11,4 (0,39-33,9)	0,16	-			-		-		-	
<i>CD86 +1057G>A</i>												
GG	106	Referência		53	Referência		Referência		Referência		Referência	
GA	47	0,86 (0,39-1,89)	0,71	31	0,82 (0,32-2,05)	0,67	0,41 (0,13-1,33)	0,14	1,08 (0,22-5,31)	0,92	0,66 (0,14-3,09)	0,59
AA	8	0,90 (0,13-6,12)	0,91	5	3,99 (0,39-40,6)	0,24	1,40 (0,17-11,8)	0,76	0,06 (0-53,2)	0,99	0,07 (0-59,0)	0,99
<i>CTLA4 -318C>T</i>												
CC	146	Referência		74	Referência		Referência		Referência		Referência	
CT	25	1,44 (0,52-4,03)	0,48	15	1,51 (0,48-4,76)	0,48	1,90 (0,51-7,04)	0,33	0,87 (0,14-5,41)	0,88	0,57 (0,05-5,41)	0,62
<i>CTLA4 +49A>G</i>												
AA	71	Referência		40	Referência		Referência		Referência		Referência	
AG	82	1,03 (0,48-2,22)	0,93	41	1,19 (0,48-2,92)	0,70	2,54 (0,79-8,09)	0,11	1,39 (0,29-6,56)	0,68	0,60 (0,13-2,78)	0,51
GG	18	1,14 (0,31-4,15)	0,84	8	0,66 (0,13-3,26)	0,61	3,06 (0,57-18,5)	0,22	0,72 (0,05-10,3)	0,81	0,37(0,02-5,15)	0,46
<i>ICOS +1564T>C</i>												
TT	73	Referência		35	Referência		Referência		Referência		Referência	
TC	70	1,26 (0,56-2,82)	0,57	38	0,75 (0,28-2,00)	0,56	1,21 (0,36-4,10)	0,75	1,50 (0,30-7,39)	0,62	0,25 (0,04-1,55)	0,14
CC	27	1,52 (0,53-4,36)	0,44	16	0,61 (0,18-2,15)	0,45	1,85 (0,43-7,90)	0,40	0,74 (0,06-9,02)	0,81	1,07 (0,14-7,87)	0,95

* As lacunas na tabela (-) são devido a impossibilidade de realização do teste devido a limitação do tamanho amostral nestes grupos

Tabela 8 – Regressão logística multivariada comparando a resposta de anticorpos IgM e subclasses de IgG contra a proteína ICB2-5 entre os diferentes modelos genéticos

Variável independente	IgM		IgG1		IgG2		IgG3		conclusão	
									IgG4	
	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
<i>CD86 +1057G>A</i>										
Dominante	0,71 (0,16-3,21)	0,65	0,30 (0,03-3,0)	0,31	0,73 (0,10-5,10)	0,75	-	-	-	-
Recessivo	0,87 (0,43-1,75)	0,69	1,09 (0,44-2,71)	0,85	0,51 (0,17-1,46)	0,21	0,66 (0,16-2,74)	0,56	0,47 (0,10-2,09)	0,32
Heterozigoto	0,79 (0,38-1,65)	0,54	0,86 (0,33-2,21)	0,75	0,42 (0,13-1,33)	0,14	0,97 (0,23-3,97)	0,96	0,69 (0,15-3,16)	0,63
<i>CTLA4 +49A>G</i>										
Dominante	0,73 (0,25-2,12)	0,56	1,80 (0,38-8,54)	0,46	0,60 (0,12-3,10)	0,54	1,02 (0,10-10,0)	0,99	1,40 (0,13-14,8)	0,78
Recessivo	0,88 (0,45-1,75)	0,73	0,91 (0,37-2,23)	0,84	2,20 (0,77-6,30)	0,14	1,59 (0,39-6,4)	0,52	0,68 (0,17-2,71)	0,58
Heterozigoto	0,79 (0,40-1,54)	0,49	1,12 (0,45-2,74)	0,81	1,80 (0,64-5,03)	0,26	1,59 (0,40-6,24)	0,51	0,76 (0,18-3,16)	0,70
<i>ICOS +1564T>C</i>										
Dominante	0,62 (0,25-1,55)	0,31	1,57 (0,48-5,10)	0,45	0,59 (0,17-2,09)	0,42	2,06 (0,23-18,5)	0,52	0,92 (0,15-5,47)	0,93
Recessivo	1,47 (0,73-2,97)	0,28	0,68 (0,26-1,74)	0,42	1,71 (0,58-4,98)	0,33	1,52 (0,34-6,82)	0,58	0,41 (0,09-1,71)	0,22
Heterozigoto	1,13 (0,56-2,27)	0,72	0,91 (0,35-2,33)	0,84	1,20 (0,42-3,42)	0,73	2,07 (0,51-8,39)	0,31	0,32 (0,06-1,73)	0,18

* As lacunas na tabela (-) são devido a impossibilidade de realização do teste devido a limitação do tamanho amostral nestes grupos

4.8 Associação entre a prevalência de anticorpos com os haplótipos dos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*

Devido a proximidade física e o desequilíbrio de ligação entre os SNPs localizados nos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*, foram encontrados 18 haplótipos na população estudada (Anexo II). As análises de associação foram realizadas apenas entre os haplótipos que possuíram frequência acima de 5%. Nestas análises, são gerados *scores* específicos (hap-score), cujo valor permite avaliar, para cada haplótipo, a existência de associação estatisticamente significativa. O efeito de cada haplótipo depende do valor do hap-score: valores positivos indicam que o haplótipo está associado com a produção de anticorpos enquanto que valores negativos possuem significado inverso. A análise da frequência haplotípica entre os respondedores e os não respondedores para as quatro proteínas avaliadas não permitiu associar nenhum haplótipo com a prevalência de anticorpos (Tabela 8). Estas análises não foram realizadas para as subclasses de IgG devido ao reduzido número de respondedores nestes grupos, limitando assim a possibilidade de realização do teste estatístico.

Tabela 8 – Frequências haplotípicas e associação com a prevalência de anticorpos IgG total contra as proteínas PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e ICB2-5.

Haplótipo ^a	MSP-1 ₁₉				DBP				AMA-1				ICB2-5			
	Frequência ^b		hap.score	p	Frequência		hap.score	p	Frequência		hap.score	p	Frequência		hap.score	p
	Pos ^b	Neg ^b			Pos	Neg			Pos	Neg			Pos	Neg		
GTCGT	0,202	0,290	-1,18	0,24	0,212	0,159	0,36	0,72	0,204	0,206	-0,29	0,77	0,192	0,212	-0,85	0,40
GTCAT	0,172	0,071	1,36	0,17	0,148	0,223	-0,53	0,59	0,156	0,157	-0,44	0,66	0,138	0,181	-0,56	0,58
ATCAT	0,120	0,145	0,16	0,87	0,118	0,098	0,51	0,61	0,105	0,172	-0,99	0,32	0,117	0,118	0,03	0,97
GTCAC	0,172	0,126	0,35	0,73	0,121	0,049	0,82	0,41	0,102	0,113	0,05	0,96	0,150	0,066	1,95	0,05
ATCAC	0,102	0,033	1,03	0,30	0,084	0,105	-0,57	0,57	0,099	0,077	0,67	0,50	0,108	0,076	0,90	0,37
GCCAC	0,068	0,031	-0,10	0,92	0,065	0,030	0,29	0,77	0,076	0,020	1,17	0,24	0,060	0,070	-0,36	0,72
GCTAT	0,057	0,030	0,59	0,55	0,061	0,020	0,95	0,34	0,061	0,030	1,13	0,26	0,067	0,045	0,92	0,36

^aA reconstrução dos haplótipos foi realizada com os SNPs na seguinte sequência: *CD28 -372G>A*, *CD28 +17T>C*, *CTLA4 -318C>T*, *CTLA4 +49A>G* e *ICOS +1564T>C*. Estão representados apenas os haplótipos com frequência superior a 5%.

^bPos indica respondedores e Neg indica não respondedores.

4.9 Associação entre os níveis de anticorpos com os haplótipos dos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*

Um modelo de regressão, utilizando a função `haplo.glm`, implementado no pacote `haplo.stat` do programa R v 2.11 foi utilizado, com o objetivo de avaliar a influência dos haplótipos gerados nos níveis de anticorpos. Neste modelo, a variação nos níveis de anticorpos para cada haplótipo em relação a um haplótipo de referência (no caso, o haplótipo mais frequente, GTCGT, de acordo com a sequência *CD28* -372G>A, *CD28* +17T>C, *CTLA4* -318C>T, *CTLA4* +49A>G e *ICOS* +1564T>C) é mensurada, gerando um p específico, que foi ajustado de acordo com a idade, número de episódios prévios de malária e ancestralidade. Não houve associação entre os haplótipos com os níveis de anticorpos IgG total para nenhuma proteína (Figura 36). No entanto, dois haplótipos foram associados com a produção de anticorpos IgG4 contra a ICB2-5. Indivíduos com o haplótipo ATCGT apresentaram redução de 49% nos níveis de anticorpos em comparação aos indivíduos com o haplótipo referência ($p = 0,001$). Já os indivíduos com o haplótipo GTCAC apresentaram aumento de 14,2% nos níveis de anticorpos em relação ao haplótipo referência ($p = 0,03$) (Figura 37).

0.4

0.2

0.0

-0.2

-0.4

"green"

green

MSP-1₁₉

DBP

"gray"

AMA-1

IGF5



H1

H2

H3

H4

H5

H6

H7

H8

H9

Haplotipo

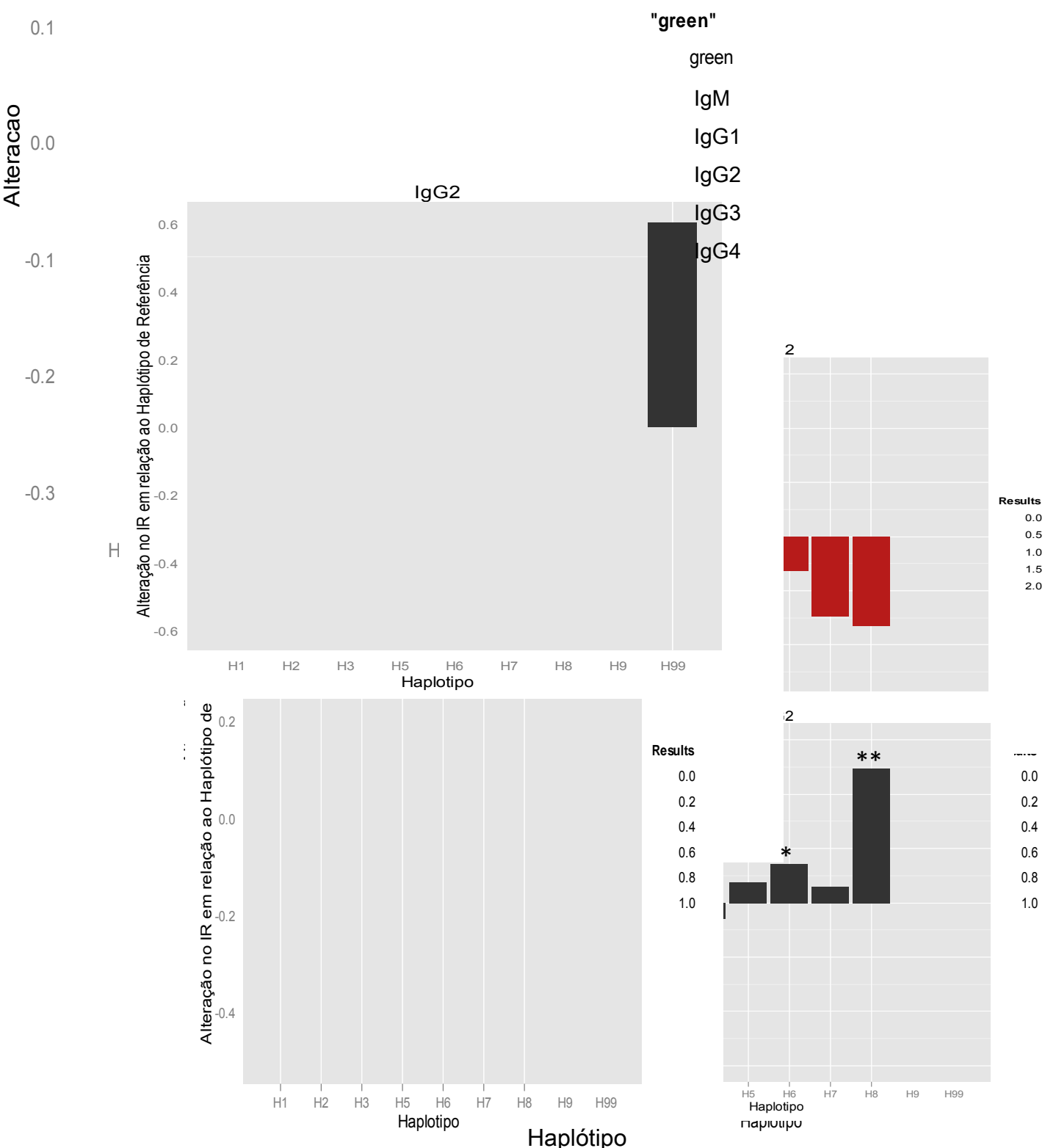


Figura 36 – Efeito dos haplótipos nos níveis de anticorpos IgM e subclasses de IgG contra a proteína ICB2-5. No eixo x estão representados os haplótipos H1 (ATCAC), H2 (ATCAT), H3 (GCCAC), H5 (GCTAT), H6 (GTCAC), H7 (GTCAT) e H8 (ATCGT). No eixo y está indicado a alteração proporcional nos níveis de anticorpos de cada haplótipo comparado ao haplótipo mais frequente (GTCGT). * indica $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,005$.

Discussão

5. Discussão

As principais estratégias utilizadas para o controle da malária estão baseadas no pronto diagnóstico e tratamento, bem como no combate ao vetor. No entanto, constantemente surgem novas cepas do parasito resistentes conforme novas drogas são empregadas, e o combate ao vetor também encontra grandes desafios devido a crescente resistência destes aos inseticidas. Dessa forma, justifica-se a busca pelo desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz contra a malária. A caracterização da resposta imune naturalmente adquirida constitui uma boa ferramenta para a identificação de moléculas que possam ser alvos de uma vacina antimalárica.

O desenvolvimento de uma resposta imune contra as espécies de *Plasmodium* é um processo complexo. Indivíduos vivendo em áreas endêmicas de malária adquirem algum grau de imunidade protetora conforme vão ficando mais velhos. Embora esta imunidade seja parcial, ela é importante em reduzir a mortalidade e os sintomas clínicos da doença (revisto em DOOLAN et al., 2009), e um dos principais objetivos no desenvolvimento de uma vacina é fornecer esta imunidade aos indivíduos mais jovens. Infelizmente, apesar de décadas de investigação, pouco se sabe sobre a maneira como o sistema imune atua diante de infecções pelas espécies de *Plasmodium*. Uma parte do problema é entender porque os indivíduos diferem em suas respostas imunes contra o parasito, e como isto afeta o nível de resistência a doença.

Existem diferentes exemplos de polimorfismos genéticos influenciando na resistência a infecção por *Plasmodium* no homem. As primeiras observações remontam ao ano de 1954, quando se verificou que indivíduos apresentando o traço falciforme eram mais resistentes aos casos mais graves de malária falciparum. Outros polimorfismos no homem que conferem resistência a malária incluem as talassemias, deficiência em glicose-6-fosfato, deficiência em piruvato quinase, ausência do grupo sanguíneo Duffy, entre outros (revisto em ALLISON, 2009). Entretanto, apenas mais recentemente tem se investigado as bases

genéticas que podem modular a resposta imune contra a malária. Inicialmente, os estudos focaram na influência dos alelos do HLA na resposta imune. Stephens e colaboradores (1995) descreveram acentuada resposta de anticorpos em indivíduos tailandeses possuindo o alelo HLA DPB*0501 vacinados com antígenos de esporozoítos de *P. falciparum*. Em ensaios de vacinas em voluntários nos Estados Unidos utilizando a CSP do *P. falciparum*, Nardin e colaboradores (2000) observaram que altos níveis de anticorpos eram obtidos nos indivíduos com os alelos DRB1*0401, *1101 e DQB1*0603, e baixa, ou nenhuma resposta foi evidenciada nos indivíduos com o alelo DRB1*0701. Alelos HLA-DR e -DQ também foram associados com maior ou menor produção de anticorpos contra diferentes proteínas, incluindo a CSP, AMA-1, MSP-1, MSP-3 e MSP-9 (JOHNSON et al., 2004; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; LIMA-JUNIOR et al., 2012; STORTI-MELO et al., 2012). Entretanto, Duah e colaboradores (2009), estudando gêmeos no Gâmbia, demonstraram que a influência da herdabilidade nos níveis de anticorpos pode atingir 48%, e que a maior parte da contribuição genética na resposta imune humoral contra proteínas do *P. falciparum* (AMA-1, MSP-1₁₉, MSP-2 e MSP-3) não é devido ao HLA. Isto nos levou a investigar possíveis associações entre polimorfismos de genes envolvidos na coestimulação com a resposta imune humoral contra proteínas candidatas a vacina para o *P. vivax*.

5.1 Resposta de anticorpos contra proteínas de estágio sanguíneo do *P. vivax*

5.1.1 PvMSP-1₁₉

Nossos resultados em relação a resposta de IgG total contra a PvMSP-1₁₉ demonstraram que a frequência de respondedores entre os indivíduos infectados com *P. vivax* foi de 83,1%. Em indivíduos que haviam sido recentemente infectados no Estado do Pará, Soares e colaboradores (1997) encontraram uma frequência de respondedores para a PvMSP-1₁₉ de 51,4%. O fato de termos

encontrado uma frequência maior de respondedores para esta proteína provavelmente reflete o fato dos indivíduos estarem infectados no momento da coleta. Isto é corroborado por outros estudos na região Amazônica, onde a frequência de respondedores variou de 75 a 95% em indivíduos infectados com *P. vivax* (SOARES et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2003; BARBEDO et al., 2007; RICCIO et al., 2013). Além disso, tem se demonstrado que a frequência de respondedores e os níveis de anticorpos caem rapidamente entre 1 e 4 meses após a infecção por *P. vivax* (SOARES et al., 1997; 1999b)

Com o objetivo de se avaliar o efeito da exposição prévia ao parasito na resposta de anticorpos, nós verificamos a frequência e níveis de anticorpos contra a PvMSP-1₁₉ em relação ao número de episódios prévios de malária, e observamos que ambos aumentaram significativamente após o primeiro episódio de malária, mas não se alteraram após episódios subsequentes. Estudos anteriores em duas localidades diferentes (proximidades de Belém, no Estado do Pará e Cotijuba, no Mato Grosso) também encontraram associação entre a prevalência de respondedores contra a MSP-1₁₉ e o número de episódios prévios, com os menores valores entre os primo-infectados (SOARES et al., 1997; 1999a; 1999b). Tem sido sugerido que a menor proporção de respondedores dentro deste grupo pode estar relacionado a um atraso na troca de anticorpos de IgM para IgG, uma vez que nos primo-infectados a frequência de indivíduos com anticorpos IgM foi maior comparado ao grupo que já teve malária (SOARES et al., 1999a). Além disso, de dez indivíduos primo-infectados que não apresentaram IgG contra a PvMSP-1₁₉, nove possuíam anticorpos IgM específicos (RODRIGUES et al., 2003). No entanto, uma alta frequência de primo-infectados com anticorpos IgG contra a PvMSP-1₁₉ foi observada neste estudo (70%), confirmando a alta imunogenicidade já demonstrada anteriormente (SOARES et al., 1997; RODRIGUES et al., 2003; BARBEDO et al., 2007). Esta elevada imunogenicidade pode estar relacionada ao baixo polimorfismo encontrado nesta região da proteína MSP-1 (PUTAPORNTIP et al., 2002; DIAS et al., 2012) e também pelo fato da MSP-1₁₉ permanecer ancorada a superfície do parasito

durante todo o processo de invasão, aumentando assim sua exposição ao sistema imune (BLACKMAN et al., 1994).

5.1.2 PvAMA-1

O primeiro estudo avaliando a resposta imune humoral contra a PvAMA-1 na população brasileira, em indivíduos infectados no Estado do Pará, encontrou uma frequência de respondedores de 85% (RODRIGUES et al., 2005). Outros três estudos realizados na região Amazônica brasileira encontraram uma frequência de respondedores variando de aproximadamente 62 a 73% (BARBEDO et al., 2007; MÚFALO et al., 2008; BUENO et al., 2011), confirmando assim que esta proteína é altamente imunogênica em infecções naturais por *P. vivax*. Nossos resultados foram semelhantes aos destes estudos. A frequência de respondedores contra a PvAMA-1 em Goianésia do Pará foi de 67%.

Concordando com os resultados de Rodrigues e colaboradores (2005), não houve associação entre a frequência de respondedores com a idade em nosso estudo. Morais e colaboradores (2006), avaliando a resposta de anticorpos contra a PvAMA-1 em indivíduos expostos de áreas endêmicas com diferentes níveis de transmissão, encontraram maiores níveis de anticorpos e frequência de respondedores nos garimpeiros de Apiacás, no Estado do Mato Grosso, área de alta transmissão de malária. No entanto, ao compararem indivíduos expostos de outras áreas, não encontraram diferenças significativas entre a resposta de indivíduos constantemente expostos de Terra Nova do Norte/ MT, com a de indivíduos residentes em Belém do Pará, cujo contato com o parasito foi curto e esporádico. Isto está de acordo com o fato de não termos encontrado associação entre a resposta humoral contra a PvAMA-1 e o tempo de residência dos pacientes na área endêmica. Por outro lado, quando avaliamos a resposta imune humoral contra a PvAMA-1 de acordo com o número de episódios prévios de malária, nós encontramos que tanto a frequência de respondedores quanto os níveis de anticorpos foram menores entre os primo infectados, confirmando estudos

anteriores que encontraram a mesma associação (RODRIGUES et al., 2005; BARBEDO et al., 2007).

