

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA**



**SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA  
À MALÁRIA CEREBRAL  
EM CRIANÇAS ANGOLANAS**

**Maria do Rosário Teixeira de Alva Sequeira Bragança Sambo**

**Doutoramento em Medicina**

**(Genética)**

2009



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA**



**SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA  
À MALÁRIA CEREBRAL  
EM CRIANÇAS ANGOLANAS**

**Maria do Rosário Teixeira de Alva Sequeira Bragança Sambo**

**Doutoramento em Medicina  
(Genética)**

**Tese orientada pelo Professor Doutor António Coutinho  
Co-Orientador Professor Doutor Carlos Penha-Gonçalves**

**2009**

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 22 de Setembro de 2009.**

*À minha Mãe,*

*À memória do meu Pai e dos meus irmãos, Hermínio e Jaime*

**As opiniões expressas  
são da exclusiva responsabilidade do seu autor.**

*After the basic principles of information transfer from genes to proteins had been established with the identification of messenger RNA, the discovery of the mechanism of protein synthesis and the structure of genetic code, it was natural for some of us to ask whether the lessons learnt in molecular biology could be applied to the genetics of more complex phenotypes.*

Sydney Brenner

Nature's Gift to Science  
Nobel Lecture  
8 de Dezembro, 2002.



## AGRADECIMENTOS

A todos quantos, apesar de se encontrarem geograficamente dispersos, mas unidos no interesse de partilhar as suas experiências profissionais e pessoais, ajudaram a concretizar este trabalho. Àqueles que contribuíram para confirmar que o espírito de cooperação de um conjunto de indivíduos é indispensável à materialização de um trabalho de investigação científica. Não será fácil descrever todos os que me apoiaram na realização deste trabalho, pelo que, certamente e sem que isso signifique uma menor importância, não conseguirei evitar a falha na enumeração de muitos nomes.

Ao meu orientador, Professor Doutor António Coutinho, que tão prontamente me acolheu no Instituto Gulbenkian de Ciência para expor a minha intenção de realizar o doutoramento, encorajando-me na sua realização e fornecendo-me todo o tipo de apoio necessário à execução do projecto de doutoramento.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Carlos Penha-Gonçalves, que de um modo incansável, desde a concepção do projecto de doutoramento até ao final do trabalho, me proporcionou todo o apoio científico na abordagem de questões metodológicas, na interpretação dos principais resultados, discutindo sempre os principais problemas e ajudando a perspectivar novas experiências. Realço ainda que toda esta actividade de aprendizagem científica se materializou num ambiente saudável, pautado sempre não só por um profundo sentido de ética, mas também de amizade.

À Direcção do Hospital Pediátrico David Bernardino (HPDB), nas pessoas do Professor Dr. Luís Bernardino e da Professora Dra. Vitória Espírito Santo, que desde a primeira hora se empenharam em todas as diligências conducentes à execução do projecto, designadamente na prestação do apoio às questões éticas do trabalho, no fornecimento do material necessário às colheitas de sangue dos participantes no estudo, em suma, em todo o processo de amostragem.

À Doutora Maria de Jesus Trovoada que tornou possível que uma neurologista apenas experimentada a observar doentes, desse os primeiros passos em técnicas de laboratório tão simples, tais como pipetar correctamente amostras, passando pela extracção do ADN, pela realização de reacção em cadeia da polimerase (PCR) até à selecção dos polimorfismos e genotipagem.

À Dra. Carla Benchimol do HPDB de Luanda, um agradecimento muito especial pela dedicação e entrega, contribuindo de forma determinante na fase de triagem inicial dos casos de malária cerebral e dos controlos de malária não complicada. À Dra. Vatúsia Quinhentos, pelo apoio concedido, facilitando a triagem dos doentes com malária severa não cerebral. À Enfermeira Domingas Augusto, pela prestimosa colaboração para a identificação dos candidatos a controlos não infectados no Serviço de Vacinação do HPDB. À Teodora, pelo espírito sempre prestativo em fazer chegar atempadamente as amostras de sangue ao Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola, para o seu adequado processamento e armazenamento. A todos os médicos, médicos estagiários, enfermeiros e técnicos de laboratório do HPDB que de uma forma ou de outra colaboraram no processo de amostragem. Ao José Cassua por me ter ajudado a superar as sempre ansiogénicas idas à Angases, lutando contra o trânsito das ruas de Luanda, na busca do gelo seco, imprescindível à conservação do material biológico durante o transporte aéreo de Luanda para Lisboa.