5.1.3 PvDBP

Estudos avaliando a resposta imune contra a PvDBP em áreas de alta endemicidade demonstraram que grande parte dos indivíduos possuem anticorpos específicos, e que esta aumenta com a exposição ao parasito e com a idade (COLE-TOBIAN et al., 2002; VAN-BUSKIRK et al., 2004; CHOOTONG et al., 2010). Também tem sido demonstrado que anticorpos anti-PvDBP são capazes de bloquear a interação do ligante com o receptor na superfície dos eritrócitos, e são associados com redução no risco de infecção (KING et al., 2008). Geralmente, estes anticorpos não são protetores nas primeiras infecções, sendo necessária repetida exposição para que se desenvolva imunidade cepa-transcendente (COLE-TOBIAN et al., 2002). Já em áreas de transmissão instável, como a Amazônia brasileira, a frequência de respondedores foi associada com a exposição, medida pelo número de episódios prévios (TRAN et al., 2005; BARBEDO et al., 2007) ou pelo tempo de residência na área endêmica (TRAN et al., 2005; SOUZA-SILVA et al., 2010). Ainda, outro estudo, em um assentamento no Estado do Amazonas, associou a frequência de respondedores com a idade (KANO et al., 2012). No entanto, a frequência de respondedores tem sido bastante variável, de 18% (SOUZA-SILVA et al., 2010) a 65% (CERÁVOLO et al., 2005). Souza-Neiras e colaboradores (2010), avaliaram a resposta de IgG total em indivíduos infectados contra a PvMSP-1 (Pv200L), a PvAMA-1 e a PvDBP, e encontraram altas frequências de respondedores para as duas primeiras, enquanto que aproximadamente metade das amostras não continham anticorpos contra a PvDBP. Em nosso estudo, nós encontramos uma frequência de respondedores de 75,5%, maior do que a anteriormente mencionada em outras áreas da Amazônia brasileira. Este resultado pode ser decorrente do fato, de que, em nosso estudo, nós avaliamos a resposta de anticorpos contra a proteína PvDBP_{II}, correspondente apenas a região II da PvDBP, diferente da proteína utilizada nos outros estudos na

população brasileira, que abrangem os domínios II a IV (CERÁVOLO et al., 2005; BARBEDO et al., 2007; SOUZA-SILVA et al., 2010; KANO et al., 2012). A região II compreende o ligante funcional da proteína, e tem sido considerado o principal alvo de anticorpos naturalmente adquiridos. Esta região é polimórfica, provavelmente como um mecanismo para evasão do sistema imune (XAINLI et al., 2000; NTUMNGIA et al., 2012). Outra possibilidade para a alta frequência de respondedores encontrada em nosso estudo pode ser devido a baixa variabilidade de cepas circulantes em Goianésia do Pará, hipótese esta que precisa ser investigada. No entanto, o fato de que, em nosso estudo, os indivíduos apresentaram um aumento na resposta de anticorpos após um único episódio de malária, e esta não se alterou após episódios subsequentes reforçam esta ideia.

5.1.4 ICB2-5

Estudos anteriores que compararam a resposta contra proteínas recombinantes contendo as porções N- e C-terminal da PvMSP-1 mostraram que a porção C-terminal da molécula foi a mais imunogênica (SOARES et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2006). Em nosso estudo, tais resultados se confirmaram, uma vez que a frequência de respondedores foi de 83,1% para a MSP-1₁₉ contra 50,6% da ICB2-5. De fato, a frequência de respondedores contra a ICB2-5 tem sido de aproximadamente 35% em indivíduos expostos de diferentes localidades na Amazônia brasileira (DEL PORTILLO et al., 1992; SOARES et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2006; VERSIANI et al., 2012). No entanto, quando a frequência de respondedores foi avaliada apenas em sujeitos infectados com *P. vivax*, ela foi de aproximadamente 64% em indivíduos do Estado do Pará, e aumentou 2,5 vezes em indivíduos PCR positivos em relação a indivíduos não infectados (VERSIANI et al., 2012). Em relação a aquisição de anticorpos anti-ICB2-5 quanto a exposição ao parasito, resultados diferentes tem sido relatados. Enquanto a frequência de respondedores não foi associada com o tempo de residência, nem com o número de malária prévias em alguns estudos (DEL PORTILLO et al., 1992; SOARES et al., 1997; SOARES et al., 1999a), ela

aumentou de acordo com a idade e o tempo de residência na área endêmica em outros (SOARES et al., 1999a; NOGUEIRA et al., 2006). Em nosso estudo, constatamos que a frequência de respondedores foi significativamente maior entre os indivíduos com mais de 40 anos comparados aqueles com menos de 20 anos.

Com os resultados de IgG total contra a ICB2-5, nós avaliamos a prevalência e magnitude da resposta de cada subclasse de IgG de 90 indivíduos positivos para IgG total. Além disso, investigamos a resposta de IgM de 173 indivíduos. Em nosso estudo, nós encontramos uma baixa frequência de respondedores para IgM, de 28,3%. Este resultado é diferente do encontrado por Soares e colaboradores (1999a), cuja frequência foi de 60% entre os indivíduos infectados, independente se estes haviam tido variáveis números de episódios prévios de malária. Nós avaliamos se os indivíduos que não responderam para IgG total contra a ICB2-5 apresentavam IgM mais frequentemente do que para os que responderam, o que poderia indicar um atraso na troca de IgM para IgG, fato que tem sido sugerido para a MSP-1₁₉ (SOARES et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2003). No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Em relação as subclasses de IgG, verificou-se que para a ICB2-5, IgG1 foi a subclasse predominante, tanto em termos de frequência como em magnitude. Já as subclasses IgG3 e IgG4 foram encontradas em menores proporções. Curiosamente, trabalhos anteriores encontraram predomínio da subclasse IgG3 (SOARES et al., 1999a; NOGUEIRA et al., 2006; VERSIANI et al., 2012). Apesar de ainda não haver consenso sobre o papel das subclasses na proteção clínica, tem sido sugerido que apenas as subclasses citofílicas, IgG1 e IgG3, são protetoras (BOUHAROUN-TAYOUN e DRUILHE, 1992). Dois estudos longitudinais, um em Portuchuello, nas proximidades de Porto Velho, e outro em uma comunidade do Rio Pardo, no Estado do Amazonas, observaram que anticorpos contra a ICB2-5 foram associados com proteção clínica a malária causada pelo *P. vivax* e que anticorpos IgG3 foram detectados em todos os indivíduos assintomáticos, enquanto que a maioria dos pacientes sintomáticos não apresentavam IgG3 (NOGUEIRA et al., 2006; VERSIANI et al., 2012). Caso tais resultados possam ser extrapolados para Goianésia do Pará, localidade de nosso

estudo, o fato de termos realizado coleta passiva de pacientes que apresentavam sintomas poderia explicar a baixa frequência de respondedores para a IgG3. Alguns estudos também demonstraram que a subclasse IgG2 pode estar associada a proteção. Deloron e colaboradores (1997) mostraram uma associação entre altos níveis de IgG2 e baixo risco de adquirir infecção pelo *P. falciparum*. Esta associação pode estar ligada a polimorfismos no gene do receptor FcγRIIA. O polimorfismo H131 permite a ligação da fração F_c de IgG2 ao receptor, conferindo assim capacidade citofílica a anticorpos IgG2 (WARMERDAM et al., 1991). Leoratti e colaboradores (2008) encontraram maiores níveis de IgG2 em indivíduos assintomáticos apresentando o polimorfismo H131. Apesar do desenho realizado em nosso estudo não permitir associar a prevalência e níveis de anticorpos com proteção clínica, nós notamos maiores níveis de IgG2 em indivíduos que relataram ter tido menos casos de malária.

5.2 Polimorfismos e a resposta de anticorpos

Frequentemente são observadas associações entre polimorfismos e determinados traços que não são confirmados em outros estudos, devido, principalmente, à composição étnica da população estudada. Diferenças nas frequências alélicas entre grupos étnicos distintos podem influenciar as conclusões de estudos de associação. Neste trabalho, tentou se evitar esses efeitos ao caracterizar a população em relação a ancestralidade com o auxílio de AIMs, conforme discutido no artigo apresentado no Anexo II. Dessa forma, durante as análises estatísticas que buscavam associações entre a resposta imune com os polimorfismos estudados, os valores obtidos de ancestralidade foram empregados como covariáveis.

Nós encontramos associação do SNP *CD28 -372G>A* com a resposta de anticorpos. Uma associação negativa foi encontrada com o genótipo *GA* (OR = 0,32) e a prevalência de anticorpos contra a PvDBP. Além disso, indivíduos possuindo o alelo *A* apresentaram 4 vezes mais chance de possuírem anticorpos IgM contra a ICB2-5. Este SNP tem sido pouco avaliado em estudos de

associação, e dois estudos deste SNP com esclerose múltipla (TEUSCH et al., 2004) e com pênfigo foliáceo (DALLA-COSTA et al., 2010) não encontraram associação. Em modelos murinos, camundongos *knockout* para o gene *CD28* produziram menos anticorpos IgG contra proteínas do *P. chabaudi*. Além disso, IgM foi o anticorpo predominante nestes camundongos, sugerindo assim um importante papel desta molécula na troca de anticorpos (RUMMEL et al., 2004). Assim, nós levantamos a hipótese que o alelo *A* para o SNP *CD28 -372G>A* possa ou diminuir a produção da molécula CD28, ou estar em desequilíbrio de ligação com outro alelo funcional. No entanto, apesar deste SNP se localizar na região promotora do gene, com possíveis implicações funcionais, um estudo realizado por Almeida e Petzl-Erler (2013) não encontrou qualquer efeito deste SNP na expressão do gene.

Outro SNP que foi associado com diferenças significativas na prevalência de respondedores contra a DBP foi o *ICOS +1564T>C*. Indivíduos possuindo o alelo *C* apresentaram um OR de 0,36 de chance de apresentar anticorpos comparados aos indivíduos *TT*. Não há estudos anteriores avaliando a influência desta proteína na malária. No entanto, dois estudos já demonstraram associação deste SNP com pré-eclâmpsia (PENDELOSKI et al., 2011) e alterações em transplantados renal (HAIMILA et al., 2009). O fato desta molécula estar relacionada a produção de interleucinas tais como a IL-4 e a IL-10, bem como na formação de centros germinativos e células B de memória (SIMPSON et al., 2010) poderia justificar o possível envolvimento do SNP *ICOS +1564T>C* na alteração da produção de anticorpos relatada neste estudo. Camundongos *knockout* para o gene *ICOS* produziram níveis reduzidos de algumas subclasses de IgG comparados a camundongos selvagens (MARK et al., 2013).

Um estudo realizado por nosso grupo no município de Macapá avaliou diferenças na frequência dos SNPs *CD40 - 1C>T*, *CD40L - 726T>C* e *BLYS - 871C>T* entre indivíduos infectados com *P. vivax* e indivíduos controle e nenhuma associação foi encontrada (CAPOBIANCO et al., 2013). Além disso, um subgrupo de indivíduos cuja sorologia para algumas proteínas estava disponível foi avaliado em relação a frequência de respondedores diante destes

polimorfismos e novamente nenhuma associação foi encontrada. No entanto, é importante ressaltar que o tamanho amostral deste subgrupo era pequeno, composto por aproximadamente 50 amostras, dificultando assim o estabelecimento de qualquer relação estatística. No presente trabalho, nós optamos por avaliar estes mesmos polimorfismos e associação foi encontrada com os SNPs *CD40 -1C>T* e *CD40L -726T>C*. Indivíduos apresentando o alelo *T* para o SNP *CD40L -726T>C* apresentou aproximadamente 3 vezes mais chance de possuir anticorpos contra a DBP comparado aos indivíduos possuindo apenas o alelo *C*. Em relação ao SNP *CD40 -1C>T*, indivíduos com o genótipo *CT* apresentaram menores níveis de anticorpos contra a MSP-1₁₉ em relação aos outros genótipos. Este SNP se localiza na região promotora, e já foi relatado que o alelo *T* é responsável por uma redução de 15 a 30% na expressão de CD40 (JACOBSON et al., 2005). De fato, esta via coestimulatória parece estar envolvida na resposta imune humoral. A produção de anticorpos contra proteínas recombinantes de *P. falciparum* por PBMCs de indivíduos residentes em áreas de malária holo- ou mesoendêmicas foi avaliada *in vitro*, e observou-se que a proporção de respondedores contra algumas proteínas, incluindo a MSP-1₁₉ foi aumentada quando a coestimulação com sCD40L foi fornecida (GARRAUD et al., 2002). O SNP *CD40 -1C>T* também vem sendo investigado em associações com malária grave por *P. falciparum*, e resultados diferentes são observados de acordo com o fenótipo e/ ou a população estudada. Enquanto o alelo *C* foi associado com proteção a malária cerebral e anemia severa em Gâmbia (SABET et al., 2002), mulheres com o genótipo *CC* foram associadas com síndrome da angústia respiratória aguda na Tanzânia (MANJURANO et al., 2012).

Indivíduos apresentando o genótipo *AA* para o SNP *CD86 +1057* apresentaram maiores níveis de IgG contra a MSP-1₁₉, em comparação com os outros genótipos. Este SNP foi associado a diferentes tipos de câncer na população asiática (PAN et al., 2010; WANG et al., 2011; XIANG et al., 2012) e com pênfigo foliáceo na população brasileira (DALLA-COSTA et al., 2010). Em modelos murinos de malária, CD86 parece estar envolvido na diferenciação da resposta para Th2. O bloqueio desta molécula inibiu a produção de IL-4 e foi

associado com diminuição da produção de IgG1 (TAYLOR-ROBINSON e SMITH, 1999). Dessa forma, caso os indivíduos com o genótipo *AA* apresentem aumento na expressão da molécula durante a infecção, isto poderia justificar a maior produção de anticorpos IgG contra a MSP-1₁₉ encontrada neste estudo.

O haplótipo representa uma situação na qual uma determinada combinação de alelos se encontra numa frequência diferente da esperada caso estes alelos estivessem associados aleatoriamente e em equilíbrio. No presente estudo, houve desequilíbrio de ligação absoluto ($D' = 1$) apenas entre os SNPs *CD28 -372G>A* e *CD28 +17T>C* e entre os SNPs *CD28 -372G>A* e *CTLA4 -318C>T* e variou de entre os demais SNPs, conforme demonstrado no artigo apresentado no Anexo II. Tal fato nos levou a avaliar a associação entre os haplótipos com a resposta imune e as únicas associações estatisticamente significantes encontradas se referem a produção da subclasse IgG4 contra a proteína ICB2-5. O haplótipo ATCGT foi associado com redução de 49% na produção de IgG4 comparado ao haplótipo mais frequente (GTCGT), enquanto que o haplótipo GTCAC foi associado com um aumento de aproximadamente 14% nos níveis de IgG4. Curiosamente, um estudo conduzido por Duah e colaboradores (2009) avaliou a influência genética na aquisição de isotipos e subclasses de anticorpos contra algumas proteínas de estágio sanguíneo do *P. falciparum*, e estes autores concluíram que o componente genético influencia, principalmente, os níveis de anticorpos IgG4. Ao excluirmos o papel de genes HLA como responsáveis por esta influência genética, os autores levantaram hipóteses de que polimorfismos na região cromossômica 5q31–q33 possam ser os responsáveis por esta variação, uma vez que os genes das interleucinas responsáveis pela produção de IgG4, tais como IL-4 e IL-13 se localizam nesta região. Nossos resultados não excluem esta possibilidade, mas também apontam sobre a região cromossômica 2q33, que contem os genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* como um importante componente da regulação de IgG4 contra proteínas de estágio sanguíneo do *Plasmodium*.

5.3 Considerações finais

Um aspecto importante deste trabalho refere-se às características étnicas de nossa população. Os indivíduos participantes deste estudo apresentaram uma esperada composição genética característicos de uma origem tri-híbrida (africana, ameríndia e europeia). Devido ao fato da frequência de determinados alelos variar entre populações continentais, é importante considerar a estruturação genética em estudos de associação em populações miscigenadas (FOULKES, 2009). Aqui, nós empregamos 48 AIMs previamente padronizados (SANTOS et al., 2010) com o objetivo de evitarmos associações espúrias. O artigo apresentado no Anexo II mostra o impacto da miscigenação da população brasileira na distribuição dos polimorfismos avaliados neste estudo. Associação significativa foi encontrada com os SNPs *ICOS +1564T>C*, *CD40L -726T>C* e *CD86 +1057G>A* e ancestralidade genômica.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de associação genética envolvendo polimorfismos em genes coestimulatórios com a resposta imune humoral contra o *P. vivax*. Vários genes que apresentaram associação na nossa população já tinham sido estudados em outras populações, principalmente com doenças autoimunes e câncer. É importante ressaltar que apesar de alguns polimorfismos terem sido associados como resposta imune contra o *P. vivax*, nenhum deles foi associados com a parasitemia. Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado a capacidade de anticorpos contra proteínas do parasito em inibir o desenvolvimento do parasito, ainda não está claro a associação de anticorpos com a parasitemia em infecções naturais (revisto em MUELLER et al., 2013). Nossos resultados sugerem novas investigações sobre as possíveis implicações funcionais dos polimorfismos no desenvolvimento da resposta imune, mais especificamente daqueles em que associações significativas foram encontradas.

Conclusões

6. Conclusões

1. A resposta imune humoral contra as proteínas de estágio sanguíneo do *P. vivax* foram associados com os polimorfismos de genes coestimulatórios:
a) A frequência de respondedores para IgG total contra a PvDBP foi associada com polimorfismos nos genes *CD40L*, *CD28* e *ICOS*; b) Os níveis de anticorpos de IgG total contra a PvMSP-1₁₉ foram associados com polimorfismos nos genes *CD40* e *CD86*; c) A frequência de respondedores para IgM contra a ICB2-5 foi associada com o SNP no gene *CD28*; d) Os níveis de IgG4 contra a ICB2-5 foi associada com haplótipos entre os polimorfismos dos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*.
2. As frequências dos SNPs *ICOS +1564T>C*, *CD40L -726T>C* e *CD86 +1057G>A* sofrem influência da ancestralidade genômica.
3. Os polimorfismos avaliados neste estudo não foram associados com a parasitemia por *P. vivax*.
4. A frequência de respondedores para IgG total contra a PvMSP-1₁₉, PvDBP, PvAMA-1 e IgG2 contra a ICB2-5 foi associada com o número de episódios prévios de malária. A frequência de respondedores para IgG total contra a ICB2-5 foi associada com a idade.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, K.; JONES, D. E.; DALY, A. K.; JAMES, O. F.; VAIDYA, B.; PEARCE, S.; BASSENDINE, M. F. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 538-541, 2000.
- AHMED, S.; IHARA, K.; KANEMITSU, S.; NAKASHIMA, H.; OTSUKA, T.; TSUZAKA, K.; TAKEUCHI, T.; HARA, T. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n. 6, p. 662-667, 2001.
- AKBARI, O.; FREEMAN, G. J.; MEYER, E. H.; GREENFIELD, E. A.; CHANG, T. T.; SHARPE, A. H.; BERRY, G.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. **Nature Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1024-1032, 2002.
- ALECRIM, M. G.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67-68, 1999.
- ALLISON, A. C. Genetic control of resistance to human malaria. **Current Opinions in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 499-505, 2009.
- ALVES, F. P.; DURLACHER, R. R.; MENEZES, M. J.; KRIEGER, H.; SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 641-648, 2002.
- AMANTE, F. H.; STANLEY, A. C.; RANDALL, L. M.; ZHOU, Y.; HAQUE, A.; MCSWEENEY, K.; WATERS, A. P.; JANSE, C. J.; GOOD, M. F.; HILL, G. R.; ENGWERDA, C. R. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 548-559, 2007.

AMARATUNGA, C.; LOPERA-MESA, T. M.; BRITTAIN, N. J.; CHOLERA, R.; ARIE, T.; FUJIOKA, H.; KEEFER, J. R.; FAIRHURST, R. M. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. **PLoS One**, v. 6, n. 4, e14798, 2011.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

AMYES, E.; MCMICHAEL, A. J.; CALLAN, M. F. Human CD4 + T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5765-5773, 2005.

ANDRADE, A. L. S. S.; MARTELLI, C. M. T.; OLIVEIRA, R. M.; ARIAS, J. R.; ZICKER, F.; PANG, L. High prevalence of asymptomatic malaria in Gold Mining areas in Brazil. **Clinical and Infectious Disease**, v. 20, n. 2, 475, 1995.

ANJOS, S.; NGUYEN, A.; OUNISSI-BENKALHA, H.; TESSIER, M. C.; POLYCHRONAKOS, C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46478-46486, 2002.

ARÉVALO-HERRERA, M.; SOLARTE, Y.; ZAMORA, F.; MENDEZ, F.; YASNOT, M. F.; ROCHA, L.; LONG, C.; MILLER, L. H.; HERRERA, S. *Plasmodium vivax*: transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, Sup 5, p. 38-43, 2005.

ARUFFO, A.; SEED, B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 23, p. 8573-8577, 1987.

AVERY, D. T.; KALLED, S. L.; ELLYARD, J. I.; AMBROSE, C.; BIXLER, S. A.; THIEN, M.; BRINK, R.; MACKAY, F.; HODGKIN, P. D.; TANGYE, S. G. BAFF selectively enhances the survival of plasma blasts generated from human memory B cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 2, p. 286-297, 2003.

AYALA, F. J.; ESCALANTE, A. A.; RICH, S. M. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. **Parasitologia**, v. 41, n. 1-3, p. 55–68, 1999.

BADELL, E.; OEUVRAY, C.; MORENO, A.; SOE, S.; VAN ROOIJEN, N.; BOUZIDI, A.; DRUILHE, P. Human malaria in immunocompromised mice: an in vivo model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 11, p. 1653-1660, 2000.

BAIRD, J. K.; JONES, T. R.; DANUDIRGO, E. W.; ANNIS, B. A.; BANGS, M. J.; BASRI, H.; PURNOMO, MASBAR, S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 1, p. 65-76, 1991.

BAIRD, J.K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**, v. 11, n. 3, p. 105-111, 1995.

BALZANO, C.; BUONAVISTA, N.; ROUVIER, E.; GOLSTEIN, P. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. **International Journal of Cancer Supplement**, v. 7, p. 28-32, 1992.

BAN, Y.; TOZAKI, T.; TANIYAMA, M.; TOMITA, M.; BAN, Y. Association of a C/T single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene with Graves' disease in Japanese. **Thyroid**, v. 16, n. 5, p. 443-446, 2006.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BARBEDO, M. B. **Expressão do antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2007.

BARBEDO, M. B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M. C.; CUNHA, M. G.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three

asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 335-339, 2007.

BARCELAR, R. C. Brazil's contribution to tropical medicine and malaria. **Proceedings of the Seventh International Congresses on Tropical Medicine and Malaria**, Rio de Janeiro, ed. Gráfica Olímpica, 1963.

BARGIERI, D.; LAGAL, V.; TARDIEUX, I.; MÉNARD, R. Host cell invasion by apicomplexans: what do we know? **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 131-135, 2012.

BELTRAME, M. H.; PINCERATI, M. R.; DALLA-COSTA, R.; WASSEM, R.; KÖHLER, K. F.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. CD80 and CD86 polymorphisms in populations of various ancestries: 5 new CD80 promoter alleles. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 111-117, 2012.

BENMANSOUR, J.; STAYOUSSEF, M.; AL-JENAIDI, F. A.; RAJAB, M. H.; RAYANA, C. B.; SAID, H. B.; MAHJOUR, T.; ALMAWI, W. Y. Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 1473-1477, 2010.

BHARTI, A. R.; CHUQUIYAURI, R.; BROUWER, K. C.; STANCIL, J.; LIN, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; VINETZ, J. M. Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 610-616, 2006.

BLACKMAN, M. J.; HEIDRICH, H. G.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J. S.; HOLDER, A. A. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 1, p. 379-382, 1990.

BLACKMAN, M. J.; SCOTT-FINNIGAN, T. J.; SHAI, S.; HOLDER, A. A. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 1, p. 389-393, 1994.

BLANCO-KELLY, F.; MATESANZ, F.; ALCINA, A.; TERUEL, M.; DÍAZ-GALLO, L. M.; GÓMEZ-GARCÍA, M.; LÓPEZ-NEVOT, M. A.; RODRIGO, L.; NIETO, A.; CARDEÑA, C.; ALCAIN, G.; DÍAZ-RUBIO, M.; DE LA CONCHA, E. G.; FERNANDEZ, O.; ARROYO, R.; MARTÍN, J.; URCELAY, E. CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. **PLoS One**, v. 5, n. 7, e11520, 2010.

BLOLAND, P. B.; BORIGA, D. A.; RUEBUSH, T. K.; McCORMICK, J. B.; ROBERTS, J. M.; OLOO, A. J.; HAWLEY, W.; LAL, A.; NAHLEN, B.; CAMPBELL, C. C. Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission II. Descriptive epidemiology of malaria infection and disease among children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 641-648, 1999.

BORRIELLO, F.; SETHNA, M. P.; BOYD, S. D.; SCHWEITZER, A. N.; TIVOL, E. A.; JACOBY, D.; STROM, T. B.; SIMPSON, E. M.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal centre formation. **Immunity**, v. 6, n. 3, p. 303-313, 1997.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; DRUILHE, P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, Sup 3, p. 229-234, 1992.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 409-418, 1995.

BRAGA, E. M.; BARROS, R. M.; REIS, T. A.; FONTES, C. J.; MORAIS, C. G.; MARTINS, M. S.; KRETTLI, A. U. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 461-466, 2002.

BRANCH, O.; CASAPIA, W. M.; GAMBOA, D. V.; HERNANDEZ, J. N.; ALAVA, F. F.; RONCAL, N.; ALVAREZ, E.; PEREZ, E. J.; GOTUZZO, E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. **Malaria Journal**, v. 4, n. 27, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico em Malária**. Brasília, Editora MS, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) – Malária**. Resumo epidemiológico de malária no Brasil. 2013. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria>. Acesso em 27 dez. 2013.

BROWN, J. A.; TITUS, R. G.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania* major infection by down-regulating the Th2 response. **The Journal of Infectious Disease**, v. 174, n. 6, p. 1303-1308, 1996.

BRUNET, J. F.; DENIZOT, F.; LUCIANI, M. F.; ROUX-DOSSETO, M.; SUZAN, M.; MATTEI, M. G.; GOLSTEIN, P. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 267-270, 1987.

BUENO, L. L.; LOBO, F. P.; MORAIS, C. G.; MOURÃO, L. C.; DE ÁVILA, R. A.; SOARES, I. S.; FONTES, C. J.; LACERDA, M. V.; CHAVEZ OLÓRTEGUI, C.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T.; BRAGA, E. M. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). **PLoS One**, v. 6, n. 6, e21289, 2011.

BUONO, C.; PANG, H.; UCHIDA, Y.; LIBBY, P.; SHARPE, A. H.; LICHTMAN, A. H. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 109, n. 16, p. 2009-2015, 2004.

BURDIN, N.; VAN KOOTEN, C.; GALIBERT, L.; ABRAMS, J. S.; WIJDENES, J.; BANCHEREAU, J.; ROUSSET, F. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 6, p. 2533-2544, 1995.

CAPOBIANCO, M. P.; CASSIANO, G. C.; FURINI, A. A.; STORTI-MELO, L. M.; PAVARINO, E. C.; GALBIATTI, A. L.; FRAGA, V. D.; CONCEIÇÃO, L. M.; COUTO, V. S.; COUTO, A. A.; MACHADO, R. L. No evidence for association of the CD40, CD40L and BLYS polymorphisms, B-cell co-stimulatory molecules, with Brazilian endemic *Plasmodium vivax* malaria.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 107, n. 6, p. 377-383, 2013.

CARDENA, M. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; SANTOS, S.; MANSUR, A. J.; PEREIRA, A. C.; FRIDMAN, C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e62005, 2013.

CARRENO, B. M.; BENNETT, F.; CHAU, T. A.; LING, V.; LUXENBERG, D.; JUSSIF, J.; BAROJA, M. L.; MADRENAS, J. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1352-1356, 2000.

CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 564-594, 2002.

CARTER, R.; MENDIS, K. Perspective measuring malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 187-188, 2006.

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. **Malaria Journal**, v. 11, n. 430, 2012.

CASTELLI, L.; COMI, C.; CHIOCCHETTI, A.; NICOLA, S.; MESTURINI, R.; GIORDANO, M.; D'ALFONSO, S.; CERUTTI, E.; GALIMBERTI, D.; FENOGLIO, C.; TESSER, F.; YAGI, J.; ROJO, J. M.; PERLA, F.; LEONE, M.; SCARPINI, E.; MONACO, F.; DIANZANI, U. ICOS gene haplotypes correlate with IL10 secretion and multiple sclerosis evolution. **Journal of Neuroimmunology**, v. 186, n. 1-2, p. 193-198, 2007.

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; VAN KOOTEN, C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1263-1272, 1994.

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? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 10, p. 1042-1044, 2007.

CAVASINI, M. T. V.; RIBEIRO, W. L.; KAWAMOTO, F.; FERREIRA, M. U. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia Western Brazilian Amazon? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v. 33, n. 5, p. 489-492, 2000.

CELLA, M.; SCHEIDEGGER, D.; PALMER-LEHMANN, K.; LANE, P.; LANZAVECCHIA, A.; ALBER, G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 747-752, 1996.

CERÁVOLO, I. P.; BRUÑA-ROMERO, O.; BRAGA, E. M.; FONTES, C. J.; BRITO, C. F.; SOUZA, J. M.; KRETTLI, A. U.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 675-681, 2005.

CERÁVOLO, I. P.; SOUZA-SILVA, F. A.; FONTES, C. J.; BRAGA, E. M.; MADUREIRA, A. P.; KRETTLI, A. U.; SOUZA, J. M.; BRITO, C. F.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, n. 3, p. 270-278, 2008.

CERUTTI-JUNIOR, C. **Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo**. 2007. 228 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CHANG, W. W.; ZHANG, L.; YAO, Y. S.; SU, H. Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 9, p. 9159-9165, 2012.

CHAPPEL, J. A.; HOLDER, A. A. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognise the first growth factor-like

domain of merozoite surface protein-1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 60, n. 2, p. 303-311, 1993.

CHAPPEL, J. A.; HOLLINGDALE, M. R.; KANG, A. S. IgG(4) Pf NPNA-1 a human anti-*Plasmodium falciparum* sporozoite monoclonal antibody cloned from a protected individual inhibits parasite invasion of hepatocytes. **Human Antibodies**, v. 13, n. 3, p. 91-96, 2004.

CHATZIGEORGIOU, A.; LYBERI, M.; CHATZILYMPERIS, G.; NEZOS, A.; KAMPER, E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. **Biofactors**, v. 35, n. 6, p. 474-483, 2009.

CHEN, X.; LI, H.; QIAO, Y.; YU, D.; GUO, H.; TAN, W.; LIN, D. Association of CD28 gene polymorphism with cervical cancer risk in a Chinese population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 38, n. 1, p. 51-54, 2011.

CHISTIYAKOV, D. A.; SAVOST'ANOV, K. V.; TURAKULOV, R. I.; EFREMOV, I. A.; DEMUROV, L. M. Genetic analysis and functional evaluation of the C/T(-318) and A/G(-1661) polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients affected with Graves' disease. **Clinical Immunology**, v. 118, n. 2-3, p. 233-242, 2006.

CHOOTONG, P.; NTUMNGIA, F. B.; VANBUSKIRK, K. M.; XAINLI, J.; COLE-TOBIAN, J. L.; CAMPBELL, C. O.; FRASER, T. S.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1089-1095, 2010.

CHRISTOFOLINI, D. M.; CAVALHEIRO, C. M.; TELES, J. S.; LERNER, T. G.; BRANDES, A.; BIANCO, B.; BARBOSA, C. P. Promoter -817C>T variant of B lymphocyte stimulator gene (BLyS) and susceptibility to endometriosis-related infertility and idiopathic infertility in Brazilian population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 6, p. 628-631, 2011.

CLARK, E. A.; LEDBETTER, J. A. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 12, p. 4494-4498, 1986.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, p. 733-737, 1961.

COLE-TOBIAN, J. L.; CORTÉS, A.; BAISOR, M.; KASTENS, W.; XAINLI, J.; BOCKARIE, M.; ADAMS, J. H.; KING, C. L. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the duffy binding protein. **The Journal of Infectious Disease**, v. 186, n. 4, p. 531-539, 2002.

COLLINS, C. E.; GAVIN, A. L.; MIGONE, T. S.; HILBERT, D. M.; NEMAZEE, D.; STOHL, W. B lymphocyte stimulator (BLyS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BLyS mRNA levels than with plasma BLyS protein levels. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 1, R6, 2006.

CORYDON, T. J.; HAAGERUP, A.; JENSEN, T. G.; BINDERUP, H. G.; PETERSEN, M. S.; KALTOFT, K.; VESTBO, J.; KRUSE, T. A.; BØRGLUM, A. D. A functional CD86 polymorphism associated with asthma and related allergic disorders. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, n. 8, . 509-515, 2007.

COSTA, F. T.; LOPES, S. C.; ALBRECHT, L.; ATAÍDE, R.; SIQUEIRA, A. M.; SOUZA, R. M.; RUSSELL, B.; RENIA, L.; MARINHO, C. R.; LACERDA, M. V. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. **International Journal of Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1099-1105, 2012.

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.

COYLE, A. J.; LEHAR, S.; LLOYD, C.; TIAN, J.; DELANEY, T.; MANNING, S.; NGUYEN, T.; BURWELL, T.; SCHNEIDER, H.; GONZALO, J. A.; GOSSELIN, M.; OWEN, L. R.; RUDD, C. E.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. **Immunity**, v. 13, n. 1, p. 95-105, 2000.

CRAXTON, A.; MAGALETTI, D.; RYAN, E. J.; CLARK, E. A. Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4464-4471, 2003.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors.

Vaccine, v. 20, n. 3-4, p. 385-396, 2001.

CURADO, I.; DUARTE, A. M. R. C.; LAL, A. A.; OLIVEIRA, S. G.; KLOETZEL, J. K. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 235-243, 1997.

D'OMBRAIN, M. C.; HANSEN, D. S.; SIMPSON, K. M.; SCHOFIELD, L. Gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to *Plasmodium falciparum* malaria. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 7, p. 1864-1873, 2007.

DA SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRONTA, 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 624-635, 2008.

DALLA-COSTA, R.; PINCERATI, M. R.; BELTRAME, M. H.; MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, n. 8, p. 809-817, 2010.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 53, n. 7, p. 1035-1043, 2004.

DARIAVACH, P.; MATTEI, M. G.; GOLSTEIN, P.; LEFRANC, M. P. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. **European Journal of Immunology**, v. 18, n. 12, p. 1901-1905, 1988.

DE ALMEIDA, E. R.; PETZL-ERLER, M. L. Expression of genes involved in susceptibility to multifactorial autoimmune diseases: estimating genotype effects. **International Journal Immunogenetics**, v. 40, n. 3, p. 178-185, 2013.

DE SOUZA, J. B.; WILLIAMSON, K. H.; OTANI, T.; PLAYFAIR, J. H. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1593-1598, 1997.

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 1-20, 1992.

DEANE, L. M.; NETO, J. A. F.; OKUMURA, M.; FERREIRA, M. O. Malaria parasites of Brazilian monkeys. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 2, p. 71-86, 1969.

DEL PORTILLO, H. A.; LEVITUS, G.; CAMARGO, L. M.; FERREIRA, M. U.; MERTENS, F. Human IgG responses against the N-terminal region of the Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, Sup 3, p. 77-84, 1992.

DEL PORTILLO, H. A.; LONGACRE, S.; KHOURI, E.; DAVID, P. H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different Plasmodium species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 9, p. 4030-4034, 1991.

DELNESTE, Y.; BOSOTTI, R.; MAGISTRELLI, G.; BONNEFOY, J. Y.; GAUCHAT, J. F. Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8-8, p. 762-763, 2000.

DELORON, P.; DUBOIS, B.; LE HESRAN, J. Y.; RICHE, D.; FIEVET, N.; CORNET, M.; RINGWALD, P.; COT, M. Isotypic analysis of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of *P. falciparum* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 110, n. 2, p. 212-218, 1997.

DIAS, S.; LONGACRE, S.; ESCALANTE, A. A.; UDAGAMA-RANDENIYA, P. V. Genetic diversity and recombination at the C-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) in Sri Lanka. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 145-156, 2011.

DIELI, F.; TROYE-BLOMBERG, M.; FAROUK, S. E.; SIRECI, G.; SALERNO, A. Biology of gammadelta T cells in tuberculosis and malaria. **Current Molecular Medicine**, v. 1, n. 4, p. 437-446, 2001.

D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M.; FURTADO, G. C.; KIPNIS, T. L.; COUTINHO, A.; MINÓPRIO, P. Ig-isotype patterns of primary and secondary B cell responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* correlate with IFN-gamma and IL-4 cytokine production with CD45RB expression by CD4+ spleen cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 43, n. 3, p. 263-270, 1996.

DJILALI-SAIAH, I.; SCHMITZ, J.; HARFOUCH- HAMMOUD, E.; MOUGENOT, J. F.; BACH, J. F.; CAILLAT-ZUCMAN, S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. **Gut**, v. 43, n. 2, p. 187-189, 1998.

DONNER, H.; BRAUN, J.; SEIDL, C.; RAU, H.; FINKE, R.; VENTZ, M.; WALFISH, P. G.; USADEL, K. H.; BADENHOOP, K. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4130-4132, 1997.

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.; WEISS, H. A.; JEPSON, A.; TETTEH, K. K.; WHITTLE, H. C.; CONWAY, DJ. Heritability of Antibody Isotype and Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens. **PLoS One**, v. 4, n. 8, e7381, 2009.

DUARTE, A. M.; PORTO, M. A.; CURADO, I.; MALAFRONTTE, R. S.; HOFFMANN, E. H.; de OLIVEIRA, S. G.; da SILVA, A. M.; KLOETZEL, J. K.; GOMES, A. C. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, n. 2, p. 87-96, 2006.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; BARBOSA, A.; WARE, L. A.; SNAVELY, J. D.; MOCH, J. K.; THOMAS, A. W.; LANAR, D. E. Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2116-2122, 2005.

EGAN, A. F.; MORRIS, J.; BARNISH, G.; ALLEN, S.; GREENWOOD, B. M.; KASLOW, D. C.; HOLDER, A. A.; RILEY, E. M. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. **Journal of Infectious Disease**, v. 173, n. 3, p. 765-769, 1996.

EGEN, J. G.; ALLISON, J. P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. **Immunity**, v. 16, n. 1, p. 23-35, 2002.

ELIAS, R. M.; SARDINHA, L. R.; BASTOS, K. R.; ZAGO, C. A.; DA SILVA, A. P.; ALVAREZ, J. M.; LIMA, M. R. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 790-799, 2005.

EMMERICH, F.; BAL, G.; BARAKAT, A.; MILZ, J.; MÜHLE, C.; MARTINEZ-GAMBOA, L.; DÖRNER, T.; SALAMA, A. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. **British Journal of Haematology**, v. 136, n. 2, p. 309-314, 2007.

ENGLEHARDT, J. J.; SULLIVAN, T. J.; ALLISON, J. P. CTLA-4 overexpression inhibits T cell responses through CD28-B7-dependent mechanism. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 1052-1061, 2006.

ESKANDARI-NASAB, E.; MOGHADAMPOUR, M.; NAJIBI, H.; HADADI-FISHANI, M. Investigation of CTLA-4 and CD86 gene polymorphisms in a group of Iranian patients with brucellosis infection. **Microbiology and Immunology**, 2013.

EUTSCH, S. M.; BOOTH, D. R.; BENNETTS, B. H.; HEARD, R. N.; STEWART, G. J. Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 148, n. 1-2, p. 218-230, 2004.

FALANGA, P. B.; D'IMPE'RIO LIMA, M. R.; COUTINHO, A.; PEREIRA DA SILVA, L. Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* in normal and immune-protected mice. **European Journal of Immunology**, v. 17, n. 5, p. 599-603, 1987.

FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; de THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 11-21, 2000.

FERNANDEZ-BECERRA, C.; YAMAMOTO, M. M.; VÊNICIO, R. Z.; LACERDA, M.; ROSANAS-URGELL, A.; DEL PORTILLO, H. A. *Plasmodium vivax* and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 44-51, 2009.

FONTAINE, J.; CHAGNON-CHOQUET, J.; VALCKE, H. S.; POUDRIER, J.; ROGER, M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B cell disease progression in humans. **Blood**, v. 117, n. 1, p. 145-155, 2011.

FONTES, C. J. F. **Epidemiologia da malária e fatores associados à infecção assintomática por *Plasmodium* em uma população de garimpeiros da Amazônia brasileira (Mato Grosso, 1996)**. 2001. Tese (Doutorado) – Departamento de clínica médica da Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2001.

FOULKES, A. S. **Applied Statistical Genetics with R**. New York, Springer, 2009.

FOY, T. M.; PAGE, D. M.; WALDSCHMIDT, T. J.; SCHONEVELD, A.; LAMAN, J. D.; MASTERS, S. R.; TYGRET, L.; LEDBETTER, J. A.; ARUFFO, A.; CLAASSEN, E.; XU, J. C.; FLAVELL, R. A.; OEHEN, S.; HEDRICK, S. M.; NOELLE, R. J. An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1377-1388, 1995.

FRASER, J. D.; IRVING, B. A.; CRABTREE, G. R.; WEISS, A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. **Science**, v. 251, n. 4991, p. 313-316, 1991.

FRASER, T. S.; KAPPE, S. H.; NARUM, D. L.; VANBUSKIRK, K. M.; ADAMS, J. H. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 49-59, 2001.

FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 3, p. 295-299, 2002.

FREEMAN, G. J.; FREEDMAN, A. S.; SEGIL, J. M.; LEE, G.; WHITMAN, J. F.; NADLER, L. M. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 8, p. 2714-2722, 1989.

FREEMAN, G. J.; GRIBBEN, J. G.; BOUSSIOTIS, V. A.; NG, J. W.; RESTIVO, V. A. Jr, LOMBARD, L. A.; GRAY, G. S.; NADLER, L. M. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. **Science**, v. 262, n. 5135, p. 909-911, 1993.

FRENTSCH, M.; STARK, R.; MATZMOHR, N.; MEIER, S.; DURLANIK, S.; SCHULZ, A. R.; STERVBO, U.; JÜRCHOTT, K.; GEBHARDT, F.; HEINE, G.; REUTER, M. A.; BETTS, M. R.; BUSCH, D.; THIEL, A. CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. **Blood**, v. 122, n. 3, p. 405-412, 2013.

FRLETA, D.; LIN, J. T.; QUEZADA, S. A.; WADE, T. K.; BARTH, R. J.; NOELLE, R. J.; WADE, W. F. Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice. **Journal of Immunotherapy**, v. 26, n. 1, p. 72-84, 2003.

FU, L.; LIN-LEE, Y. C.; PHAM, L. V.; TAMAYO, A.; YOSHIMURA, L.; FORD, R. J. Constitutive NF kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4540-4548, 2006.

GARCÍA-BERMÚDEZ, M.; GONZÁLEZ-JUANATEY, C.; LÓPEZ-MEJÍAS, R.; TERUEL, M.; CORRALES, A.; MIRANDA-FILLOY, J. A.; CASTAÑEDA, S.; Balsa, A.; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, B.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, I.; GÓMEZ-VAQUERO, C.; BLANCO, R.; LLORCA, J.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-GAY, M. A. Study of association of CD40-CD154 gene polymorphisms with disease susceptibility and cardiovascular risk in Spanish rheumatoid arthritis patients. **PLoS One**, v. 7, n. 11, e49214, 2012.

GARRAUD, O.; PERRAUT, R.; DIOUF, A.; NAMBEI, W. S.; TALL, A.; SPIEGEL, A.; LONGACRE, S.; KASLOW, D. C.; JOUIN, H.; MATTEI, D.; ENGLER, G. M.; NUTMAN, T. B.; RILEY, E. M.; MERCEREAU-PUIJALON, O. 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.

GAUR, D.; CHITNIS, C. E. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 422-428, 2011.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 13-14, p. 1413-1429, 2004.

GOMMERMAN, J. L.; SUMMERS DELUCA, L. LT β R and CD40: working together in dendritic cells to optimize immune responses. **Immunology Reviews**, v.244, n. 1, p. 85-98, 2011.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Immune effector mechanisms in malaria. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 4, p. 412-419, 1999.

GOUGH, S. C.; WALKER, L. S.; SANSOM, D. M. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. **Immunology Reviews**, v. 204, p. 102-115, 2005.

GREWAL, I. S.; FOELLMER, H. G.; GREWAL, K. D.; XU, J.; HARDARDOTTIR, F.; BARON, J. L.; JANEWAY, C. A. Jr; FLAVELL, R. A. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1864-1867, 1996.

GRIMBERG, B. T.; UDOMSANGPETCH, R.; XAINLI, J.; MCHENRY, A.; PANICHAKUL, T.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L.; BOCKARIE, M.; CHITNIS, C.; ADAMS, J.; ZIMMERMAN, P. A.; KING, C. L. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, e337, 2007.

GROSS JA, ST JOHN T, ALLISON JP. 1990. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 8, p. 3201-3210, 1990.

GROSS, J. A.; JOHNSTON, J.; MUDRI, S.; ENSELMAN, R.; DILLON, S. R.; MADDEN, K.; XU, W.; PARRISH-NOVAK, J.; FOSTER, D.; LOFTON-DAY, C.; MOORE, M.; LITTAU, A.; GROSSMAN, A.; HAUGEN, H.; FOLEY, K.; BLUMBERG, H.; HARRISON, K.; KINDSVOGEL, W.; CLEGG, C. H. TAC1 and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 995-999, 2000.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 8, p. 353-358, 2006.