À Dra. Rute Vieira pelo imprescindível, decisivo e incansável contributo para a análise genética deste trabalho e pela apreciação crítica de parte da tese.

A todos os colegas do Laboratório *Disease Genetics* e da Unidade de Genómica do IGC por todo o tipo de apoio prestado, quer com conhecimentos científicos, quer na ajuda de realização de técnicas de laboratório. À Doutora Francisca Fontes pelos inestimáveis conselhos tão úteis, quando iniciei o doutoramento. À Eng<sup>a</sup>. Rita Neres pelas longas horas de troca de experiências, pelo incondicional companheirismo, especialmente durante o *stressante* período da escrita da tese. À Dra. Augusta Borges pelo seu papel crítico não só em relação ao pré-projecto de tese mas também aos aspectos clínicos da versão final da tese. Ao Dr. Kamal Mansinho que com a sua experiência clínica e

perspicácia apreciou, de forma crítica, a tese. À Doutora Amélia Mingas, pelos esclarecimentos relativos aos grupos étnicos angolanos.

Ao Instituto Gulbenkian de Ciência que financiou todo o trabalho de investigação genética, incluindo ainda o material necessário à colheita, processamento e armazenamento das amostras biológicas.

Ao Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento e ao Ministério dos Petróleos de Angola, por me terem suportado financeiramente com uma bolsa de doutoramento e com um subsídio, respectivamente.

À Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho por ter anuído à concretização do projecto de doutoramento.

À Direcção da Clínica Sagrada Esperança nas pessoas do Dr. Rui Veiga Pinto e Dr. Luís Caetano e à Dra. Filomena Silva do Instituto de Saúde Pública de Angola, pelo apoio com material de colheita de amostras biológicas e pela disponibilização de material de laboratório, assim como à Dra. Emingarda Castelo Branco e à Dra. Rosa Silva do Instituto de Saúde Pública de Angola, pela colaboração no processamento das amostras de sangue total.

À minha Família, em especial ao Baby, meu marido, à Indira e à Patrícia, minhas filhas, que ao longo de todos estes anos constituíram não só a base emocional, mas também o suporte racional para ajudar a ultrapassar todos os momentos difíceis. A ti, minha querida mãe, o meu forte e emocionado agradecimento porque, paradoxalmente, não obstante os teus incansáveis e compreensíveis protestos provocados pela ausência da tua “médica de Família”, soubeste não só acatar, mas também assimilar a importância da conclusão desta tese.

Finalmente, o mais veemente agradecimento a todos os participantes deste estudo, designadamente às crianças doentes e aos seus progenitores e às crianças não doentes, sem os quais teria sido, de todo impossível, a concretização deste trabalho.



# ÍNDICE

<b>PREÂMBULO .....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>III</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A Epidemiologia da Malária.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 A Clínica da Malária.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 O ciclo de vida do parasita .....	4
1.2.2 Períodos pré-patente e de incubação.....	5
1.2.3 Malária não complicada.....	6
1.2.4 Malária Severa .....	6
1.2.5 Malária Cerebral.....	12
<b>1.3 Genética da Malária.....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Componente genética das doenças infecciosas .....	15
1.3.2 O impacto da malária no genoma humano.....	17
<b>1.4 Análise Genética da Malária .....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Recrutamento dos casos e dos controlos.....	20
1.4.2 Associação genética e o desequilíbrio de ligação .....	23
1.4.3 Genes e polimorfismos alvo .....	25
1.4.4 Complexidade genética e a malária .....	27
<b>1.5 Os Genes estudados.....</b>	<b>33</b>

<b>1.6</b>	<b>Estudo Genético de Síndromes de Malária Severa em Angola</b> .....	<b>45</b>
1.6.1	Amostragem no estudo genético da malária .....	45
1.6.2	Desenho do estudo .....	47
<b>2.</b>	<b>OBJECTIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>2.1</b>	<b>Objectivo Geral</b> .....	<b>53</b>
<b>2.2</b>	<b>Objectivos Específicos</b> .....	<b>53</b>
<b>3.</b>	<b>DOENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Aprovação Ética e Consentimento Informado</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Desenho do Estudo</b> .....	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Critérios de Definição dos Fenótipos Clínicos</b> .....	<b>59</b>
<b>3.4</b>	<b>Cálculo do Poder Estatístico</b> .....	<b>62</b>
<b>3.5</b>	<b>Seleção de Genes Candidatos e de Polimorfismos</b> .....	<b>62</b>
<b>3.6</b>	<b>Colheita e Processamento das Amostras</b> .....	<b>63</b>
<b>3.7</b>	<b>Detecção de ADN de <i>Plasmodium</i></b> .....	<b>64</b>
<b>3.8</b>	<b>Extracção e Quantificação do ADN Genómico</b> .....	<b>64</b>
<b>3.9</b>	<b>Genotipagem</b> .....	<b>65</b>
<b>3.10</b>	<b>Expressão génica por PCR em Tempo Real</b> .....	<b>66</b>
<b>3.11</b>	<b>Doseamento Plasmático do Heme</b> .....	<b>67</b>
<b>3.12</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>67</b>
3.12.1	Associação casos-controlos para cada SNP .....	68
3.12.2	Construção de mapas de desequilíbrio de ligação .....	68
3.12.3	Reconstrução de haplótipos e análise casos-controlos.....	69
3.12.4	Testes de desequilíbrio de transmissão .....	70
<b>3.13</b>	<b>Estudo de interacção génica</b> .....	<b>70</b>
<b>3.14</b>	<b>Análise de traços quantitativos</b> .....	<b>71</b>

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização da Amostra .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2</b>	<b>Associação Genética .....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Genes com Associação à Malária Cerebral .....	85
4.2.2	Genes com Associação à Malária Severa .....	121
4.2.3	Outros Genes com Associação à Malária Severa .....	129
<b>4.3</b>	<b>Interacção Génica .....</b>	<b>141</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES .....</b>	<b>145</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>151</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>175</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>181</b>



## PREÂMBULO

---

Há alguns anos, quando terminei o internato de especialidade de Neurologia, tinha a convicção de que, no exercício da actividade clínica como neurologista em Angola, seria rotineira a observação de doentes com manifestações neurológicas de doenças infecciosas consequentes, não só à afecção primária do Sistema Nervoso, mas também a repercussões secundárias de doenças infecciosas sistémicas.

A malária grave constitui uma emergência médica e, como tal, impõe uma pronta actuação, conducente a um diagnóstico urgente e à instituição de medidas terapêuticas eficazes, que proporcionem a rápida recuperação do doente, evitando a morte, bem como a ocorrência de lesões cerebrais que predisponham ao risco de desenvolver sequelas neurológicas graves.

Em Angola, a malária cerebral é uma das síndromas de malária grave que mais contribui para a elevada letalidade da malária em crianças com menos de cinco anos. Adicionalmente, as famílias confrontam-se não só com as avultadas perdas de vidas humanas, mas também com o ónus dos internamentos, com o importante absentismo escolar e laboral, e ainda, após a alta, com a necessidade de prestação de cuidados especiais àqueles em que persistiram sequelas neurológicas causadas pela malária cerebral. No futuro, o maior risco de epilepsia e as dificuldades de aprendizagem, em consequência da malária cerebral, acrescem preocupações substanciais às famílias afectadas e sendo estas habitualmente as mais vulneráveis do ponto de vista socioeconómico, conduzem a uma situação ainda mais grave.

Sendo certo que a síndrome de malária cerebral frequentemente se associa a múltiplas disfunções de órgãos e de sistemas, não deixa de ser intrigante, para quem acompanha doentes, o facto de apenas uma fracção de doentes com malária severa manifestar sinais de lesão do sistema nervoso central. A teoria da hipoxia causada pela obstrução da microcirculação cerebral, aliada ao desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e as anti-inflamatórias,

tenta dar suporte à patogénese da malária cerebral, ainda não completamente esclarecida.