GULIA, M.; SUNEJA, A.; GAKHAR, S. K. Anti-mosquito hemolymph antibodies on fecundity and on the infectivity of malarial parasite *Plasmodium vivax* to *Anopheles stephensi* (Diptera Insecta). **Japanese Journal of Infectious Disease**, v. 55, n. 3, p. 78-82, 2002.

GUZMAN, V. B.; MORGUN, A.; SHULZHENKO, N.; MINE, K. L.; GONÇALVES-PRIMO, A.; MUSATTI, C. C.; GERBASE-DELIMA, M. Characterization of CD28, CTLA4, and ICOS polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. **Human Immunology**, v. 66, n. 7, p. 773-776, 2005.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunology Reviews**, v. 240, n. 1, p. 297-316, 2011.

HAIMILA, K.; SMEDBERG, T.; MUSTALAHTI, K.; MÄKI, M.; PARTANEN, J.; HOLOPAINEN, P. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 2, p. 85-92, 2004.

HAIMILA, K.; TURPEINEN, H.; ALAKULPPI, N. S.; KYLLÖNEN, L. E.; SALMELA, K. T.; PARTANEN, J. Association of genetic variation in inducible costimulator gene with outcome of kidney transplantation. **Transplantation**, v. 87, n. 3, p. 393-396, 2009.

HANSEN, J. A.; MARTIN, P. J.; NOWINSKI, R. C. Monoclonal antibodies identifying a novel T-cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. **Immunogenetics**, v. 10, n. 1-4, p. 247-260, 1980.

HAQUE, A.; BEST, S. E.; AMANTE, F. H.; MUSTAFAH, S.; DESBARRIERES, L.; DE LABASTIDA, F.; SPARWASSER, T.; HILL, G. R.; ENGWERDA, C. R. CD4⁺ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 12, e1001221, 2010.

HARRIS, P. K.; YEOH, S.; DLUZEWSKI, A. R.; O'DONNELL, R. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BANNISTER, L. H.; MITCHELL, G. H.; BLACKMAN, M. J. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 3, p. 241-251, 2005.

HEUFLER, C.; KOCH, F.; STANZL, U.; TOPAR, G.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; ENK, A.; STEINMAN, R. M.; ROMANI, N.; SCHULER, G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 3, p. 659-668, 1996.

HO, M.; WEBSTER, H. K.; TONGTAWE, P.; PATTANAPANYASAT, K.; WEIDANZ, W. P. Increased gamma delta T cells in acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Immunology Letters**, v. 25, n. 1-3, p. 139-141, 1990.

HOFFMAN, S. L.; OSTER, C. N.; PLOWE, C. V.; WOOLLETT, G. R.; BEIER, J. C.; CHULAY, J. D.; WIRTZ, R. A.; HOLLINGDALE, M. R.; MUGAMBI, M. Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. **Science**, v. 237, n. 4815, p. 639-642, 1987.

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**, v. 261, n. 5125, p. 1182-1184, 1993.

HOWELL, S. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31311-31320, 2001.

HUGHES, T.; ADLER, A.; KELLY, J. A.; KAUFMAN, K. M.; WILLIAMS, A. H.; LANGEFELD, C. D.; BROWN, E. E.; ALARCÓN, G. S.; KIMBERLY, R. P.; EDBERG, J. C.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; PETRI, M.; BOACKLE, S. A.; STEVENS, A. M.; REVEILLE, J. D.; SANCHEZ, E.; MARTÍN, J.; NIEWOLD, T. B.; VILÁ, L. M.; SCOFIELD, R. H.; GILKESON, G. S.; GAFFNEY, P. M.; CRISWELL, L. A.; MOSER, K. L.; MERRILL, J. T.; JACOB, C. O.; TSAO, B. P.; JAMES, J. A.; VYSE, T. J.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; BIOLUPUS NETWORK, HARLEY, J. B.; RICHARDSON, B. C.; SAWALHA, A. H. Evidence for gene-gene epistatic interactions among susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 2, p. 485-492, 2012.

HUTLOFF, A.; DITTRICH, A. M.; BEIER, K. C.; ELJASCHEWITSCH, B.; KRAFT, R.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; KROCZEK, R. A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 263-266, 1999.

IHARA, K.; AHMED, S.; NAKAO, F.; KINUKAWA, N.; KUROMARU, R.; MATSUURA, N.; IWATA, I.; NAGAFUCHI, S.; KOHNO, H.; MIYAKO, K.; HARA, T. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. **Immunogenetics**, v. 53, n. 6, p. 447-454, 2001.

INOUE, S.; NIIKURA, M.; TAKEO, S.; MINEO, S.; KAWAKAMI, Y.; UCHIDA, A.; KAMIYA, S.; KOBAYASHI, F. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 30, p. 12129-12134, 2012.

JACOBS, P.; RADZIOCH, D.; STEVENSON, M. M. A Th1- associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 2, p. 535-541, 1996.

JACOBS, T.; GRAEFE, S. E.; NIKNAFS, S.; GAWORSKI, I.; FLEISCHER, B. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 5, p. 2323-2329, 2002.

JACOBS, T.; PLATE, T.; GAWORSKI, I.; FLEISCHER, B. CTLA-4-dependent mechanisms prevent T cell induced-liver pathology during the erythrocyte stage

of *Plasmodium berghei* malaria. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 4, p. 972-980, 2004.

JACOBSON, E. M.; CONCEPCION, E.; OASHI, T.; TOMER, Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2684-2691, 2005.

JELLIS, C. L.; WANG, S. S.; RENNERT, P.; BORRIELLO, F.; SHARPE, A. H.; GREEN, N. R.; GRAY, G. S. Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86). **Immunogenetics**, v. 42, n. 2, p. 85-89, 1995.

JIANG, C.; LOO, W. M.; GREENLEY, E. J.; TUNG, K. S.; ERICKSON, L. D. B cell maturation antigen deficiency exacerbates lymphoproliferation and autoimmunity in murine lupus. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6136-6147, 2011.

JOHNSON, A. H.; LEKE, R. G.; MENDELL, N. R.; SHON, D.; SUH, Y. J.; BOMBA-NKOLO, D.; TCHINDA, V.; KOUONTCHOU, S.; THUITA, L. W.; VAN DER WEL, A. M.; THOMAS, A.; STOWERS, A.; SAUL, A.; ZHOU, A.; TAYLOR, D. W.; QUAKYI, I. A. 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. 2762-71, 2004.

KAARTINEN, T.; LAPPALAINEN, J.; HAIMILA, K.; AUTERO, M.; PARTANEN, J. Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 7, p. 1644-1651, 2007.

KANO, F. S.; SANCHEZ, B. A.; SOUSA, T. N.; TANG, M. L.; SALIBA, J.; OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, P. A.; GONÇALVES, A. Q.; FONTES, C. J.; SOARES, I. S.; BRITO, C. F.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, L. H. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 8, p. 989-1000, 2012.

KARABON, L.; FRYDECKA, I. **The Role of Polymorphisms in Co-Signalling Molecules' Genes in Susceptibility to B-Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia, Chronic Lymphocytic Leukemia**, Ed. Pablo Opezzo, 2012.

KARIUKI, S. M.; ROCKETT, K.; CLARK, T. G.; REYBURN, H.; AGBENYEGA, T.; TAYLOR, T. E.; BIRBECK, G. L.; WILLIAMS, T. N.; NEWTON, C. R. The genetic risk of acute seizures in African children with falciparum malaria. **Epilepsia**, v. 54, n. 6, p. 990-1001, 2013.

KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H.; TADA, M. S.; DE ALMEIDA E SILVA, A.; COSTA, J. D.; ARAÚJO, M. D. A. S.; ESCOBAR, A. L.; DA SILVA L. H. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. **PLoS One**, v. 5, n. 2, e9245, 2010.

KAWASAKI, A.; TSUCHIYA, N.; FUKAZAWA, T.; HASHIMOTO, H.; TOKUNAGA, K. Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 7, p. 424-429, 2002.

KEARNEY, E. R.; WALUNAS, T. L.; KARR, R. W.; MORTON, P. A.; LOH, D. Y.; BLUESTONE, J. A.; JENKINS, M. K. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen specific CD41 T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1032-1036, 1995.

KEMP, E. H.; AJJAN, R. A.; HUSEBYE, E. S.; PETERSON, P.; UIBO, R.; IMRIE, H.; PEARCE, S. H.; WATSON, P. F.; WEETMAN, A. P. A cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism is associated with autoimmune Addison's disease in English patients. **Clinical Endocrinology**, v. 49, n. 5, p. 609-613, 1998.

KHATTRI, R.; AUGER, J. A.; GRIFFIN, M. D.; SHARPE, A. H.; BLUESTONE, J. A. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 10, p. 5784-5791, 1999.

KHORSHIED, M. M.; GOUDA, H. M.; KHORSHID, O. M. Association of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 genetic polymorphism, hepatitis C viral

infection and B-cell non-Hodgkin lymphoma: an Egyptian study. **Leukemia & Lymphoma**, 2013.

KIM, T. Y.; PARK, Y. J.; HWANG, J. K.; SONG, J. Y.; PARK, K. S.; CHO, B. Y.; PARK, D. J. A C/T polymorphism in the 5'-untranslated region of the CD40 gene is associated with Graves' disease in Koreans. **Thyroid**, v. 13, n. 10, p. 919-925, 2003.

KING, C. L.; ADAMS, J. H.; XIANLI, J.; GRIMBERG, B. T.; MCHENRY, A. M.; GREENBERG, L. J.; SIDDIQUI, A.; HOWES, R. E.; DA SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M. U.; ZIMMERMAN, P. A. Fy(a)/Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20113-20118, 2011.

KING, C. L.; MICHON, P.; SHAKRI, A. R.; MARCOTTY, A.; STANISIC, D.; ZIMMERMAN, P. A.; COLE-TOBIAN, J. L.; MUELLER, I.; CHITNIS, C. E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8363-8368, 2008.

KOCKEN, C. H.; NARUM, D. L.; MASSOUGBODJI, A.; AYIVI, B.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; CONWAY, D. J.; SANI, A.; THOMAS, A. W. Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 109, n. 2, p. 147-156, 2000.

KOCKEN, C. H.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; HACKETT, F.; VALDERRAMA, A.; BLACKMAN, M. J.; THOMAS, A. W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4471-4476, 2002.

KOROBKO, D. S.; MALKOVA, N. A.; BULATOVA, E. V.; BABENKO, L. A.; SAZONOV, D. V.; SOKOLOVA, E. A.; FILIPENKO, M. L. The effect of genetic factors on the phenotypic expression of multiple sclerosis. **Zhurnal Nevrologii Psikhatrii Imeni S S Korsakova**, v. 113, n. 2, p. 10-16, 2013.

KOUSSIS, K.; WITHERS-MARTINEZ, C.; YEOH, S.; CHILD, M.; HACKETT, F.; KNUEPFER, E.; JULIANO, L.; WOEHLBIER, U.; BUJARD, H.; BLACKMAN, M. J. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 6, p. 725-735, 2009.

KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 459-465, 1995.

KUCHROO, V. K.; DAS, M. P.; BROWN, J. A.; RANGER, A. M.; ZAMVIL, S. S.; SOBEL, R. A.; WEINER, H. L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell**, v. 80, n. 5, p. 707-718, 1995.

KUMSIRI, R.; POTUP, P.; CHOTIVANICH, K.; PETMITR, S.; KALAMBAHETI, T.; MANEERAT, Y. 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, n. 3, p. 217-226, 2010.

LADEIA-ANDRADE, S.; FERREIRA, M. U.; DE CARVALHO, M. E.; CURADO, I.; COURA, J. R. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 452-459, 2009.

LAHIRI, A.; POCHARD, P.; LE POTTIER, L.; TOBÓN, G. J.; BENDAOU, B.; YOUINO, P.; PERS, J. O. The complexity of the BAFF TNF-family members: implications for autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 39, n. 3, p. 189-198, 2012.

LANGHORNE, J.; CROSS, C.; SEIXAS, E.; LI, C.; VON DER WEID, T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n. 4, p. 1730-1734, 1998.

LASERSON, K. F.; WYPIJ, D.; PETRALANDA, I.; SPIELMAN, A.; MAGUIRE, J. H. Differential perpetuation of malaria species among Amazonian

Yanomami Amerindians. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 767-773, 1999.

LAWPOOLSRI, S.; CHAVEZ, I. F.; YIMSAMRAN, S.; PUANGSA-ART, S.; THANYAVANICH, N.; MANEEBOONYANG, W.; CHAIMUNGKUN, W.; SINGHASIVANON, P.; MAGUIRE, J. H.; HUNGERFORD, L. L. The impact of human reservoir of malaria at a community-level on individual malaria occurrence in a low malaria transmission setting along the Thai-Myanmar border. **Malaria Journal**, v. 9, n. 143, 2010.

LEDEZMA-LOZANO, I. Y.; PADILLA-MARTÍNEZ, J. J.; LEYVA-TORRES, S. D.; PARRA-ROJAS, I.; RAMÍREZ-DUEÑAS, M. G.; PEREIRA-SUÁREZ, A. L.; RANGEL-VILLALOBOS, H.; RUIZ-QUEZADA, S. L.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, P. E.; MUÑOZ-VALLE, J. F. Association of CD28 IVS3 +17T/C polymorphism with soluble CD28 in rheumatoid arthritis. **Disease Markers**, v. 30, n. 1, p. 25-29, 2011.

LEE, K. P.; TAYLOR, C.; PETRYNIAK, B.; TURKA, L. A.; JUNE, C. H.; THOMPSON, C. B. The genomic organization of the CD28 gene. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 1, p. 344-352, 1990.

LENSCHOW, D. J.; HEROLD, K. C.; RHEE, L.; PATEL, B.; KOONS, A.; QIN, H. Y.; FUCHS, E.; SINGH, B.; THOMPSON, C. B.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. **Immunity**, v. 5, n. 3, p. 285-293, 1996.

LENSCHOW, D. J.; HO, S. C.; SATTAR, H.; RHEE, L.; GRAY, G.; NABAVI, N.; HEROLD, K. C.; BLUESTONE, J. A. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 1145-1155, 1995.

LENSEN, A. H. W.; BOLMER-VAN, M. V.; VAN GEMERT G.J.; ELING, W. M. C.; SAUERWEIN, R. W. Leukocytes in a *Plasmodium falciparum*-Infected Blood Meal Reduce Transmission of Malaria to *Anopheles* Mosquitoes. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3834-3837, 1997.

LEORATTI, F. M.; DURLACHER, R. R.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G.; FERREIRA, A. W.; SANCHEZ, M. C.; MORAES, S. L. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. **Malaria Journal**, v. 24, n. 7:186, 2008.

LEPENIES, B.; GAWORSKI, I.; TARTZ, S.; LANGHORNE, J.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 6, p. 687-694, 2007.

LEVITUS, G.; MERTENS, F.; SPERANCA, M. A.; CAMARGO, L. M. A.; FERREIRA, M. U.; DEL PORTILLO, H. A. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 68-76, 1994.

LI, M.; SUN, H.; LIU, S.; YU, J.; LI, Q.; LIU, P.; SHEN, H.; SUN, D. CD40 C/T-1 polymorphism plays different roles in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. **Endocrinology Journal**, v. 59, n. 12, p. 1041-1050, 2012.

LI, X.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; WU, Z.; YANG, L.; XIANG, Z.; QI, Z.; ZHANG, X.; XIAO, X. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 3, p. 530-539, 2012.

LICHTENEGGER, F. S.; MUELLER, K.; OTTE, B.; BECK, B.; HIDDEMANN, W.; SCHENDEL, D. J.; SUBKLEWE, M. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e44266, 2012.

LIGERS, A.; TELESHOVA, N.; MASTERMAN, T.; HUANG, W. X.; HILLERT, J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. **Genes and Immunity**, v. 2, n. 2-3, p. 145-152, 2001.

LIMA-JUNIOR, J. C.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; BANIC, D. M.; JIANG, J.; SINGH, B.; FABRÍCIO-SILVA, G. M.; PORTO, L. C.; MEYER, E. V.; MORENO, A.; RODRIGUES, M. M.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.;

DE OLIVEIRA-FERREIRA, J. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e36419, 2012.

LIN, E.; KINIBORO, B.; GRAY, L.; DOBBIE, S.; ROBINSON, L.; LAUMAEA, A.; SCHÖPFLIN, S.; STANISIC, D.; BETUELA, I.; BLOOD-ZIKURSH, M.; SIBA, P.; FELGER, I.; SCHOFIELD, L.; ZIMMERMAN, P.; MUELLER I. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. **PLoS One**, v. 5, n. 2, e9047, 2010.

LING, V.; WU, P. W.; FINNERTY, H. F.; AGOSTINO, M. J.; GRAHAM, J. R.; CHEN, S.; JUSSIFF, J. M.; FISK, G. J.; MILLER, C. P.; COLLINS, M. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. **Genomics**, v. 78, n. 3, p. 155-168, 2001.

LITINSKIY, M. B.; NARDELLI, B.; HILBERT, D. M.; HE, B.; SCHAFFER, A.; CASALI, P.; CERUTTI, A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. **Nature Immunology**, v. 3, n. 9, p. 822-829, 2002.

LIU, C. P.; JIANG, J. A.; WANG, T.; LIU, X. M.; GAO, L.; ZHU, R. R.; SHEN, Y.; WU, M.; XU, T.; ZHANG, X. G. CTLA-4 and CD86 genetic variants and haplotypes in patients with rheumatoid arthritis in southeastern China. **Genetic and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1373-1382, 2013.

LIU, X. Q.; STACEY, K. J.; HORNE-DEBETS, J. M.; CRIDLAND, J. A.; FISCHER, K.; NARUM, D.; MACKAY, F.; PIERCE, S. K.; WYKES, M. N. Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 12, p. 3291-3301, 2012.

LÖHNING, M.; HUTLOFF, A.; KALLINICH, T.; MAGES, H. W.; BONHAGEN, K.; RADBRUCH, A.; HAMELMANN, E.; KROCZEK, R. A. Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 2, p. 181-193, 2003.

LONG, G. H.; CHAN, B. H. K.; ALLEN, J. E.; READ, A. F.; GRAHAM, A. L. Blockade of TNF receptor 1 reduces disease severity but increases parasite transmission during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. **International Journal of Parasitology**, v. 38, n. 8-9, p. 1073-1081, 2008.

LORENZETTI, A.; FORNAZARI, P. A.; BONINI-DOMINGOS, A. C.; PENHALBEL, R. S. R.; FUGIKAHA, E.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; FRAGA, V. D.; CONCEIÇÃO, L. M.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; COUTO, V. S.; MACHADO, R. L. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 8-12, 2008.

LUDEWIG, B.; HENN, V.; SCHRODER, J. M.; GRAF, D.; KROCZEK, R. A. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ T cells with dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 12, p. 3137-3143, 1996.

MACATONIA, S. E.; HOSKEN, N.A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; URPHY, K.M.; O'GARRA, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5071-5079, 1995.

MACKAY, F.; BROWNING, J. L. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 465-475, 2002.

MACKAY, F.; SCHNEIDER, P. Cracking the BAFF code. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 7, p. 491-502, 2009.

MAITLAND, K.; WILLIAMS, T. N.; BENNETT, S.; NEWBOLD, C. I.; PETO, T. E.; VIJI, J.; TIMOTHY, R.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; BOWDEN, D. K. The interaction between *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in children on Espiritu Santo island, Vanuatu. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 614-620, 1996.

MAK, T. W.; SHAHINIAN, A.; YOSHINAGA, S. K.; WAKEHAM, A.; BOUCHER, L. M.; PINTILIE, M.; DUNCAN, G.; GAJEWSKA, B. U.; GRONSKI, M.; ERIKSSON, U.; ODERMATT, B.; HO, A.; BOUCHARD, D.; WHORISKY, J. S.; JORDANA, M.; OHASHI, P. S.; PAWSON, T.; BLADT, F.;

TAFURI, A. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. **Nature Immunology**, v. 4, n. 8, p. 765-772, 2003.

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

MALIK, N.; GREENFIELD, B. W.; WAHL, A. F.; KIENER, P. A. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 10, p. 3952-3960, 1996.

MANJURANO, A.; CLARK, T. G.; NADJM, B.; MTOVE, G.; WANGAI, H.; SEPULVEDA, N.; CAMPINO, S. G.; MAXWELL, C.; OLOMI, R.; ROCKETT, K. R.; JEFFREYS, A.; MALARIAGEN CONSORTIUM, RILEY, E. M.; REYBURN, H.; DRAKELEY, C. Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzanian population. **PLoS One**, v. 7, n. 10, e47463, 2012.

MARCANO, T. J.; MORGADO, A.; TOSTA, C. E.; COURA, J. R. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 4, p. 369-376, 2004.

MARIETTE, X.; ROUX, S.; ZHANG, J.; BENGOUFA, D.; LAVIE, F.; ZHOU, T.; KIMBERLY, R. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 2, p. 168-171, 2003.

MATSUSHITA, M.; TSUCHIYA, N.; OKA, T.; YAMANE, A.; TOKUNAGA, K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Genes and Immunity**, v. 1, n. 7, p. 428-434, 2000.

MÄURER, M.; LOSERTH, S.; KOLB-MÄURER, A.; PONATH, A.; WIESE, S.; KRUSE, N.; RIECKMANN, P. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. **Immunogenetics**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2002.

MAZIER, D.; GOMA, J.; PIED, S.; RENIA, L.; NUSSLER, A.; MILTGEN, F.; MATTEI, D.; GRAU, G. Hepatic phase of malaria: a crucial role as "go-between" with other stages. **Bulletin of the World Health Organization**, Sup 68, p. 126-131, 1990.

MCADAM, A. J.; CHANG, T. T.; LUMELSKY, A. E.; GREENFIELD, E. A.; BOUSSIOTIS, V. A.; DUKE-COHAN, J. S.; CHERNOVA, T.; MALENKOVICH, N.; JABS, C.; KUCHROO, V. K.; LING, V.; COLLINS, M.; SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 5035-5040, 2000.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 5967-5971, 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 Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 6, e1192, 2011.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, Sup 1-2, p. 97-106, 2001.

MERCEREAU-PUIJALON, O.; MÉNARD, D. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: a paradigm revisited. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 17, n. 3, p. 176-183, 2010.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNIS, M. H. 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.

MINIGO, G.; WOODBERRY, T.; PIERA, K. A.; SALWATI, E.; TJITRA, E.; KENANGALEM, E.; PRICE, R. N.; ENGWERDA, C. R.; ANSTEY, N. M.; PLEBANSKI, M. Parasite dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, e1000402, 2009.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 154-158, 2004.

MOORE, P. A.; BELVEDERE, O.; ORR, A.; PIERI, K.; LAFLEUR, D. W.; FENG, P.; SOPPET, D.; CHARTERS, M.; GENTZ, R.; PARMELEE, D.; LI, Y.; GALPERINA, O.; GIRI, J.; ROSCHKE, V.; NARDELLI, B.; CARRELL, J.; SOSNOVTSEVA, S.; GREENFIELD, W.; RUBEN, S. M.; OLSEN, H. S.; FIKES, J.; HILBERT, D. M. BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 260-263, 1999.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 582-587, 2006.