A epidemiologia genética congrega os aspectos genéticos implicados na patogenia das doenças. O contraste entre a experiência do exercício de uma medicina clínica individualizada e portanto centrada num doente, adquirida ao longo de anos, e a inexperiência no domínio de métodos adequados não só ao estabelecimento de um padrão para definir clinicamente um grupo de casos de doença, mas também para identificar factores genéticos que determinam o risco de adquirir formas específicas da doença, constituiu um importante desafio para esta tese de doutoramento. A possibilidade desta tese se desenvolver na recente área da genética de doenças comuns e ter por objectivo o estudo da malária e especificamente da malária cerebral em Angola, em que a malária e a drepanocitose são dois destacados problemas de saúde pública, constituiu uma oportunidade que pretendi transformar num contributo para a identificação de novos factores de resistência/susceptibilidade à malária cerebral.

## RESUMO

---

As manifestações neurológicas da infecção pelo *Plasmodium falciparum*, que culminam com o coma não despertável, configuram a síndrome de malária cerebral. Esta é uma das síndromas mais graves de malária severa que contribui, em larga escala, para a elevada mortalidade da malária em crianças da África subsaariana.

A identificação de variantes genéticas do hospedeiro que influenciam a evolução clínica da malária severa e que determinam a fisiopatologia da malária cerebral é um dos desafios que persistem na investigação de factores genéticos da malária.

Esta tese teve como principal objectivo investigar variantes genéticas que, de um modo específico, permitissem diferenciar factores de risco de malária cerebral de factores de risco de malária severa não cerebral.

Foi desenhado um estudo de associação de casos-controlos, tendo-se analisado dezassete genes previamente correlacionados com a malária severa em 749 crianças angolanas. O estudo compara 130 casos de malária cerebral com 158 controlos de malária severa não cerebral, para detectar factores de risco específicos de malária cerebral. Para confirmar a exclusividade de eventuais factores de risco específicos de malária cerebral, os casos foram igualmente comparados a outros dois grupos controlo: 1) malária não complicada (142 doentes) e 2) crianças assintomáticas não infectadas (319 crianças).

No gene *Transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)* foi identificado um haplótipo que, apenas no contexto da malária severa, aumenta o risco de progressão para a malária cerebral, permitindo distinguir os doentes com malária cerebral dos doentes com malária severa não cerebral. No gene *Heme oxygenase 1 (HMOX1)* foram identificados haplótipos que influenciam a evolução clínica da malária severa, quer conferindo susceptibilidade à malária cerebral, quer diminuindo o risco de malária cerebral e de outras formas de malária severa. Todavia, exclusivamente nos doentes com malária cerebral, a configuração genotípica do haplótipo protector do gene *HMOX1* diminui os níveis plasmáticos do heme livre e concomitantemente promove o aumento da expressão do gene *HMOX1*.

Os resultados deste estudo sugerem que o gene *TGFB2* é um novo gene candidato para futuros estudos de associação à malária severa e especialmente à malária cerebral. O papel regulador evidenciado por variantes genéticas do *HMOX1* no metabolismo do heme nos doentes com malária cerebral, associado ao aumento de expressão génica do *HMOX1*, poderá proporcionar elementos adicionais para a patogénese da malária cerebral.

Esta tese realiza um escrutínio de genes que foram associados à malária severa para determinar o seu papel na evolução deste conjunto de síndromas, tendo concluído que apesar de parte dos genes associados à malária terem efeitos em múltiplos níveis na evolução clínica da doença, variantes dos genes *TGFB2* e *HMOX1* parecem afectar especificamente o risco de desenvolver malária cerebral.

## SUMMARY

---

The neurological manifestations of *Plasmodium falciparum* infection, which culminate with an unarousable coma, constitute the cerebral malaria syndrome. This is one of the most life-threatening syndromes of severe malaria and largely contributes to the high mortality from malaria in sub-Saharan African children.

In the investigation of severe malaria genetic risk factors, the challenge persists to identify specific genetic variants that could influence the clinical course of severe malaria and determine the physiopathology of cerebral malaria.

The main objective of this thesis focused on the detection of genetic variants that specifically differentiate cerebral malaria risk factors from those related to severe non-cerebral malaria.

A case-control study was performed in 749 angolan children to investigate seventeen candidate genes previously associated with severe malaria. The study compares 130 cerebral malaria cases to 158 severe non-cerebral malaria controls. To confirm the pathogenesis specificity of the cerebral malaria risk factors, cerebral malaria cases were also compared to other two control groups: 1) uncomplicated malaria (142 patients) and 2) asymptomatic uninfected children (319 individuals).

One haplotype in the *Transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)* gene showed to increase specifically the risk of progression to cerebral malaria and in the context of the severe disease was over-represented in cerebral malaria patients as compared to patients with severe non-cerebral malaria. This study also identified *Heme oxygenase 1 (HMOX1)* gene haplotypes conferring either increased risk of cerebral malaria or decreased risk of developing different forms of severe malaria. Strikingly, the genetic configuration of the *HMOX1* gene protective haplotype decreased plasma levels of free heme, only in patients with cerebral malaria and concomitantly promoted the increase of *HMOX1* gene expression.

The results of this study suggest that the *TGFB2* gene is a novel candidate gene for future severe malaria genetic association studies, particularly cerebral malaria. The regulatory role evidenced by genetic variants of the *HMOX1* gene in

the plasma free-heme metabolism, and in the gene expression of the *HMOX1* gene of cerebral malaria patients, may provide additional clues for the cerebral malaria pathogenesis.

This thesis scrutinized a set of genes that were associated with severe malaria to determine their role in the evolution of the severe disease. It was found out that, though some of the genes associated with malaria had effects at multiple levels in the clinical course of the disease, variations in the *TGFB2* and *HMOX1* genes seem to affect specifically the risk of progressing to cerebral malaria.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementar
AR	Alelo de referência
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
ASM	Anemia severa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD36	<i>Thrombospondin receptor</i>
CNVs	Variações do número de cópias
CR1	<i>Complement Receptor 1</i>
dNTPs	Trifosfato de desoxirribonucleótidos
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase
GSS	<i>Global Score Statistics</i>
GWAS	Estudos de associação à escala genómica
HBB	<i>Hemoglobin, beta</i>
HbS	Hemoglobina S
HLA	Antigénio Leucocitário de Histocompatibilidade
HMOX1	<i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>
HP	Hiperparasitemia
HP	<i>Haptoglobin</i>
HPDB	Hospital Pediátrico David Bernardino
htSNP	<i>Haplotype tagging SNP</i>
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
ICAM-1	<i>Intercellular-Adhesion Molecule 1</i>
ICAM-4	<i>Intercellular-Adhesion Molecule 4</i>
ICAM-5	<i>Intercellular-Adhesion Molecule 5</i>
IFN	Interferão
IFNAR1	<i>Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1</i>
IL	Interleucina
IL10RB	<i>Interleukin 10 receptor, beta</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
LRT	Teste da razão de verosimilhança
MaláriaGEN	<i>Malaria Genomic Epidemiology Network</i>
MaxST	<i>Max Statistics</i>
MBL2	<i>Mannose-binding lectin (protein C) 2</i>
MC	Malária Cerebral
MCi	Malária Cerebral isolada
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade

MnC	Malária não complicada
MSP-1	<i>Merozoite-Surface Protein 1</i>
MSP-2	<i>Merozoite-Surface Protein 2</i>
NIF	Não infectados
NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds-ratio
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PECAM 1	<i>Platelet-endothelial cell-adhesion molecule, CD31</i>
PfEMP1	<i>P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
QTL	Locus de traço quantitativo
RT-PCR	Reacção em cadeia da polimerase em tempo real
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SnC	Malária severa não cerebral
SNP	Polimorfismo mononucleotídico
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão
TGF	Factor transformador de crescimento
TGFB1	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
TGFB2	<i>Transforming growth factor, beta 2</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF	Factor de Necrose Tumoral

Ao longo do texto, existem alguns termos técnicos em língua inglesa apresentados em itálico e que pertencem a um glossário reconhecido na literatura internacional.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 A Epidemiologia da Malária

A malária é uma doença infecciosa complexa que se mantém como a causa mais importante de morbidade e de mortalidade nos países tropicais (Figura 1), não obstante os esforços que vêm sendo empreendidos, desde meados do século XX [1], visando, não apenas o seu controlo, mas também a sua erradicação [2-5].