MUEHLENBACHS, A.; FRIED, M.; LACHOWITZER, J.; MUTABINGWA, T. K.; DUFFY, P. E. Genome-wide expression analysis of placental malaria reveals features of lymphoid neogenesis during chronic infection. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 557-565, 2007.

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. **Advances in Parasitology**, v. 81, p. 77-131, 2013.

MUELLER, I.; WIDMER, S.; MICHEL, D.; MARAGA, S.; McNAMARA, D. T.; KINIBORO, B.; SIE, A.; SMITH, T. A.; ZIMMERMAN, P. A. High sensitivity detection of *Plasmodium* species reveals positive correlations between infections of different species, shifts in age distribution and reduced local variation in Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v. 8, n. 41, 2009.

MÚFALO, B. C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Plasmodium vivax apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12-13, p. 1266-1273, 2008.

MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S. Plasmodium falciparum-free merozoites and infected RBCs distinctly affect soluble CD40 ligand-mediated maturation of immature monocyte-derived dendritic cells. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 1, p. 244-254, 2008.

MÜLLER, I.; BOCKARIE, M.; ALPERS, M.; SMITH, T. The epidemiology of malaria in Papua New Guinea. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 6, p. 253-259, 2003.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; MELLOR, A. L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD41 T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4100-4110, 2004.

MUNROE, M. E.; BISHOP, G. A. A costimulatory function for T cell CD40. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 2, p. 671-682, 2007.

NAOTUNNE, T. D.; KARUNAWEERA, N. D.; MENDIS, K. N.; CARTER, R. Cytokine mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood-cells and involves reactive nitrogen intermediates. **Immunology**, v. 78, n. 4, p. 555-562, 1993.

NARDELLI, B.; BELVEDERE, O.; ROSCHKE, V.; MOORE, P. A.; OLSEN, H. S.; MIGONE, T. S.; SOSNOVTSEVA, S.; CARRELL, J. A.; FENG, P.; GIRI, J. G.; HILBERT, D. M. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 198-204, 2001.

NARDIN, E. H.; OLIVEIRA, G. A.; CALVO-CALLE, J. M.; CASTRO, Z. R.; NUSSENZWEIG, R. S.; SCHMECKPEPER, B.; HALL, B. F.; DIGGS, C.; BODISON, S.; EDELMAN, R. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. **The Journal of Infectious Disease**, v. 182, n. 5, p. 1486-1496, 2000.

NDUATI, E.; GWELA, A.; KARANJA, H.; MUGYENYI, C.; LANGHORNE, J.; MARSH, K.; URBAN, B. C. The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria. **The Journal of Infectious Disease**, v. 204, n. 6, p. 962-970, 2011.

NEZOS, A.; PAPAGEORGIOU, A.; FRAGOULIS, G.; IOAKEIMIDIS, D.; KOUTSILIERIS, M.; TZIOUFAS, A. G.; MOUTSOPOULOS, H. M.; VOULGARELIS, M.; MAVRAGANI, C. P. B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren's syndrome. **Journal of Autoimmunity**, 2013.

NIE, C. Q.; BERNARD, N. J.; SCHOFIELD, L.; HANSEN, D. S. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2275-2282, 2007.

NISTICÒ, L.; BUZZETTI, R.; PRITCHARD, L. E.; VAN DER AUWERA, B.; GIOVANNINI, C.; BOSI, E.; LARRAD, M. T.; RIOS, M. S.; CHOW, C. C.; COCKRAM, C. S.; JACOBS, K.; MIJOVIC, C.; BAIN, S. C.; BARNETT, A. H.; VANDEWALLE, C. L.; SCHUIT, F.; GORUS, F. K.; TOSI, R.; POZZILLI, P.; TODD, J. A. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 7, p. 1075-1080, 1996.

NITHIYANANTHAN, R.; HEWARD, J. M.; ALLAHABADIA, A.; FRANKLYN, J. A.; GOUGH, S. C. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. **Thyroid**, v. 12, n. 1, p. 3-6, 2002.

NOELLE, R. J.; ROY, M.; SHEPHERD, D. M.; STAMENKOVIC, I.; LEDBETTER, J. A.; ARUFFO, A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 14, p. 6550-6554, 1992.

NOGUEIRA, P. A.; ALVES, F. P.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; PEIN, O.; SANTOS, N. R.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P.; DEL PORTILLO, H. A. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus

but not the C terminus of merozoite surface protein 1. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2726-2733, 2006.

NTUMNGIA, F. B.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Finding the sweet spots of inhibition: understanding the targets of a functional antibody against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **International Journal of Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1055-1062, 2012.

NTUMNGIA, F. B.; SCHLOEGEL, J.; BARNES, S. J.; MCHENRY, A. M.; SINGH, S.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 1203-1208, 2012.

NURIEVA, R. I.; MAI, X. M.; FORBUSH, K.; BEVAN, M. J.; DONG, C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14163-14168, 2003.

O'CONNOR, B. P.; RAMAN, V. S.; ERICKSON, L. D.; COOK, W. J.; WEAVER, L. K.; AHONEN, C.; LIN, L. L.; MANTCHEV, G. T.; BRAM, R. J.; NOELLE, R. J. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 1, p. 91-98, 2004.

ODOBASIC, D.; KITCHING, A.; TIPPING, P.; HOLDSWORTH, S. CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. **Kidney International**, v. 68, n. 2, p. 584-592, 2005.

O'DONNELL, R. A.; DE KONING-WARD, T. F.; BURT, R. A.; BOCKARIE, M.; REEDER, J. C.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 12, p. 1403-1412, 2001.

OKAMOTO, N.; TEZUKA, K.; KATO, M.; ABE, R.; TSUJI, T. PI3-kinase and MAP-kinase signaling cascades in AILIM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have distinct functions between cell proliferation and IL-10 production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 3, p. 691-702, 2003.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 115, 2010.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; PRATT-RICCIO, L. R.; ARRUDA, M.; SANTOS, F.; RIBEIRO, C. T.; GOLDBERG, A. C.; BANIC, D. M. 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. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 63-69, 2004.

PACHEBAT, J. A.; KADEKOPPALA, M.; GRAINGER, M.; DLUZEWSKI, A. R.; GUNARATNE, R. S.; SCOTT-FINNIGAN, T. J.; OGUN, S. A.; LING, I. T.; BANNISTER, L. H.; TAYLOR, H. M.; MITCHELL, G. H.; HOLDER, A. A. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 59-69, 2007.

PAN, X. M.; GAO, L. B.; LIANG, W. B.; LIU, Y.; ZHU, Y.; TANG, M.; LI, Y. B.; ZHANG, L. CD86 +1057 G/A polymorphism and the risk of colorectal cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 29, n. 7, p. 381-386, 2010.

PARK, Y. J.; CHUNG, H. K.; PARK, D. J.; KIM, W. B.; KIM, S. W.; KOH, J. J.; CHO, B. Y. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. **Thyroid**, v. 10, n. 6, p. 453-459, 2000.

PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.

PENA, S. D.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. De S.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L. A.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; DE MORAES, M. E.; DE MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M. A.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, e17063, 2011.

PENDELOSKI, K. P.; SASS, N.; TORLONI, M. R.; MATTAR, R.; MORON, A. F.; FRANCHIM, C. S.; DAHER, S. Immunoregulatory gene polymorphisms in women with preeclampsia. **Hypertension Research**, v. 34, n. 3, p. 384-388, 2011.

PERKINS, D.; WANG, Z.; DONOVAN, C.; HE, H.; MARK, D.; GUAN, G.; WANG, Y.; WALUNAS, T.; BLUESTONE, J.; LISTMAN, J.; FINN, P. W. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 11, p. 4154-4159, 1996.

PERKINS, M. E.; ROCCO, L. J. Sialic acid-dependent binding of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen, Pf200, to human erythrocytes. **Journal of Immunology**, v. 141, n. 9, p. 3190-3196, 1988.

PERS, J. O.; DARIDON, C.; DEVAUCHELLE, V.; JOUSSE, S.; SARAUX, A.; JAMIN, C.; YOUINOU, P. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1050, p. 34-39, 2005.

PIGUET, P. F.; KAN, C. D.; VESIN, C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. **Apoptosis**, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2002.

PIGUET, P. F.; KAN, C. D.; VESIN, C.; ROCHAT, A.; DONATI, Y.; BARAZZONE, C. Role of CD40-CD40L in mouse severe malaria. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 2, p. 733-742, 2001.

PODOJIL, J. R.; KIN, N. W.; SANDERS, V. M. CD86 and β 2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3'-IgH enhancer in B cells. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23394-23404, 2004.

PODOJIL, J. R.; SANDERS, V. M. Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and β 2-adrenergic receptor stimulation. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 5143-5151, 2003.

PRUDÊNÇIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849-856.

PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; SAKIHAMA, N.; FERREIRA, M. U.; KHO, W. G.; KANEKO, A.; KANBARA, H.; HATTORI, T.; TANABE, K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16348-16353, 2002.

Qamar N, Fuleihan RL. The Hyper IgM Syndromes. **Clinical Reviews and Allergy & Immunology**, 2013.

REMARQUE, E.J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.

RENSHAW, B. R.; FANSLow, W. C. 3rd; ARMITAGE, R. J.; CAMPBELL, K. A.; LIGGITT, D.; WRIGHT, B.; DAVISON, B. L.; MALISZEWSKI, C. R. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 5, p. 1889-1900, 1994.

RIBOT, J. C.; DEBARROS, A.; MANCIO-SILVA, L.; PAMPLONA, A.; SILVA-SANTOS, B. B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human $\gamma\delta$ T cells via IL-2 production. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 3, p. 1202-1208, 2012.

RICCIO, E. K.; TOTINO, P. R.; PRATT-RICCIO, L. R.; ENNES-VIDAL, V.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M.; DE SOUZA, J. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. de F. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-119 malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1:326, 2013.

RILEY, J. L.; BLAIR, P. J.; MUSSER, J. T.; ABE, R.; TEZUKA, K.; TSUJI, T.; JUNE, C. H. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 4943-4948, 2001.

ROCHAS, C.; HILLION, S.; SARAUX, A.; MAGEED, R. A.; YOUINOU, P.; JAMIN, C.; DEVAUCHELLE, V. Transmembrane BAFF from rheumatoid synoviocytes requires interleukin-6 to induce the expression of recombination-

activating gene in B lymphocytes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 5, p. 1261-1271, 2009.

RODRIGUES, M. H.; CUNHA, M. G.; MACHADO, R. L.; FERREIRA, O. C. Jr.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, v. 2, n. 1:39, 2003.

RODRIGUES, M. H.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 185-192, 2005.

ROSENBERG, R. *Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight? **Trends Parasitology**, v. 23, n. 7, p. 193-196, 2007.

RUMMEL, T.; BATCHELDER, J.; FLAHERTY, P.; LAFLEUR, G.; NANAVATI, P.; BURNS, J. M.; WEIDANZ, W. P. CD28 costimulation is required for the expression of T-cell-dependent cell-mediated immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria parasites. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5768-5774, 2004.

SABCHAREON, A. T.; BURNOUF, D.; OUATTARA, P.; ATTANATH, H.; BOUHAROUN TAYOUN, P.; CHANTAVANICH, C.; FOUCAULT, T.; CHONGSUPHAJAISIDDHI, DRUILHE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 3, p. 297-308, 1991.

SABETI, P.; USEN, S.; FARHADIAN, S.; JALLOW, M.; DOHERTY, T.; NEWPORT, M.; PINDER, M.; WARD, R.; KWIATKOWSKI, D. CD40L association with protection from severe malaria. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 5, p. 286-291, 2002.

SABROZA, P. C. Malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 95-99, 1985.

SALOMON, B.; LENSCHOW, D. J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A.; BLUESTONE, J. A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity**, v. 12, n. 4, p. 431-440, 2000.

SALZER, U.; CHAPEL, H. M.; WEBSTER, A. D.; PAN-HAMMARSTRÖM, Q.; SCHMITT-GRAEFF, A.; SCHLESIER, M.; PETER, H. H.; ROCKSTROH, J. K.; SCHNEIDER, P.; SCHÄFFER, A. A.; HAMMARSTRÖM, L.; GRIMBACHER, B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 820-828, 2005.

SALZER, U.; GRIMBACHER, B. Common variable immunodeficiency: The power of co-stimulation. **Seminars in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 337-346, 2006.

SALZER, U.; MAUL-PAVICIC, A.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; URSCHEL, S.; BELOHRADSKY, B. H.; LITZMAN, J.; HOLM, A.; FRANCO, J. L.; PLEBANI, A.; HAMMARSTROM, L.; SKRABL, A.; SCHWINGER, W.; GRIMBACHER, B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. **Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 234-240, 2004.

SANTOS, N. P.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K.; PEREIRA, R.; GUSMÃO, L.; AMORIM, A.; GUERREIRO, J. F.; ZAGO, M. A.; MATTE, C.; HUTZ, M. H.; SANTOS, S. E. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 184-190.

SARDINHA, L. R.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M. Influence of the polyclonal activation induced by *Plasmodium chabaudi* on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 56, n. 4, p. 408-416, 2002.

SCHLOTMANN, T.; WAASE, I.; JÜLCH, C.; KLAUENBERG, U.; MÜLLER-MYHSOK, B.; DIETRICH, M.; FLEISCHER, B.; BRÖKER, B. M. CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. **The Journal of Infectious Disease**, v. 182, n. 1, p. 367-370, 2000.

SCHNEIDER, P.; MACKAY, F.; STEINER, V.; HOFMANN, K.; BODMER, J. L.; HOLLER, N.; AMBROSE, C.; LAWTON, P.; BIXLER, S.; ACHA-ORBEA, H.; VALMORI, D.; ROMERO, P.; WERNER-FAVRE, C.; ZUBLER, R. H.; BROWNING, J. L.; TSCHOPP, J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1747-1756, 1999.

SCHOLZEN, A.; MITTAG, D.; ROGERSON, S. J.; COOKE, B. M.; PLEBANSKI, M. *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, e1000543, 2009.

SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 1, p. 4-43, 2001.

SCHWEITZER, A. N.; SHARPE, A. H. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 2762-2771, 1998.

SCHWENK, R.; ASHER, L. V.; CHALOM, I.; LANAR, D.; SUN, P.; WHITE, K.; KEIL, D.; KESTER, K. E.; STOUTE, J.; HEPPNER, D. G.; KRZYCH, U. Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-based vaccine. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 1, p. 17-25, 2003.

SCOPEL, K. K.; FONTES, C. J.; NUNES, A. C.; HORTA, M. F.; BRAGA, E. M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 61-64, 2004.

SEIXAS, E.; CROSS, C.; QUIN, S.; LANGHORNE, J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2970-2978, 2001.

SELLAM, J.; MICELI-RICHARD, C.; GOTTENBERG, J. E.; ITTAH, M.; LAVIE, F.; LACABARATZ, C.; GESTERMANN, N.; PROUST, A.; LAMBOTTE, O.; MARIETTE, X. Decreased B cell activating factor receptor

expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. **Annals of Rheumatic Disease**, v. 66, n. 6, p. 790-797, 2007.

SEMPLE, K.; NGUYEN, A.; YU, Y.; WANG, H.; ANASETTI, C.; YU, X. Z. Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. **Blood**, v. 117, n. 11, p. 3096-3103, 2011.

SESHASAYEE, D.; VALDEZ, P.; YAN, M.; DIXIT, V. M.; TUMAS, D.; GREWAL, I. S. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. **Immunity**, v. 18, n. 2, p. 279-288, 2003.

SHANKS, G. D.; WHITE, N. J. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infectious Disease*, v.13, n.10, p.900-906, 2013.
SHI, Q.; GAO, Z. Y.; XIE, F.; WANG, L. F.; GU, Y. P.; YANG, T. J.; HUANG, L.; QIAN, Q. H.; QIU, Y. H. A novel monoclonal antibody against human CD80 and its immune protection in a mouse lupus-like disease. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 583-593, 2011.

SIDDIQUI, W. A.; TAM, L. Q.; KRAMER, K. J.; HUI, G. S.; CASE, S. E.; YAMAGA, K. M.; CHANG, S. P.; CHAN, E. B.; KAN, S. C. Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 9, p. 3014-3018, 1987.

SIDEN-KIAMOS, I.; LOUIS, C. Interactions between malaria parasites and their mosquito hosts in the midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 679-685, 2004.

SIGAL, L. H. Basic science for the clinician 55: CTLA-4. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 18, n. 3, p. 155-158, 2012.

SIMPSON, T. R.; QUEZADA, S. A.; ALLISON, J. P. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 326-332, 2010.

SINNWELL, J. P.; SCHAID, D. J. **Haplo.stats: Statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous**. R package version 1.4.4. Disponível em <<http://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>>. Acesso em 29 Abr. 2013.

SMITH, J. D.; CRAIG, A. G.; KRIEK, N.; HUDSON-TAYLOR, D.; KYES, S.; FAGAN, T.; PINCHES, R.; BARUCH, D. I.; NEWBOLD, C. I.; MILLER, L. H. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n.4, p 1766-1771, 2000.

SNOUNOU, G.; PINHEIRO, L.; GONÇALVES, A.; FONSECA, L.; DIAS, F.; BROWN, K. N.; do ROSARIO, V. E. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as show by the analysis of field samples from Guinea Bissau. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 649-653, 1993.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S.I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214-217, 2005.

SOARES IS, LEVITUS G, SOUZA JM, DEL PORTILLO HA, RODRIGUES MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1606-1614, 1997.

SOARES, I. S.; OLIVEIRA, S. G.; SOUZA, J. M.; RODRIGUES, M.M. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, n. 1, p. 13-24, 1999a.

SOARES, I. S.; DA CUNHA, M. G.; SILVA, M. N.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 3, p. 357-363, 1999.

SONG, G. G.; LEE, Y. H. The CTLA-4 and MCP-1 Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Sclerosis: a Meta-analysis. **Immunological Investigations**, v. 42, n. 6, p. 481-492, 2013.

SOUZA-NEIRAS, W. C.; STORTI-MELO, L. M.; CASSIANO, G. C.; COUTO, V. S.; COUTO, A. A.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; CUNHA, M. G.; PÓVOA, M. M.; HERRERA, S.; HERRERA, M. A.; ROSSIT, A. R.; CARARETO, C. M.; MACHADO, R. L. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? **Malaria Journal**, v. 23, n. 9:178, 2010.

SOUZA-SILVA, F. A.; DA SILVA-NUNES, M.; SANCHEZ, B. A.; CERAVOLO, I. P.; MALAFRONTA, R. S.; BRITO, C. F.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 185-193, 2010.

SPERLING, A. I.; AUGER, J. A.; EHST, B. D.; RULIFSON, I. C.; THOMPSON, C. B.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 9, p. 3909-3917, 1996.

STADANLICK, J. E.; CANCRO, M. P. BAFF and the plasticity of peripheral B cell tolerance. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 158-161, 2008.

STEPHENS, H. A.; BROWN, A. E.; CHANDANAYINGYONG, D.; WEBSTER, H. K.; SIRIKONG, M.; LONGTA, P.; VANGSERATTHANA, R.; GORDON, D. M.; LEKMAK, S.; RUNGRUANG, E. 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. 3142-7, 1995.

STEVENSON, M. M.; TAM, M. F.; WOLF, S. F.; SHER, A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 5, p. 2545-2556, 1995.

STORTI-MELO, L. M.; DA COSTA, D. R.; SOUZA-NEIRAS, W. C.; CASSIANO, G. C.; COUTO, V. S.; PÓVOA, M. M.; SOARES, I. DA S.; DE

CARVALHO, L. H.; AREVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S.; ROSSIT, A. R.; CORDEIRO, J. A.; DE MATTOS, L. C.; MACHADO, R. L. 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, n. 2, p. 152-155, 2012.

SUÁREZ-MUTIS, M. C.; CUERVO, P.; LEORATTI, F. M.; MORAES-AVILA, S. L.; FERREIRA, A. W.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 159-164, 2007.

SUN, T.; ZHOU, Y.; YANG, M.; HU, Z.; TAN, W.; HAN, X.; SHI, Y.; YAO, J.; GUO, Y.; YU, D.; TIAN, T.; ZHOU, X.; SHEN, H.; LIN, D. Functional genetic variations in cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p. 7025-7034, 2008.

SUWALSKA, K.; PAWLAK, E.; KARABON, L.; TOMKIEWICZ, A.; DOBOSZ, T.; URBANIAK-KUJDA, D.; KULICZKOWSKI, K.; WOŁOWIEC, D.; JEDYNAK, A.; FRYDECKA, I. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population. **Human Immunology**, v. 69, n. 3, p. 193-201, 2008.

TANG, Q.; HENRIKSEN, K. J.; BODEN, E. K.; TOOLEY, A. J.; YE, J.; SUBUDHI, S. K.; ZHENG, X. X.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3348-3352, 2003.

TARTZ, S.; KAMANOVA, J.; SIMSOVA, M.; SEBO, P.; BOLTE, S.; HEUSSLER, V.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Immunization with a circumsporozoite epitope fused to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against *Plasmodium berghei* liver-stage malaria. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2277-2285, 2006.

TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 58, n. 3-4, p. 163-167, 1998.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; PHILLIPS, R. S.; SEVERN, A.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. **Science**, v. 260, n. 5116, p. 1931-1934, 1993.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; SMITH, E. C. Modulation of experimental blood stage malaria through blockade of the B7/CD28 T-cell costimulatory pathway. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 498-504, 1999.

THOMAS, A. W.; DEANS, J. A.; MITCHELL, G. H.; ALDERSON, T.; COHEN, S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 13, n. 2, p. 187-199, 1984.

THOMPSON, J. S.; BIXLER, S. A.; QIAN, F.; VORA, K.; SCOTT, M. L.; CACHERO, T. G.; HESSION, C.; SCHNEIDER, P.; SIZING, I. D.; MULLEN, C.; STRAUCH, K.; ZAFARI, M.; BENJAMIN, C. D.; TSCHOPP, J.; BROWNING, J. L.; AMBROSE, C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. **Science**, v. 293, n. 5537, p. 2108-2111, 2001.

TIAN, L.; NOELLE, R. J.; LAWRENCE, D. A. Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 306-309, 1995.

TIVOL, E. A.; BORRIELLO, F.; SCHWEITZER, A. N.; LYNCH, W. P.; BLUESTONE, J. A.; SHARPE, A. H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity**, v. 3, n. 5, p. 541-547, 1995.

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.