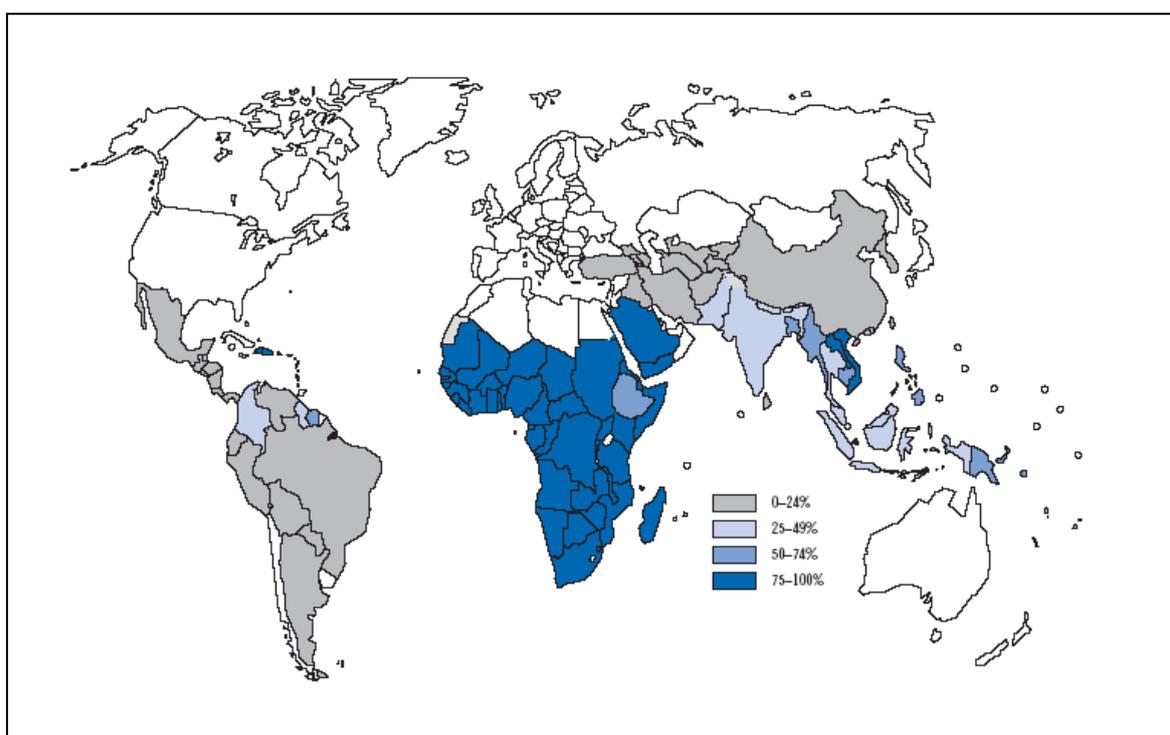


Figura 1. **Percentagem estimada de casos de malária provocados pelo *Plasmodium falciparum*, 2006.** Fonte: Relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 sobre a malária [6].

O agente etiológico da malária é um protozoário esporozoário do género *Plasmodium* que foi descoberto no século XIX por Charles Louis Alphonse Laveran [7, 8]. Das cinco espécies de *Plasmodium* infectantes para o ser humano, designadamente *falciparum*, *malariae*, *vivax*, *ovale* e *knowlesi*, o *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) é a que mais contribui para a elevada morbidade da malária e para a letalidade da malária severa [9].

Segundo o Relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 sobre a malária, em 2006, dos 3,3 biliões de pessoas expostas à doença, 1,2 biliões estiveram em alto risco de contrair a mesma, residindo a maioria destas (49%) na Região Africana. Os episódios de malária estimados em 2006, foram 247 milhões, 86% dos quais ocorreram em países africanos. Das 881 mil mortes estimadas por malária naquele ano, 91% ocorreram em África e 85% destas afectaram crianças menores de cinco anos. No ano de 2006, Angola integrou não só o conjunto de dezanove países responsáveis por 90% dos casos de malária na Região Africana, mas também o conjunto de dezoito países que contribuíram para 90% das mortes causadas pela malária na mesma região [6].

A susceptibilidade ao desenvolvimento de quadros de malária severa varia com a exposição ao parasita e portanto com a intensidade de transmissão da doença. Em África, nas áreas onde a transmissão da malária é intensa e estável, a malária severa afecta principalmente crianças desde os primeiros meses de vida até aos cinco anos [10, 11]. Nos países com transmissão entre baixa e moderada (como no sudeste da Ásia), todos os grupos etários são vulneráveis à malária severa [12]. Nos países industrializados, a maioria destas complicações severas ocorre em viajantes não imunes que regressam de áreas endémicas de malária [13]. Nestes países, a malária severa contribui com aproximadamente 5% dos casos importados de malária, variando entre 1 a 38% [14].

A infecção por *P. falciparum* tem um amplo espectro fenotípico, podendo variar desde a parasitemia assintomática até à malária severa que se manifesta com múltiplas complicações potencialmente fatais (Figura 2) [15]. Estima-se que em cem infecções por *P. falciparum* uma evoluirá para malária severa que será responsável, todos os anos, por mais de um milhão de mortes em crianças da África subsaariana [16].

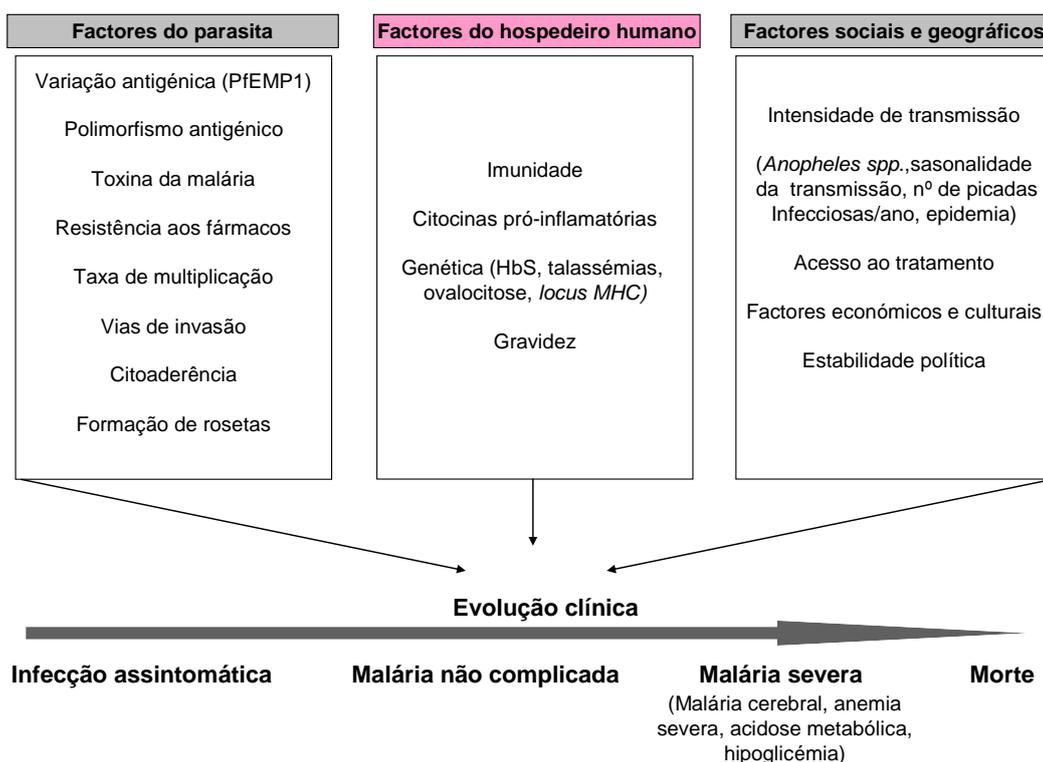


Figura 2. **Espectro fenotípico da infecção por *Plasmodium falciparum*.** Adaptado de Miller 2002 [15].