TORCIA, M. G.; SANTARLASCI, V.; COSMI, L.; CLEMENTE, A.; MAGGI, L.; MANGANO, V. D.; VERRA, F.; BANCONE, G.; NEBIE, I.; SIRIMA, B. S.; LIOTTA, F.; FROSALI, F.; ANGELI, R.; SEVERINI, C.; SANNELLA, A. R.; BONINI, P.; LUCIBELLO, M.; MAGGI, E.; GARACI, E.; COLUZZI, M.; COZZOLINO, F.; ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S.; MODIANO, D. Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low

susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 646-651, 2008.

TOURE, O.; KONATE, S.; SISSOKO, S.; NIANGALY, A.; BARRY, A.; SALL, A. H.; DIARRA, E.; POUDIOUGOU, B.; SEPULVEDA, N.; CAMPINO, S.; ROCKETT, K. A.; CLARK, T. G.; THERA, M. A.; DOUMBO, O.; COLLABORATION WITH THE MALARIAGEN CONSORTIUM. Candidate polymorphisms and severe malaria in a Malian population. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e43987, 2012.

TRAN, T. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; MORENO, A.; SANTOS, F.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; ALTMAN, J. D.; MEYER, E. V.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 244-255, 2005.

TSUBOI, T.; TACHIBANA, M.; KANEKO, O.; TORII, M. Transmission-blocking vaccine of vivax malaria. **Parasitology International**, v. 52, n. 1, p. 1-11, 2003.

TURPEINEN, H.; LAINE, A. P.; NEJENTSEV, S.; SJÖROOS, M.; ILONEN, J.; SIMELL, O.; VEIJOLA, R.; KNIP, M.; AKERBLUM, H. K.; KNIP, M. CD86 gene polymorphisms: no association with Type I diabetes among Finnish subjects. **Diabetologia**, v. 45, n. 7, p. 1041-1042, 2002.

UEDA, H.; HOWSON, J. M.; ESPOSITO, L.; HEWARD, J.; SNOOK, H.; CHAMBERLAIN, G.; RAINBOW, D. B.; HUNTER, K. M.; SMITH, A. N.; DI GENOVA, G.; HERR, M. H.; DAHLMAN, I.; PAYNE, F.; SMYTH, D.; LOWE, C.; TWELLS, R. C.; HOWLETT, S.; HEALY, B.; NUTLAND, S.; RANCE, H. E.; EVERETT, V.; SMINK, L. J.; LAM, A. C.; CORDELL, H. J.; WALKER, N. M.; BORDIN, C.; HULME, J.; MOTZO, C.; CUCCA, F.; HESS, J. F.; METZKER, M. L.; ROGERS, J.; GREGORY, S.; ALLAHABADIA, A.; NITHIYANANTHAN, R.; TUOMILEHTO-WOLF, E.; TUOMILEHTO, J.; BINGLEY, P.; GILLESPIE, K. M.; UNDLIEN, D. E.; RØNNINGEN, K. S.; GUJA, C.; IONESCU-TÎRGOVIȘTE, C.; SAVAGE, D. A.; MAXWELL, A. P.; CARSON, D. J.; PATTERSON, C. C.; FRANKLYN, J. A.; CLAYTON, D. G.; PETERSON, L. B.; WICKER, L. S.; TODD, J. A.; GOUGH, S. C. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 505-511, 2003.

URQUIZA, M.; SUAREZ, J. E.; CARDENAS, C.; LOPEZ, R.; PUENTES, A.; CHAVEZ, F.; CALVO, J. C.; PATARROYO, M. E. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. **Vaccine**, v. 19, n. 4-5, p. 508-513, 2000.

VAIDYA, B.; PEARCE, S. H.; CHARLTON, S.; MARSHALL, N.; ROWAN, A. D.; GRIFFITHS, I. D.; KENDALL-TAYLOR, P.; CAWSTON, T. E.; YOUNG-MIN, S. An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 41, n. 2, p. 180-183, 2002.

VAN BERKEL, M. E.; SCHRIJVER, E. H.; HOFHUIS, F. M.; SHARPE, A. H.; COYLE, A. J.; BROEREN, C. P.; TESSELAAR, K.; OOSTERWEGEL, M. A. ICOS contributes to T cell expansion in CTLA-4 deficient mice. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 182-188, 2005.

VAN DEN EEDE, P.; SOTO-CALLE, V. E.; DELGADO, C.; GAMBOA, D.; GRANDE, T.; RODRIGUEZ, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; ANNÉ, J.; D'ALESSANDRO, U.; ERHART, A. *Plasmodium vivax* sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. **PLoS One**, v. 6, n. 1, e16257, 2011.

VAN KOOTEN, C.; BANCHEREAU, J. CD40-CD40 ligand. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 1, p. 2-17, 2000.

VANBUSKIRK, K. M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J. H. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15754-15759, 2004.

VENUPRASAD, K.; PARAB, P.; PRASAD, D. V.; SHARMA, S.; BANERJEE, P. R.; DESHPANDE, M.; MITRA, D. K.; PAL, S.; BHADRA, R.; MITRA, D.; SAHA, B. Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 5, p. 1536-1543, 2001.

VERSIANI, F. G.; ALMEIDA, M. E.; MELO, G. C.; VERSIANI, F. O.; ORLANDI, P. P.; MARIÚBA, L. A.; SOARES, L. A.; SOUZA, L. P.; DA SILVA BALIEIRO, A. A.; MONTEIRO, W. M.; COSTA, F. T.; DEL

PORTILLO, H. A.; LACERDA, M. V.; NOGUEIRA, P.A. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in *Plasmodium vivax*-infected individuals who did not develop symptoms. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1:294, 2013.

VICENTIN, E. C.; FRANÇOZO, K. S.; ROCHA, M. V.; IOURTOV, D.; DOS SANTOS, F. L.; KUBRUSLY, F. S.; SAKAUCHI, M. A.; RAW, I.; NOSTEN, F.; RÉNIA, L.; RODRIGUES, M. M.; RUSSELL, B.; SOARES, I. S. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. **Infection and Immunity**, 2013.

VILLA, A.; NOTARANGELO, L. D.; DI SANTO, J. P.; MACCHI, P. P.; STRINA, D.; FRATTINI, A.; LUCCHINI, F.; PATROSSO, C. M.; GILIANI, S.; MANTUANO, E. Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 6, p. 2110-2114, 1994.

VINH, A.; CHEN, W.; BLINDER, Y.; WEISS, D.; TAYLOR, W. R.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M.; HARRISON, D. G.; GUZIK, T. J. Inhibition and genetic ablation of the B7/CD28 T-cell costimulation axis prevents experimental hypertension. **Circulation**, v. 122, n.24, p. 2529-2537, 2010.

VIOLA, A.; SCHROEDER, S.; SAKAKIBARA, Y.; LANZAVECCHIA, A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. **Science**, v. 283, n. 5402, p. 680-682, 1999.

VOLNEY, B.; POULIQUEN, J. F.; de THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 82, n. 1, p. 11-23, 2002.

VON BÜLOW, G. U.; VAN DEURSEN, J. M.; BRAM, R. J. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. **Immunity**, v. 14, n. 5, p. 573-582, 2001.

VON DER WEID, T.; HONARVAR, N.; LANGHORNE, J. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 7, p. 2510-2516, 1996.

WÄHLIN, B.; WAHLGREN, M.; PERLMANN, H.; BERZINS, K.; BJÖRKMAN, A.; PATARROYO, M. E.; PERLMANN, P. 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, n. 24, p. 7912-7916, 1984.

WALTHER, M.; WOODRUFF, J.; EDELE, F.; JEFFRIES, D.; TONGREN, J. E.; KING, E.; ANDREWS, L.; BEJON, P.; GILBERT, S. C.; DE SOUZA, J. B.; SINDEN, R.; HILL, A. V.; RILEY, E. M. 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, n. 8, p. 5736-5745, 2006.

WALUNAS, T. L.; BAKKER, C. Y.; BLUESTONE, J. A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 6, p. 2541-2550, 1996.

WALUNAS, T. L.; LENSCHOW, D. J.; BAKKER, C. Y.; LINSLEY, P. S.; FREEMAN, G. J.; GREEN, J. M.; THOMPSON, C. B.; BLUESTONE, J. A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**, v. 1, n. 5, p. 405-413, 1994.

WANG, J.; ZHOU, Y.; FENG, D.; YANG, H.; LI, F.; CAO, Q.; WANG, A.; XING, F. CD86 +1057G/A polymorphism and susceptibility to Ewing's sarcoma: a case-control study. **DNA and Cell Biology**, v. 31, n. 4, p. 537-540, 2012.

WANG, W.; SONG, H.; LIU, J.; SONG, B.; CAO, X. CD86 + 1057G/A polymorphism and susceptibility to osteosarcoma. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 11, p. 925-929, 2011.

WARMERDAM, P. A.; PARREN, P. W.; VLUG, A.; AARDEN, L. A.; VAN DE WINKEL, J. G.; CAPEL, P. J. Polymorphism of the human Fc gamma receptor II (CD32): molecular basis and functional aspects. **Immunobiology**, v. 185, n. 2-4, p. 175-182, 1992.

WARNES, G.; GORJANC, G.; LEISCH, F.; MAN, M. **Genetics: Population Genetics**. R package version 1.3.6. 2011. Disponível em <<http://CRAN.R-project.org/package=genetics>>. Acesso em 30 Jul. 2012.

WASSINK, L.; VIEIRA, P. L.; SMITS, H. H.; KINGSBURY, G. A.; COYLE, A. J.; KAPSENBERG, M. L.; WIERENGA, E. A. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. **Journal of Immunology**, v. 73, n. 3, p. 1779-1786, 2004.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 297, 2011.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. New York, Ed. Springer, 2009.

WOEHLBIER, U.; EPP, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; BUJARD, H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. **Malaria Journal**, v. 9, n. 77, 2010.

WOERLY, G.; LACY, P.; YOUNES, A. B.; ROGER, N.; LOISEAU, S.; MOQBEL, R.; CAPRON, M. Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 4, p. 769-779, 2002.

WOLDEAREGAI, T. G.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F.; MORDMÜLLER, B. *Plasmodium vivax* malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 328-331, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report 2013**. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2013.

WYKES, M.; POUDRIER, J.; LINDSTEDT, R.; GRAY, D. Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 548-559, 1998.

XAINLI, J.; ADAMS, J. H.; KING, C. L. The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, p. 253-260, 2000.

XIANG, H.; ZHAO, W.; SUN, Y.; QIAN, W.; XING, J.; ZHOU, Y.; YAO, J.; XU, J.; WANG, Y.; YAO, H.; HU, Z. CD86 gene variants and susceptibility to pancreatic cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 138, n. 12, p. 2061-2067, 2012.

XIONG, Y. H.; HE, L.; FEI, J. Genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 and susceptibility to cervical cancer. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 71-76, 2013.

XU S, LAM KP. B cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. **Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 4067-4074, 2001.

XU, J.; FOY, T. M.; LAMAN, J. D.; ELLIOTT, E. A.; DUNN, J. J.; WALDSCHMIDT, T. J.; ELSEMORE, J.; NOELLE, R. J.; FLAVELL, R. A. Mice deficient for the CD40 ligand. **Immunity**, v. 1, n. 5, p. 423-431, 1994.
XYDIA, M.; GE, Y.; QUITSCH, U.; BECKHOVE, P. CD40L co-stimulation from CD8+ to CD4+ effector memory T cells supports CD4+ expansion. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 6, p. 670-680, 2011.

YAN, M.; WANG, H.; CHAN, B.; ROOSE-GIRMA, M.; ERICKSON, S.; BAKER, T.; TUMAS, D.; GREWAL, I. S.; DIXIT, V. M. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. **Nature Immunology**, v. 2, n. 7, p. 638-643, 2001.

YANAGAWA, T.; HIDAKA, Y.; GUIMARAES, V.; SOLIMAN, M.; DEGROOT, L. J. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 1, p. 41-45, 1995.

YAO, Y. F.; ZHOU, Y. M.; XIANG, J. B.; GU, X. D.; CAI, D. Inhibition of arterial allograft intimal hyperplasia using recipient dendritic cells pretreated with B7 antisense peptide. **Clinical & Development Immunology**, v. 2012:892687, 2012.

YING, H.; YANG, L.; QIAO, G.; LI, Z.; ZHANG, L.; YIN, F.; XIE, D.; ZHANG, J. Cutting edge: CTLA-4--B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 3, p. 1375-1378, 2010.

YOUINOU, P.; SARAUX, A.; PERS, J. O. B-Lymphocytes govern the pathogenesis of Sjogren's syndrome. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 10, p. 2071-2077, 2012.

ZAYED, R. A.; SHEBA, H. F.; ABO ELAZAEM, M. A.; ELSAADANY, Z. A.; ELMESSERY, L. O.; MAHMOUD, J. A.; ABDEL RAHMAN, D. R.; ABDOU, F. R. B-cell activating factor promoter polymorphisms in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. **Annals of Clinical and Laboratory Sciences**, v. 43, n. 3, p. 289-294, 2013.

ZHANG, R.; HUYNH, A.; WHITCHER, G.; CHANG, J.; MALTZMAN, J. S.; TURKA, L. A. An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 2, p. 580-593, 2013.

ANEXO I

1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

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

Parecer n.º 407/2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 4599/2011 sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Dantas Machado**, com o título "Influência de polimorfismos em genes associados na produção de anticorpos contra diferentes antígenos candidatos à vacina em indivíduos com Malária Vivax no Estado do Pará" 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, 11 de outubro de 2011.


Prof. Dr. **Fernando Batigália**
Presidente do CEP/FAMERP

ANEXO II**Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population**

Gustavo Capatti Cassiano^{1,3}, Eduardo José Melo Santos², Maria Helena Thomaz Maia², Adriana da Cruz Furini³, Luciane Moreno Storti-Melo⁴, Franciele Maira Batista Tomaz³, Pamella Cristina Alves Trindade³, Marcela Petrolini Capobianco¹, Marcos Antônio Trindade Amador⁵, Giselle Maria Rachid Viana⁶, Marinete Marins Póvoa⁶, Sidney Emanuel Batista Santos⁵, Ricardo Luiz Dantas Machado^{1,6}

¹Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Brazil

²Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, Brazil

³Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Centro de Investigação de Microrganismos, São José do Rio Preto, Brazil

⁴Universidade Federal do Sergipe, Departamento de Biociências, Itabaiana, Brazil

⁵Universidade Federal do Pará, Laboratório de Genética Humana e Médica, Belém, Brazil

⁶Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ananindeua, Brazil

Correspondence

Gustavo Capatti Cassiano

Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

São José do Rio Preto, Brazil

Email: gcapatti@hotmail.com

Telephone/fax number: +55 17 32015736

Abstract

Co-stimulatory molecules are essential in the orchestration of immune response and polymorphisms in their genes are associated with various diseases. However, in the case of variable allele frequencies among continental populations, this variation can lead to biases in genetic studies conducted in admixed populations such as those from Brazil. The aim of this study was to evaluate the influence of genomic ancestry on distributions of co-stimulatory genes polymorphisms in an admixed Brazilian population. A total of unrelated 266 individuals from the north of Brazil participated in this study. Nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 7 genes (*CD28*, *CTLA4*, *ICOS*, *CD86*, *CD40*, *CD40L* e *BLYS*) were determined by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). We also investigated 48 insertion/deletion ancestry markers to characterize individual African, European and Amerindian ancestry proportions in the samples. The genomic ancestry analysis showed that the main contribution was European (43.9%) but also a significant contribution of African (31.6%) and Amerindian (24.5%) ancestry. *ICOS*, *CD40L* and *CD86* polymorphisms were associated with genomic ancestry. However there were no significant differences in the proportions of ancestry for the other SNPs and haplotypes studied. Our findings reinforce the need to apply AIMs in genetic association studies involving these polymorphisms in the Brazilian population.

Keywords: admixture population, ancestry markers, co-stimulatory genes, immunogenetics, polymorphism

Introduction

The development of an immune response depends on a complex network of cells and is essential to protect humans against infectious agents and the appearance of autoimmune diseases and tumors. T cells have a critical role in the development of the immune response however these cells require two independent

signals for them to become completely activated. The first signal is triggered by the binding of the T cell receptor (TCR) to an antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex molecule (MHC). The second signal is provided by co-stimulatory molecules; the binding of the CD28 receptor to CD80 and CD86 molecules is essential for the activation of T cells (1). However, another molecule called CTLA-4 can also bind to CD80 and CD86 molecules which, instead to providing a positive stimulation, exert a regulatory role by reducing the generated response. This process is crucial for homeostasis and immune tolerance (2). Another stimulatory receptor expressed on the surface of T cells is called ICOS; the gene of this molecule is located close to the *CD28* and *CTLA4* genes in the 2q33 chromosomal region. The interactions between B cells and activated T cells, mediated by CD40/CD40L signaling, also indirectly acts on T cell activation, but this signaling pathway is critical to B lymphocyte activation and so, in the development of the humoral immune response. Another molecule, BLyS, expressed on the surface of T cells and also in soluble form, modulates the survival and proliferation of B cells through three different receptors: BR3, TACI and BCMA (3).

An adequate immune response must maintain a balance between the ability to respond to infectious agents and to suppress autoimmunity. Thus, polymorphisms associated with the modulation of gene expression of co-stimulatory molecules can influence the development of several diseases. In recent years, several studies have investigated associations between autoimmune diseases and the 2q33 region, mainly focusing on *CTLA4* gene polymorphisms (4). Two *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in this gene, one located in the promoter region (-318C>T) and the other located in exon 1 (+49A>G) have been associated with various diseases. The latter has previously been shown to have a functional effect on the expression of CTLA-4 (5). The diseases associated with these two SNPs in different ethnic groups include type 1 diabetes (6), Henoch-Schonlein Purpura (7), Graves' disease (8), rheumatoid arthritis (9), pemphigus foliaceus (10), systemic sclerosis (11) and systemic lupus erythematosus (12, 13). Little is known about the functional role of other polymorphisms in the 2q33

region. One SNP, $+17T>C$, in the third intron of the *CD28* gene, is located close to a splicing site and so it is suggested that this polymorphism may affect the expression of the molecule; it has been associated with some types of cancer (14, 15) and rheumatoid arthritis (16). Teutsch et al. (17) detected another polymorphism with a substitution of guanine for adenine at position -372 in the promoter region of the *CD28* gene in Australians. Even though these authors suggested possible implications of this SNP on gene expression this polymorphism has not been investigated in other populations with the exception of one study in Brazil (18). Another SNP which has been poorly investigated is the $+1564T>C$ polymorphism in the *ICOS* gene; allele frequencies are only available for Europeans (in particular Scandinavians) (19, 20) and Brazilians (21, 22). The $+1057G>A$ polymorphism in the *CD86* gene has been extensively studied in Asians. This SNP, located in exon 8, causes a substitution of alanine for threonine and has been associated with asthma (23), colorectal cancer (24) and osteosarcoma (25).

Recently, after recognizing that B cells as well as T cells may be important in the development of autoimmune diseases, polymorphisms in genes that participate in the co-stimulation of these cells have started to be investigated. Of these, the most studied polymorphism, the $-1C>T$ SNP in the *CD40* gene, has been investigated in some diseases, including multiple sclerosis (26), non-Hodgkin lymphoma (27), Crohn's disease (28), osteoporosis (29) and Behcet's syndrome (30). The $-726T>C$ polymorphism in the *CD40L* gene located on X chromosome has been studied almost exclusively in African populations due to its association with the most severe forms of malaria falciparum (31, 32). In respect to the *BLYS* gene, the $-871C>T$ polymorphism has been associated with systemic lupus erythematosus (33) and idiopathic thrombocytopenic purpura (34).

Although several studies have shown associations between polymorphisms in co-stimulatory genes and diseases, studies in other populations have failed to reproduce the results. One of the reasons may be due to variable allele frequencies in different populations, which result in a lack of statistical power. For example, geographical gradients in the distribution of *CTLA4* alleles have been well

documented (35). Population structure also has been presumed to cause many of the unreplicated disease-marker associations reported in the literature, particularly in admixed populations.

Brazil has one of the most diverse populations in the world resulting from five centuries of interethnic breeding between Europeans, Africans and Amerindians. It has been shown that due to the intense miscegenation of the Brazilian population, indicators of physical appearance, such as skin color, are poor indicators of genomic ancestry (36 – 38). Some studies have shown that the distribution of pharmacogenetic polymorphisms in the Brazilian population is best characterized using ancestry informative markers (AIMs) instead of self-declaration of ethnicity (39 – 41). In fact, nowadays it is recognized that ethnicity can be better studied with AIMs, which enable a better understanding of the relationship between the various ethnic components and the variability of these co-stimulatory genes. Thus, the objective of the present study was to describe the allele frequencies of nine SNPs distributed across seven co-stimulatory genes (*CD28*, *CTLA4*, *ICOS*, *CD86*, *CD40*, *CD40L* and *BLYS*) and assess the impact of Brazilian population admixture on the distribution of these polymorphisms using AIMs.

Material and Methods

Sample

The sample of this study was composed of 273 (175 men and 91 women) unrelated subjects from the town of Goianésia do Pará (03° 50' 33" S; 49° 05' 49" W), located in the southeastern region of the State of Pará in the north of Brazil. All the participants signed informed consent forms. The project was approved by the Research Ethics Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto (FAMERP 45992011). The DNA was extracted from peripheral blood samples using the Easy-DNATM extraction kit (Invitrogen, California, USA).

Genotyping

The following SNPs were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP): $-372G>A$ (rs35593994) and $+17T>C$ (rs3116496) in the *CD28* gene, $-318C>T$ (rs5742909) and $+49A>G$ (rs231775) in the *CTLA4* gene, $+1564T>C$ (rs4675378) in the *ICOS* gene, $+1057G>A$ (rs4404254) in the *CD86* gene, $-726T>C$ (rs3092945) in the *CD40L* gene, $-1C>T$ (rs1883832) in the *CD40* gene and $-871C>T$ (rs9514828) in the *BLYS* gene. All PCR reactions were performed in a final volume of 25 μ L containing 1x Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.4 pmol of each primer and 0.5 U of Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brazil). Amplifications were made in a MasterCycler DNA thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) under the following conditions: an initial step of 5 minutes at 94°C, 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at an annealing temperature depending on the primer and 1 minute at 72°C, and a final step of 10 minutes at 72°C. The sequences of the primers as well as the annealing temperatures used in each reaction are shown in Table 1. The amplification products were viewed in agarose gel after staining with 2% GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) and were digested using enzymes of the Fermentas company (Vilnius, Lithuania) according to manufacturer's instructions. The enzymes used, as well as the size of the fragments resulting from the digestion of each polymorphism are shown in Table 1. The digestion products were stained with 2.5% GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) and viewed in agarose gel with the exception of the *CD40 -1C>T* and *CTLA4 -318C>T* polymorphisms, which were viewed in 12.5% polyacrylamide gel after staining with ethidium bromide.

Determination of ancestry

Genotyping to determine ancestry was carried out using 48 INDEL-type markers (insertion/deletion) that have been standardized and validated (42). The markers were selected employing two main criteria: significant differences in allele frequencies between Africans, Europeans and/or Amerindians ($\geq 40\%$) and located on different chromosomes or in distant physical regions when on the same

chromosome. The PCR reactions were carried out on three multiplex systems, each one containing 16 pairs of fluorescent-labeled primers. Electrophoresis was carried out in an automatic sequencer (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystems). The sequences of the primers as well as the conditions of cycling and of capillary electrophoresis are described by Santos et al. (42).

Statistical analysis

The program Structure version 2.3.4 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>) was used to estimate the individual interethnic admixture. Allele and genotype frequencies for each variant were obtained using the genetics package (43). Using this package, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were evaluated by the Chi-square test and the linkage disequilibrium between pairs of loci was analyzed using parameter D'. Haplotype frequencies were estimated by the maximum likelihood method which uses the expectation-maximization algorithm which is part of the haplo.stats package (44). Analysis of variance (ANOVA) and Student's t test were used to test differences in the proportions of each of the ancestries between different genotypes. A binary logistic regression model was built to graphically explore the association of polymorphisms with individual estimated ancestry using the ggplot2 package (45). All packages were implemented employing the R computer program, version 2.11.1 (<http://www.r-project.org>). P-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Distribution of polymorphisms according to ancestry

The genotype frequencies of the nine SNPs studied are shown in Table 2. All polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequencies found in the current study, as well as in other geographical populations are presented in Table 3.

Variance analysis used to test the difference of each ancestry between the different genotypes demonstrated that the mean proportions of African ancestry differed significantly between the genotypes of the $+1564T>C$ SNP in the *ICOS* gene (p-value = 0.003). The Tukey post hoc test indicated that the mean African ancestry was higher for the *CC* genotype than for the *TC* (p-value = 0.01) and *TT* genotypes (p-value = 0.002). As the *CD40L* gene is on the X chromosome, analyses of the $-726T>C$ SNP in this gene were performed separately for men and women. The mean proportion of African ancestry was higher in men with the *C* allele than those with the *T* allele (p-value = 0.02). Moreover, men with the *T* allele had a higher average proportion of European ancestry compared to men with the *C* allele (p-value = 0.008). There were no significant differences in the proportions of ancestry for the other SNPs studied (Table 2).

The population was divided into four quartiles according to the proportion of ancestry (< 0.25; 0.25-0.50; 0.50-0.75; > 0.75) and the allele frequencies of all the SNPs were determined for each quartile. The Chi-square test for trend identified a significant decrease in the frequency of the $-726T$ allele of the *CD40L* gene parallel to the increase in African ancestry (p-value = 0.01) and a significant increase in the frequency of this allele together with increases in European ancestry (p-value = 0.007). In relation to the $+1564T$ allele of the *ICOS* gene, there was a significant decrease in the frequency of this allele as African ancestry increased (p-value < 0.00001).

Binary logistic regression, using the generalized linear model and implemented in the program R, was employed to graphically explore the association between polymorphisms and ancestry. The results, presented in Figure 1, show that the chance of having at least one *T* allele for the -726 SNP of the *CD40L* gene continuously decreases as African ancestry increases (p-value = 0.008). Furthermore, the chance of having this allele increases as the European ancestry increases (p-value = 0.01). In relation to the $+1564T>C$ SNP in the *ICOS* gene, the chance of having the *T* allele decreases as African ancestry increases (p-value = 0.001). The chance of an individual having the $+1057A$ allele in the *CD86* gene increases as the European ancestry increases (p-value = 0.02).

Linkage disequilibrium and haplotypes

Linkage disequilibrium were evaluated using the statistical parameter D' , between all pairs of SNPs in the *CD28*, *CTLA4* and *ICOS* genes located in the chromosome 2q33 region. There was absolute linkage *disequilibrium* (D') only between the *CD28* -372G>A and *CD28* +17T>C SNPs and between the *CD28* -372G>A and *CTLA4* -318C>T SNPs. The value of D' varied for the other pairs of SNPs (Table 3).

Eighteen haplotypes of the *CD28*, *CTLA4* and *ICOS* genes were found in the study sample with frequencies ranging from 0.002 to 0.194 (Table 4). The haplo.stats computer program whose function haplo.score generates a score for each haplotype (hap.score), as well as a p-value for each hap.score was used to assess whether a given haplotype is associated with differences in the proportions of ancestry. A positive/negative score for a given haplotype suggest that the haplotype is associated with an increase/decrease in ancestry. Only haplotypes with frequencies higher than 0.01 were included in the analysis. The GTCGT, GTCGC and ATCGC haplotypes had significant associations with African ancestry, and the GTCGT haplotype presented a significant association with European ancestry. However, when the Bonferroni correction was applied (corrected p-value < 0.004), these differences were no longer significant.

Estimate of ancestry

The genotypes of the sample population from Goianésia do Pará and parental populations (Europeans, Africans and Amerindians) were analyzed together, assuming $K = 3$. The analysis showed that the study sample is composed of individuals who possess an average of 43.9% European ancestry (ranging from 16.2% to 70.5%), 31.6% African (ranging from 11.4% to 66.4%) and 24.5% Amerindian (ranging from 8.3% to 57.3%). The results are shown in Figure 2.

Discussion

Several studies on the genomic ancestry of the Brazilian population corroborate historical data of a tri-hybrid parental composition (Europeans,

Africans and Amerindians) (37, 42, 52, 53). Analysis using AIMS demonstrates that the population of Goianésia do Pará, a town located in the north of Brazil, presents greater contribution from European ancestry (43.9%), and smaller, albeit significant, contributions from African and Amerindian ancestries (31.6% and 24.5%, respectively). These values are similar to other Brazilian populations, although the proportion of African ancestry in this study was higher than other populations of the northern region of Brazil with contributions ranging from 12 to 25% (42, 54 – 56). This variation might be explained by the large presence of individuals from the northeastern region of Brazil in the studied population, where the contribution of African ancestry is admittedly greater than in other regions of Brazil (37, 57).

Nine polymorphisms in seven co-stimulatory genes (*CD28*, *CTLA4*, *ICOS*, *CD86*, *CD40*, *CD40L* and *BLYS*) were analyzed in this study; we evaluated the impact of the Brazilian population admixture on the distribution of these polymorphisms. We report a significant decrease in the frequency of the *ICOS* +1564*T* allele with increasing African ancestry. Although there is no information available about the frequency of this allele in African populations, the frequency of the *T* allele found in this study was lower than in two Northern Europe populations (20, 58). This difference probably reflects the substantial African contribution in the sample of the current study. The *CD40L* -726*T*>*C* SNP is also significantly associated with ancestry; the *T* allele frequency has a reverse relationship with African ancestry and its frequency increases with the increase in European ancestry. These observations are consistent with data from HapMap, which show a lower prevalence of this allele in African populations compared to Europeans, specifically Italians, who were the second largest source of Brazilian immigration.

Using a logistic regression model, we showed that the chance of an individual possessing the *CD86* +1057*A* allele is enhanced with the increase in European ancestry. This polymorphism has often been assessed in studies of associations with autoimmune diseases and cancer in Asian populations (59 – 62), but information about the frequency of this SNP in other populations are scarce.

Our results are in accordance with data available from HapMap, which report a higher frequency of the allele in the European population compared to an African population. Beltrame et al. (48) evaluated this polymorphism in populations of different ancestries and found that the *G* allele is more common, with the exception of the Japanese population, where an inversion of the allele frequencies exists with the *A* allele being the most prevalent. As some Amerindian groups have lower frequencies of the *A* allele, the authors suggest that this change in allele frequencies occurred recently on the Asian continent. Although the frequency of the allele is lower in Amerindian populations, we found no significant association in respect to this allele with Amerindian ancestry.

We found no association of ancestry with the other evaluated SNPs. Previous studies on the Brazilian population compared allele frequencies of polymorphisms between Euro- and Afro-Brazilians (Table 3). Differences were only found with the *CD28 +17T>C* and *CD40 -1C>T* SNPs (21, 49); this is not in accordance with our results. These differences may be due to the fact that in these studies, the classification of Euro- and Afro-Brazilians was performed using morphological features and/or self-declaration of ethnicity, indicators that have been demonstrated as poor to describe genomic ancestry (36 – 38). However, differences in allele frequencies of these two SNPs, as well as the *BLYS -871C>T* SNP are evident when the HapMap data are assessed. Hence, it is possible that these populations differ in their allele frequencies compared to the parental populations that formed the population of Goianésia do Pará, which could thus explain the absence of any association of these polymorphisms with ancestry in our study.

The tests of associations between ancestry and haplotypes showed no significant effect of the stratification of the population on the distribution of haplotypes. This corroborates the study of Pincerati et al. (18), who also found no significant differences in the frequencies in the haplotype frequencies of the *CD28* and *CTLA4* genes between Euro- and Afro-Brazilians. Although Butty et al. (63) demonstrated differences in the distribution of haplotypes of the *CD28*, *CTLA4* and *ICOS* genes between different geographical populations, the intense process

of miscegenation of the Brazilian population may have eliminated patterns of linkage disequilibrium in parental populations and changed the haplotype frequencies. Previous studies on the haplotype diversity of other genes have shown differences in haplotype frequencies between the Brazilian population and other populations, including Europeans and Africans (64, 65).

Information on genotype and allele frequencies, as well as estimates of haplotype frequencies and their associations with the levels of ancestry are fundamental in mixed populations, since the population structure can lead to spurious results in genetic association studies. In this study we describe the association of SNPs in co-stimulatory genes with ancestry in the Brazilian population. Our findings reinforce the need to apply AIMs in genetic association studies involving these polymorphisms in the Brazilian population.

Acknowledgments

To David Andrew Hewitt for the English revision of this manuscript. Funding support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Competing interests

The authors have declared no conflicting interests.

References

1. Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P. Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes. *Immunol Lett* 2010; 128: 89-97.
2. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 Family Revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-48.

3. Scholz JL, Oropallo MA, Sindhava V, Goenka R, Cancro MP. The role of B lymphocyte stimulator in B cell biology: implications for the treatment of lupus. *Lupus* 2013; 22: 350-60.
4. Deitiker P, Atassi MZ. Non-MHC genes linked to autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32: 193-285.
5. Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene (exon 1 + 49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002; 54: 1-8.
6. Benmansour J, Stayoussef M, Al-Jenaidi FA et al. Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1473-7.
7. Wang JJ, Shi YP, Yue H, Chun W, Zou LP. CTLA-4 exon 1 +49A/G polymorphism is associated with renal involvement in pediatric Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 2059-64.
8. Si X, Zhang X, Tang W, Luo Y. Association between the CTLA-4 +49A/G polymorphism and Graves' disease: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 2012; 4: 538-44.
9. Li X, Zhang C, Zhang J et al. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *J Clin Immunol* 2012; 32: 530-9.
10. Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell

coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. *Hum Immunol* 2010; 71: 809-17.

11. Song GG, Lee YH. The CTLA-4 and MCP-1 Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Sclerosis: a Meta-analysis. *Immunol Invest* 2013; 42: 481-92.

12. Chang WW, Zhang L, Yao YS, Su H. Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 9159-65.

13. Hughes T, Adler A, Kelly JA et al. Evidence for gene-gene epistatic interactions among susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 485-92.

14. Suwalska K, Pawlak E, Karabon L et al. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population. *Hum Immunol* 2008; 69: 193-201.

15. Chen X, Li H, Qiao Y et al. Association of CD28 gene polymorphism with cervical cancer risk in a Chinese population. *Int J Immunogenet* 2011; 38: 51-4.

16. Ledezma-Lozano IY, Padilla-Martínez JJ, Leyva-Torres SD et al. Association of CD28 IVS3 +17T/C polymorphism with soluble CD28 in rheumatoid arthritis. *Dis Markers* 2011; 30: 25-9.

17. Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RN, Stewart GJ. Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. *J Neuroimmunol* 2004; 148: 218-30.

18. Pincerati MR, Dalla-Costa R, Pavoni DP, Petzl-Erler ML. Genetic polymorphisms of the T-cell coreceptors CD28 and CTLA-4 in Afro- and Euro-Brazilians. *Int J Immunogenet* 2010; 37: 253-61.
19. Haimila KE, Partanen JA, Holopainen PM. Genetic polymorphism of the human ICOS gene. *Immunogenetics* 2002; 53: 1028-32.
20. Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Gyllensten UB. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2010; 116: 544-8.
21. Guzman VB, Morgun A, Shulzhenko N et al. Characterization of CD28, CTLA4, and ICOS polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. *Hum Immunol* 2005; 66: 773-6.
22. Pendeloski KP, Sass N, Torloni MR et al. Immunoregulatory gene polymorphisms in women with preeclampsia. *Hypertens Res* 2011; 34: 384-8.
23. Corydon TJ, Haagerup A, Jensen TG et al. A functional CD86 polymorphism associated with asthma and related allergic disorders. *J Med Genet* 2007; 44: 509-15.
24. Pan XM, Gao LB, Liang WB et al. CD86 +1057 G/A polymorphism and the risk of colorectal cancer. *DNA Cell Biol* 2010; 29: 381-6.
25. Wang W, Song H, Liu J, Song B, Cao X. CD86 +1057G/A polymorphism and susceptibility to osteosarcoma. *DNA Cell Biol* 2011; 30: 925-9.
26. Sokolova EA, Malkova NA, Korobko DS et al. Association of SNPs of CD40 gene with multiple sclerosis in Russians. *PLoS One* 2013; 8: e61032.

27. Nieters A, Bracci PM, de Sanjosé S et al. A functional TNFRSF5 polymorphism and risk of non-Hodgkin lymphoma, a pooled analysis. *Int J Cancer* 2011; 128: 1481-5.
28. Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A et al. CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. *PloS One* 2010; 5: e11520.
29. Pineda B, Tarín JJ, Hermenegildo C, Laporta P, Cano A, García-Pérez MÁ. Gene interaction between CD40 and CD40L reduces bone mineral density and increases osteoporosis risk in women. *Osteoporos Int* 2011; 22: 1451-8.
30. Chen F, Hou S, Jiang Z et al. CD40 gene polymorphisms confer risk of Behcet's disease but not of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in a Han Chinese population. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 47-51.
31. Sabeti P, Usen S, Farhadian S et al. CD40L association with protection from severe malaria. *Genes Immun* 2002; 3: 286-91.
32. Manjurano A, Clark TG, Nadjm B et al. Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzanian population. *PLoS One* 2012; 7: e47463.
33. Zayed RA, Sheba HF, Abo Elazaem MA et al. B-cell activating factor promoter polymorphisms in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci* 2013; 43: 289-94.
34. Emmerich F, Bal G, Barakat A et al. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007; 136: 309-14.

35. Holopainen P, Naluai AT, Moodie S et al. Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. *Tissue Antigens* 2004; 63: 212-22.
36. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 177-82.
37. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.
38. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One* 2013; 8: e62005.
39. Suarez-Kurtz G, Pena SD, Struchiner CJ, Hutz MH. Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. *Front Pharmacol* 2012; 3: 191.
40. Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, Bastos-Rodrigues L, Pena SD. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 765-71.
41. Vargens DD, Almendra L, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of the GNB3 825C>T polymorphism among Brazilians: impact of population structure. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 253-6.
42. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010 31: 184-90.

43. Warnes G, Gorjanc G, Leisch F, Man M. Genetics: Population Genetics. R package version 1.3.6 2011. <http://CRAN.R-project.org/package=genetics>. Accessed 30 July 2012
44. Sinnwell JP, Schaid DJ. haplo.stats: Statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous. R package version 1.4.4 2009. <http://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>. Accessed 29 April 2013
45. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer, New York, 2009.
46. Silva M, Moreira P, da Costa G et al. Association of CD28 and CTLA-4 gene polymorphisms with aggressive periodontitis in Brazilians. *Oral Dis* 2013; 19: 568-76.
47. Pavoni DP, Cerqueira LB, Roxo VM, Petzl-Erler ML. Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1227-32.
48. Beltrame MH, Pincerati MR, Dalla-Costa R et al. CD80 and CD86 polymorphisms in populations of various ancestries: 5 new CD80 promoter alleles. *Hum Immunol* 2012; 73: 111-17.
49. Malheiros D, Petzl-Erler ML. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genes Immun* 2009; 10: 547-58.
50. Capobianco MP, Cassiano GC, Furini AA et al. No evidence for association of the CD40, CD40L and BLYS polymorphisms, B-cell co-stimulatory molecules,

with Brazilian endemic *Plasmodium vivax* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 2013; 107: 377-83.

51. Christofolini DM, Cavaleiro CM, Teles JS et al. Promoter -817C>T variant of B lymphocyte stimulator gene (BLyS) and susceptibility to endometriosis-related infertility and idiopathic infertility in Brazilian population. Scand J Immunol 2011; 74: 628-31.

52. da Costa-Francez PA, Rodrigues EM, Frazão GF, dos Reis Borges ND, dos Santos SE. Allelic frequencies and statistical data obtained from 12 codis STR loci in an admixed population of the Brazilian Amazon. Genet Mol Biol 2011; 34: 35-9.

53. Francez PA, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SE. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. Forensic Sci Int Genet 2012; 6: 132-5.

54. Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM et al. Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. Lupus 2011; 20: 265-73.

55. Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DR et al. Population genetics of GYPB and association study between GYPB*S/s polymorphism and susceptibility to *P. falciparum* infection in the Brazilian Amazon. PLoS One 2011; 6: e16123.

56. Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MD et al. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. Malar J 2012; 11: 409.

57. Ettinger NA, Duggal P, Braz RF et al. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 304-13.
58. Haimila K, Smedberg T, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J, Holopainen P. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes Immun* 2004; 5: 85-92.
59. Liao WL, Chen RH, Lin HJ et al. The association between polymorphisms of B7 molecules (CD80 and CD86) and Graves' ophthalmopathy in a Taiwanese population. *Ophthalmology* 2011; 118: 553-7.
60. Wang J, Zhou Y, Feng D et al. CD86 +1057G/A polymorphism and susceptibility to Ewing's sarcoma: a case-control study. *DNA Cell Biol* 2012; 31: 537-40.
61. Xiang H, Zhao W, Sun Y et al. CD86 gene variants and susceptibility to pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 2061-7.
62. Liu CP, Jiang JA, Wang T et al. CTLA-4 and CD86 genetic variants and haplotypes in patients with rheumatoid arthritis in southeastern China. *Genet Mol Res* 2013; 12: 1373-82.
63. Butty V, Roy M, Sabeti P, Besse W, Benoist C, Mathis D. Signatures of strong population differentiation shape extended haplotypes across the human CD28, CTLA4, and ICOS costimulatory genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 570-5.
64. Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics* 2003; 54: 896-9.

65. Lins TC, Vieira RG, Grattapaglia D, Pereira RW. Population analysis of vitamin D receptor polymorphisms and the role of genetic ancestry in an admixed population. *Genet Mol Biol* 2011; 34: 377-85.

Table 1 Location of SNPs, primers, annealing temperatures, restriction enzymes used for genotyping and length of fragments resulting from PCR-RFLP

SNP	Chromosome region	Location	Primer 5'-3' (forward)	Primer 5'-3' (reverse)	Annealing temperature (°C)	Restriction enzyme	Fragments length (pb)
<i>CD28 -372G>A</i>	2q33	204570826	TTCTCATTCTGTTGCCCTGGC	CACCATCCCCTTAGGGCACAT	62	<i>HinfI</i>	G: 468 + 78 A: 546
<i>CD28 +17T>C</i>	2q33	204594512	GAAACACCTTTGTCCAAGTC	CTCAATGCCTTCTGGGAAATC	52	<i>AclI</i>	T: 333 C: 193 + 140
<i>CTLA4 -318C>T</i>	2q33	204732347	GGGATTTAGGAGGACCCTTG	GTGCACACACAGAAGGCACT	48	<i>MseI</i>	C: 244 T: 179 + 65
<i>CTLA4 +49A>G</i>	2q33	204732714	CTGAACACCGCTCCCATAAA	CACTGCCTTTGACTGCTGAA	50	<i>BbvI</i>	A: 215 G: 159 + 56
<i>ICOS +1564T>C</i>	2q33	204819570	TTACCAAGACTTTAGATGCTTTCTT	GAATCTTTCTAGCCAAATCATATTC	55	<i>AluI</i>	T: 385 + 339 + 99 C: 339 + 289 + 99 + 96
<i>CD86 +1057G>A</i>	3q21	121838319	CTGTTCCAATGGCAACCTCT	GGTTGCCCAGGAACTTACAA	56	<i>CviKI-1</i>	G: 79 + 75 + 58 + 54 A: 154 + 58 + 54
<i>CD40L -726T>C</i>	Xq26	135729609	ATCTTCACAGCAACCTAC	CACTAAACTCAATGAAAGCC	56	<i>LweI</i>	T: 251 + 195 C: 446
<i>CD40 -1C>T</i>	20q12-q13.2	44746982	GAAACTCCTGCGCGGTGAAT	GAAACTCCTGCGCGGTGAAT	56	<i>StyI</i>	C: 133 + 96 + 74 T: 207 + 96
<i>BLYS -871C>T</i>	13q32-q34	108921373	TGGCTCTTGTGTGATCAAGG	GCCTGGTCTCAGCTTTTCTG	50	<i>MbiI</i>	C: 162 + 48 T: 210

Chromosome positions were referred to the sequence of NCBI database (GRCh37)

Table 2 Genotypic frequencies and proportion of the African, European and Amerindian ancestry according to genotype

Genotypes	Frequency (%)	African ^a	European ^a	Amerindian ^a
<i>CD28-372G>A</i>	n=273			
<i>G/G</i>	46.7	0.309 (0.29-0.33)	0.445 (0.42-0.47)	0.246 (0.23-0.26)
<i>G/A</i>	45.8	0.320 (0.30-0.34)	0.440 (0.42-0.46)	0.239 (0.22-0.26)
<i>A/A</i>	7.5	0.333 (0.29-0.37)	0.394 (0.35-0.44)	0.273 (0.24-0.31)
p		0.54	0.2	0.33
<i>CD28+17T>C</i>	n=273			
<i>T/T</i>	65.0	0.317 (0.30-0.33)	0.434 (0.42-0.45)	0.248 (0.23-0.26)
<i>T/C</i>	32.0	0.311 (0.29-0.33)	0.453 (0.43-0.48)	0.235 (0.21-0.26)
<i>C/C</i>	3.0	0.349 (0.27-0.42)	0.380 (0.28-0.48)	0.271 (0.18-0.37)
p		0.67	0.2	0.44
<i>CTLA4-318C>T</i>	n=271			
<i>C/C</i>	0.84	0.317 (0.30-0.33)	0.439 (0.42-0.45)	0.243 (0.23-0.26)
<i>C/T</i>	0.16	0.310 (0.27-0.35)	0.435 (0.39-0.48)	0.255 (0.22-0.29)
p		0.91	0.95	0.93
<i>CTLA4+49A>G</i>	n=272			
<i>A/A</i>	41.0	0.317 (0.30-0.34)	0.432 (0.41-0.45)	0.251 (0.23-0.27)
<i>A/G</i>	49.0	0.313 (0.30-0.33)	0.441 (0.42-0.46)	0.246 (0.23-0.26)
<i>G/G</i>	9.0	0.335 (0.28-0.39)	0.453 (0.40-0.51)	0.212 (0.18-0.23)
p		0.65	0.68	0.17
<i>ICOS+156T>C</i>	n=269			
<i>T/T</i>	44.4	0.301 (0.28-0.32)	0.447 (0.42-0.47)	0.252 (0.23-0.27)
<i>T/C</i>	42.3	0.314 (0.29-0.33)	0.445 (0.42-0.47)	0.240 (0.22-0.26)
<i>C/C</i>	13.3	0.371 (0.33-0.41)	0.394 (0.36-0.43)	0.235 (0.20-0.27)
p		0.003	0.054	0.53
<i>CD86+1057G>A</i>	n=272			
<i>G/G</i>	61.9	0.322 (0.30-0.34)	0.426 (0.40-0.44)	0.251 (0.24-0.27)
<i>G/A</i>	34.0	0.301 (0.29-0.33)	0.459 (0.44-0.48)	0.231 (0.21-0.25)
<i>A/A</i>	4.1	0.278 (0.20-0.35)	0.459 (0.36-0.56)	0.263 (0.20-0.32)
p		0.34	0.09	0.2
<i>CD40-1C>T</i>	n=272			
<i>C/C</i>	73.6	0.319 (0.30-0.33)	0.436 (0.42-0.45)	0.245 (0.23-0.26)
<i>C/T</i>	22.6	0.301 (0.28-0.33)	0.450 (0.42-0.48)	0.241 (0.22-0.27)
<i>T/T</i>	3.8	0.301 (0.22-0.40)	0.434 (0.38-0.50)	0.258 (0.21-0.31)
p		0.81	0.72	0.87
<i>BLYS-871C>T</i>	n=271			
<i>C/C</i>	55.3	0.320 (0.30-0.34)	0.432 (0.41-0.45)	0.248 (0.23-0.26)
<i>C/T</i>	37.9	0.317 (0.30-0.34)	0.447 (0.42-0.47)	0.236 (0.22-0.25)
<i>T/T</i>	6.8	0.289 (0.23-0.35)	0.450 (0.38-0.52)	0.261 (0.21-0.31)
p		0.54	0.60	0.47
<i>CD40L-726T>C</i>				
Mulheres	n=92			
<i>T/T</i>	78.0	0.300 (0.27-0.33)	0.453 (0.42-0.48)	0.247 (0.23-0.27)
<i>T/C</i>	18.7	0.326 (0.27-0.38)	0.395 (0.34-0.45)	0.279 (0.24-0.32)
<i>C/C</i>	3.3	0.408 (0.07-0.74)	0.424 (0.18-0.67)	0.169 (0.08-0.23)
p		0.22	0.18	0.10
Homens	n=180			
<i>T</i>	90.0	0.314 (0.30-0.33)	0.446 (0.43-0.46)	0.240 (0.22-0.26)
<i>C</i>	10.0	0.373 (0.30-0.44)	0.368 (0.30-0.44)	0.259 (0.20-0.32)
p		0.02	0.008	0.42

^aAncestry expressed as mean (95% CI)

Table 3 Minor allele frequencies (MAF) in the samples from HapMap populations and Brazilian populations of current and previous studies

SNP	BRZ (current study)	CEU	TSI	YRI	LWK	ASN (CHB + JPT)	Euro-BRZ	Afro-BRZ	BRZ (mixed)	Reference
<i>CD28 -372G>A</i>	0,30	NA	NA	NA	NA	NA	0,37 ^a	0,33 ^a	NA	(18)
<i>CD28 +17T>C</i>	0,19	0,17	0,23	0,03	0,02	0,08	0,19 ^a 0,27 ^b	0,15 ^a 0,14 ^b	0,15 0,16	(18, 21, 22, 46)
<i>CTLA4 -318C>T</i>	0,08	0,08	0,06	0	NA	0,11	0,10 ^a 0,08 ^b	0,09 ^a 0,06 ^b	0,11	(18, 21, 47)
<i>CTLA4 +49A>G</i>	0,34	0,39	0,27	0,37	0,47	0,66	0,34 ^a 0,30 ^b	0,37 ^a 0,35 ^b	0,27 0,32	(18, 21, 22, 46)
<i>ICOS +1564T>C</i>	0,34	NA	NA	NA	NA	NA	0,35 ^b	0,35 ^b	0,25	(21, 22)
<i>CD86 +1057G>A</i>	0,21	0,30	0,30	0,12	0,14	0,61	0,21 ^c 0,21 ^d	0,20 ^c 0,27 ^d	0,25	(10, 48)
<i>CD40L -726T>C</i>	0,11	NA	0,03	NA	0,29	NA	0,21 ^e	0,30 ^e	0,13	(49, 50)
<i>CD40 -1C>T</i>	0,15	0,24	0,30	0	0,03	0,38	0,25 ^e	0,16 ^e	0,20	(49, 50)
<i>BLYS -871C>T</i>	0,26	0,46	0,53	0,05	0,09	0,45	0,39 ^e	0,32 ^e	0,28 0,30	(49 – 51)

Hapmap populations: CEU = Utah residents with Northern and Western European ancestry; TSI = Tuscans in Italy; YRI = Yoruba in Ibadan, Nigeria; LWK = Luhya in Webuye, Kenya; ASN (Asian from CHB (Han Chinese in Beijing) and JPT (Japanese in Tokyo)). Brazilian population (BRZ). Euro- and Afro-Brazilians were classified by evaluation of phenotypical features and/or self-reported ancestry in the studies of ^a(18); ^b(21); ^c(10); ^d(48); ^e(49). NA = Not available

Table 4 Linkage disequilibrium analysis of the chromosome region 2q33 containing the genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*

	<i>CD28 -372G>A</i>	<i>CD28 +17T>C</i>	<i>CTLA4 -318C>T</i>	<i>CTLA4 +49A>G</i>	<i>ICOS +1564T>C</i>
<i>CD28 -372G>A</i>		1	1	0,40	0,12
<i>CD28 +17T>C</i>	23686		0,74	0,58	0,11
<i>CTLA4 -318C>T</i>	161521	137835		0,73	0,47
<i>CTLA4 +49A>G</i>	161888	138202	367		0,22
<i>ICOS +1564T>C</i>	248744	225058	87223	86856	

Pairwise estimates of linkage disequilibrium D' (upper diagonal) and physical distance between SNPs (in bp) (lower diagonal)

Table 5 Haplotype frequencies and association with African, European and Amerindian ancestry

Haplotype ^a	Frequency ^b	African		European		Amerindian	
		hap.score ^c	p	hap.score ^c	p	hap.score ^c	p
GTCGT	0.193	-2.06	0.03	2.18	0.02	-0.29	0.77
GTCAT	0.153	-1.64	0.09	0.46	0.64	1.37	0.17
ATCAT	0.136	-1.13	0.25	0.17	0.85	1.09	0.27
GTCAC	0.102	1.08	0.27	-0.66	0.50	-0.43	0.66
ATCAC	0.098	1.92	0.05	-1.71	0.08	0.01	0.98
GCTAT	0.055	-0.98	0.32	0.03	0.97	1.11	0.26
GTCGC	0.051	2.26	0.02	-1.07	0.28	-1.41	0.15
GCCAT	0.050	1.15	0.24	-0.55	0.58	-0.69	0.48
GCCAC	0.044	-0.29	0.77	0.44	0.65	-0.24	0.80
ATCGT	0.032	0.07	0.93	0.16	0.87	-0.26	0.78
ATCGC	0.027	2.57	0.01	-1.62	0.10	-0.92	0.35
GCCGT	0.024	0.50	0.61	0.62	0.53	-1.30	0.19
GTTAT	0.008	-	-	-	-	-	-
GCTAC	0.007	-	-	-	-	-	-
ATTAC	0.006	-	-	-	-	-	-
ACTGC	0.002	-	-	-	-	-	-
ATTGC	0.002	-	-	-	-	-	-
GCCGC	0.002	-	-	-	-	-	-

^aOrder of variants in haplotype is as follows *CD28 -372G>A*, *CD28 +17T>C*, *CTLA4 -318C>T*, *CTLA4 +49A>G*, *ICOS +1564T>C*

^bEstimated frequency of each haplotype in the population

^cThe score for the haplotype, which is the statistical measurement of association of each specific haplotype with the trait

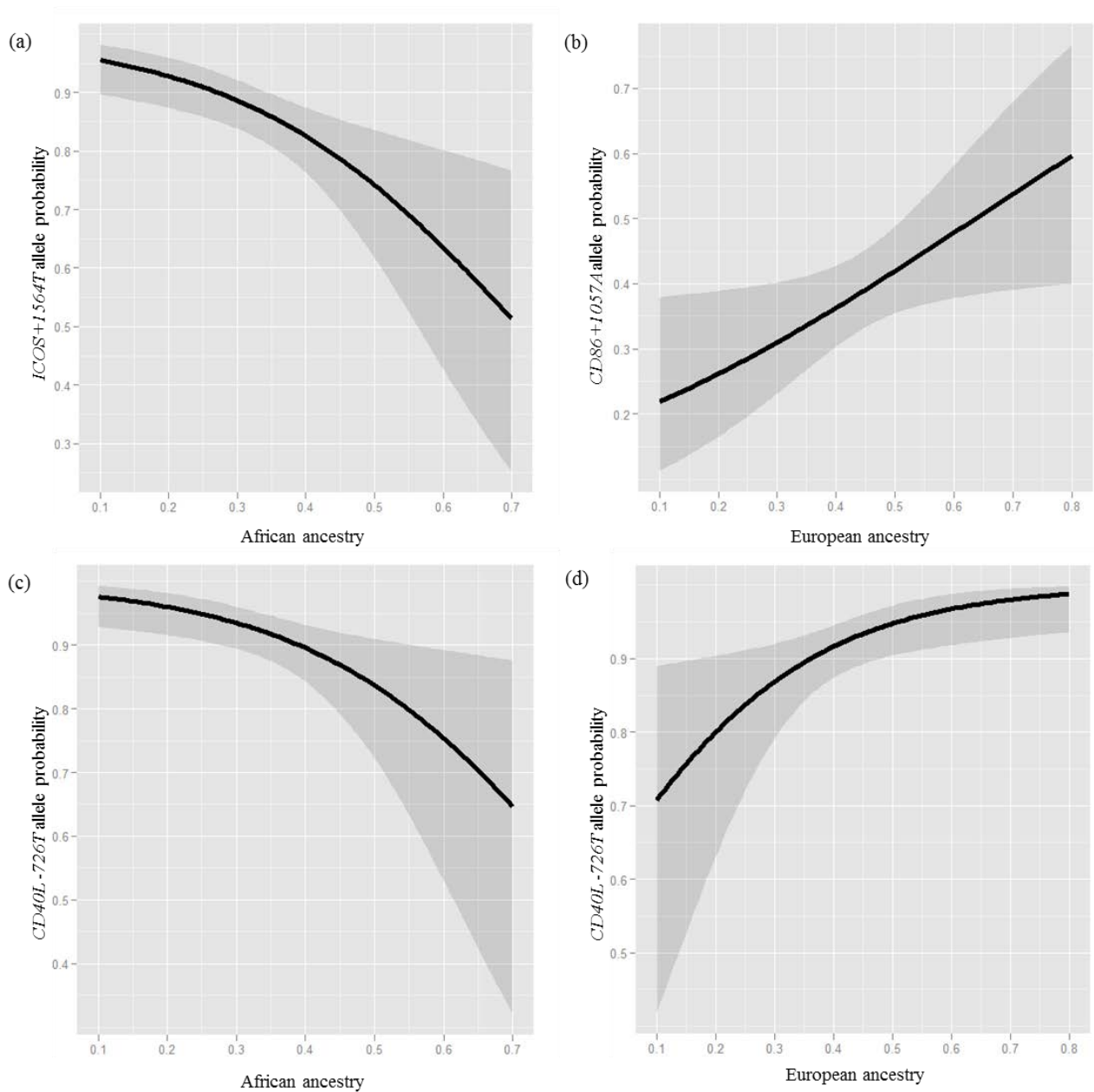


Fig. 1 Fitted logistic regression describing the association between ancestry and polymorphisms. (a) *ICOS* +1564T>C. Chance of having a T allele according to African ancestry. (b) *CD86*+1057G>A. Chance of having a A allele according to European ancestry. (c) *CD40L* -726T>C. Chance of having a T allele according to African ancestry and (d) according to European ancestry. Gray shadows show 95% confidence intervals. Graphics were created using ggplot2 in R.

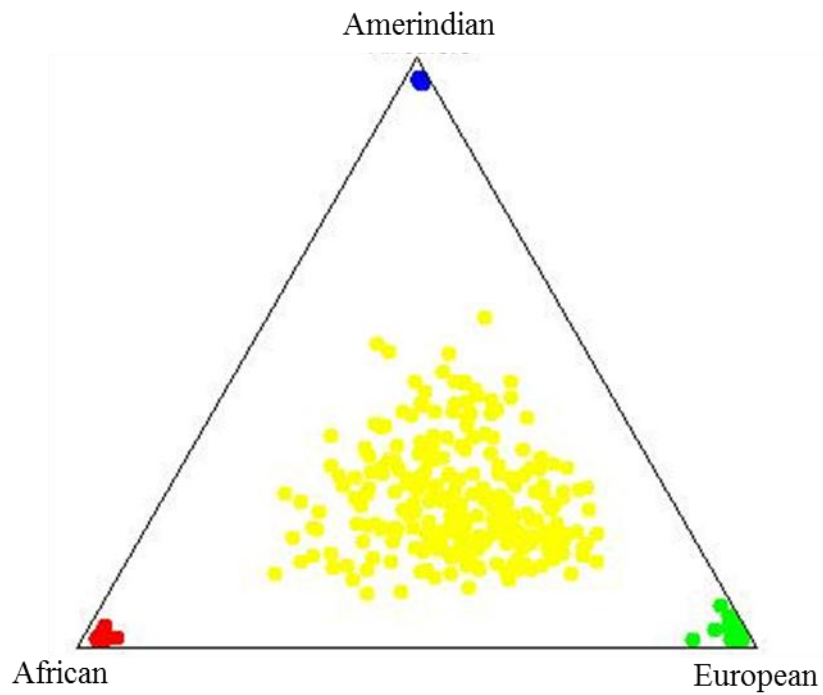


Figure 2 Schematic representation of the individual admixture estimates. Each point represents one individual and the correspondent admixture proportions are indicated by the distance to the edges of the triangle. European, African and Amerindian correspond to individuals from the parental populations. The figure was made using *Structure* v. 2.3.4 software

ANEXO III

1. Resumos apresentados em Congressos

1.1 Resumo apresentado no American Society of Tropical Medicine and Hygiene 62st Meeting

Polymorphisms in co-stimulatory genes do not affect *Plasmodium vivax* parasite density

Cassiano, G. C.^{1,3}, Capobianco, M. P.^{1,3}, Furini, A. A. C.¹, Storti-Melo, L. M.², Trindade, P. C. A.³, Tomaz, F. M. M. B.³, 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. **e-mail:** gcapatti@hotmail.com

Plasmodium vivax is the most prevalent malaria species in Brazil, representing more than 80% of clinical cases reported annually from the Amazon region. A growing body of evidence indicates that the immunity is important in the outcome of *P. vivax* infection. Co-stimulation is an important secondary signal that governs the extent, strength and direction of the immune response that follows. Since parasite density has been recognized as important factor in the outcome in malaria infections, we investigated whether polymorphisms in co-stimulatory genes are associated with *P. vivax* parasitemia in malaria patients from Brazilian Amazon Region. The sample included 147 patients infected with *P. vivax* from Goianésia do Pará, a municipality situated on the southwest of Pará state, Brazil. Nine SNPs were analyzed by PCR-RFLP in seven co-stimulatory genes (*BAFF*, *CD28*,

CTLA4, *CD40*, *CD40L*, *CD86* and *ICOS*). Parasitemia was determined by counting the number of parasites in 100 separate fields under oil immersion microscope and converted to the number of parasites per microliter of blood assuming 8,000 leukocytes/ μ L. Association between the genotypes and parasite density was determined by Mann-Whitney test, with level of significance of 0.05, using R statistical software. All SNPs tested were in Hardy-Weinberg equilibrium. A trend was noted between the allele C of SNP rs_3116496 in *CD28* gene and lower parasite density, but these trend was not significant ($p = 0.1$). No significant association was found between the polymorphisms tested and *P. vivax* parasite density. Our results show that the studied polymorphisms do not affect the *P. vivax* parasite density. However, due to the obvious importance of co-stimulatory pathways in malaria, further studies that elucidate the complex host-parasite interactions could be useful for future vaccine development.

1.2 Resumo apresentado no XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

POLIMORFISMOS EM GENES CO-ESTIMULATÓRIOS NÃO INFLUENCIAM A RESPOSTA DE ANTICORPOS CONTRA A MSP-1₁₉ DO *Plasmodium vivax* EM INDIVÍDUOS NATURALMENTE INFECTADOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

GUSTAVO CAPATTI CASSIANO^{1,3}, MARCELA PETROLINI CAPOBIANCO^{1,3}, ADRIANA ANTÔNIA DA CRUZ FURINI¹, LUCIANE MORENO STORTI-MELO², PAMELLA CRISTINA ALVES TRINDADE³, FRANCIELE MAIRA BATISTA TOMAZ³, MARISTELA GOMES DA CUNHA⁴, MARINETE MARINS PÓVOA⁵, RICARDO LUIZ DANTAS MACHADO^{1,3,5}

¹Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil, ²Universidade Federal do Sergipe, Itabaiana, Brasil, ³Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brasil, ⁴Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil, ⁵Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil. **e-mail:** gcapatti@hotmail.com

Introdução: Inúmeras evidências indicam que a imunidade é importante no resultado da infecção por *Plasmodium* e um dos principais objetivos dos imunologistas é entender os motivos pelos quais as pessoas diferem em suas respostas imunes contra o parasito. Assim, é importante elucidar o componente genético envolvido na resposta imune naturalmente adquirida contra a malária. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de polimorfismos em genes co-estimulatórios na prevalência e magnitude de anticorpos contra a MSP-1₁₉ do *Plasmodium vivax*, em indivíduos naturalmente infectados em uma área endêmica da Amazônia brasileira. **Material e Métodos:** A amostra foi constituída por 189 indivíduos infectados por *P. vivax* provenientes do município de Goianésia do Pará, localizado no sudeste do Estado do Pará, Brasil. Nove SNPs foram analisados por PCR-RFLP em sete genes co-estimulatórios (*BAFF*, *CD28*, *CTLA4*, *CD40*, *CD40L*, *CD86* e *ICOS*). As amostras de plasma foram avaliadas em duplicata por teste de ELISA para presença de anticorpos contra a MSP-1₁₉ do *P. vivax* e os resultados foram expressos pelo índice de reatividade (média das densidades ópticas da amostra/ ponto de corte). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R. Diferenças nas médias foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e Qui Quadrado. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos. **Resultados:** Todos os SNPs avaliados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência de respondedores contra a MSP-1₁₉ do *P. vivax* foi de 82,5%. Os indivíduos com o genótipo TT para o SNP rs1883832 no gene *CD40* ou aqueles apresentando no mínimo um alelo A no SNP rs1129055 no gene *CD86* apresentaram maiores índices de reatividade de anticorpos, sem associação estatisticamente significativa (p = 0,06 e p= 0,08, respectivamente). Não houve associação significativa entre os genótipos

estudados e a frequência de respondedores. **Conclusão:** Apesar dos polimorfismos estudados já terem sido implicados como importantes na resistência ou susceptibilidade a diversas doenças auto-imunes, nosso estudo não evidenciou uma importante função dos mesmos na aquisição ou níveis de anticorpos contra a MSP-1₁₉ do *P. vivax* na população estudada.

Apoio Financeiro: CNPq

1.3 Resumo apresentado na XIII Reunião Nacional de Malária

**AMERINDIAN ANCESTRY IN A BRAZILIAN POPULATION IS
POSITIVELY CORRELATED WITH ANTIBODY LEVELS TO
PLASMODIUM VIVAX MEROZOITE SURFACE PROTEIN-1₁₉ KDA**

Gustavo C. Cassiano^{1,3}, Eduardo J. M. Santos², Maria H. T. Maia², Adriana C. Furini³, Franciele M. B. Tomaz³, Pamella C. A. Trindade³, Marcela P. Capobianco¹, Andréa L. S. Silva², Ana Paula G. Castro², Giselle M. R. Viana⁴, Marinete M. Póvoa⁴, Maristela G. Cunha², Sidney E. B. Santos², Ricardo L. D. Machado^{1,4}

1.Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2.Universidade Federal do Pará (UFPA); 3.Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP); 4.Instituto Evandro Chagas (IEC)

Introduction: A growing body of evidence indicates that the immunity is important in the outcome of malaria infection and one of the main goals of immunologists is to understand why people differ in their immune response to the parasite. Although some progress has been made in identifying human genetic factors that influence *Plasmodium falciparum* antibody response in African populations, little is known about the factors that participate in humoral immune response to malaria in admixed populations. The population of Brazil is

genetically highly heterogeneous, admixed between Europeans, Amerindians, and Sub-Saharan Africans, as a result of the relatively recent history of encounter.

Objective: In the current study, the effect of Amerindian, European and African ancestry in antibody levels to *P. vivax* MSP-1₁₉ was examined in an admixed population in Brazil. **Material and Methods:** Samples were collected of 195 *P. vivax*-infected individuals from a Brazilian malaria endemic area (Goianésia do Pará). IgG antibodies to *P. vivax* MSP-1₁₉ were detected by ELISA and 47 INDELS ancestry markers were genotyped to estimate individual ancestry proportions using STRUCTURE software. Spearman correlation was used to assess correlation between ethnic ancestry and antibody levels. **Results:** The Amerindian ancestry correlated positively with antibody levels ($\rho = 0,151$, $p = 0,03$). The African and European ancestry were not correlated with antibody levels ($p = 0,36$ and $0,40$, respectively). **Conclusion:** Our results indicate that Amerindian populations can be more exposed to *P. vivax* in Brazilian Amazon.

Funding: CNPq

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____ / ____ / ____

Assinatura