A malária cerebral é a síndrome mais grave da malária severa causada pelo *P. falciparum*. De um modo geral, o quadro clínico inicia-se com febre e evolui com alterações do comportamento, convulsões e alterações do estado de consciência que progridem para o coma, acompanhadas de outras anomalias neurológicas [17]. A incidência da malária cerebral varia entre 1 a 10% dos casos hospitalizados, dependendo da população estudada e da definição de malária cerebral usada [18]. Nos países da África subsaariana com elevada endemicidade e alta transmissão, a malária cerebral é a principal causa de morbilidade e de mortalidade, principalmente em crianças com menos de cinco anos, causando défices neurológicos, por vezes irreversíveis, incluindo sequelas cognitivas e epilepsia [19, 20].

Durante um período de seis meses a um ano, entre 1999 e 2000, a Secção Regional da OMS para África coordenou um estudo sobre a malária severa que incluiu 1230 crianças, dos seis aos cinquenta e nove meses, em doze hospitais distritais de dez países africanos, designadamente, Burkina Faso, Costa do

Marfim, Benin, Togo, Nigéria, Camarões, Burundi, Uganda, Zâmbia e Etiópia. Na globalidade, a anemia severa (hemoglobina inferior a 5g/dl) foi a complicação mais frequente, com uma prevalência de 54,1%. Contudo, a malária cerebral e a hipoglicemia foram as complicações que se associaram a uma mortalidade mais elevada, com uma taxa de fatalidade de caso de 17,7% e 13%, respectivamente [21].

## **1.2 A Clínica da Malária**

### **1.2.1 O ciclo de vida do parasita**

Em 1880, Laveran descreveu as formas eritrocíticas do *Plasmodium* no ser humano [8], mas foi apenas dezassete anos depois, através de uma publicação de Ronald Ross, que se tornou conhecido que o parasita utiliza o mosquito como hospedeiro invertebrado, onde se processa a reprodução sexuada [22]. As fases da reprodução assexuada do *Plasmodium* processam-se num ser vertebrado. No caso do *P. falciparum*, os gametócitos existentes na corrente sanguínea do homem infectado constituem as formas infectantes para o mosquito. Estas são ingeridas pela fêmea do mosquito do género *Anopheles* numa das suas refeições hematófagas e no intestino transformam-se em esporozoítos que posteriormente se alojam nas glândulas salivares [23].

Numa próxima refeição, a fêmea do *Anopheles* irá inocular esporozoítos na camada dérmica do hospedeiro humano. Os esporozoítos ganham acesso à circulação sanguínea e linfática, passando pelos sinusóides hepáticos cujas paredes atravessam. Depois de terem migrado por vários hepatócitos, os esporozoítos infectam um hepatócito, iniciando-se neste a fase de esquizogonia tecidular que consiste no crescimento e multiplicação do parasita. Cada esporozoíto dá origem a milhares de merozoítos [24]. Estes rompem o hepatócito, alcançam a circulação sanguínea, invadindo os eritrócitos e, no seu interior, desenvolvem-se em trofozoítos. Nesta fase de invasão do eritrócito, ocorrem as primeiras manifestações clínicas da malária. No eritrócito, os trofozoítos multiplicam-se e formam-se os esquizontes (fase de esquizogonia sanguínea). Com a lise dos eritrócitos, libertam-se merozoítos, alguns dos quais irão invadir

outros eritrócitos, dando início a um novo ciclo de esquizogonia, enquanto que outros se desenvolverão em gametócitos. Cada ciclo de esquizogonia sanguínea do *P. falciparum* dura quarenta e oito horas [15, 25].

A figura 3 ilustra o ciclo de vida do *P. falciparum* no hospedeiro humano e na fêmea do mosquito do género *Anopheles* [26].

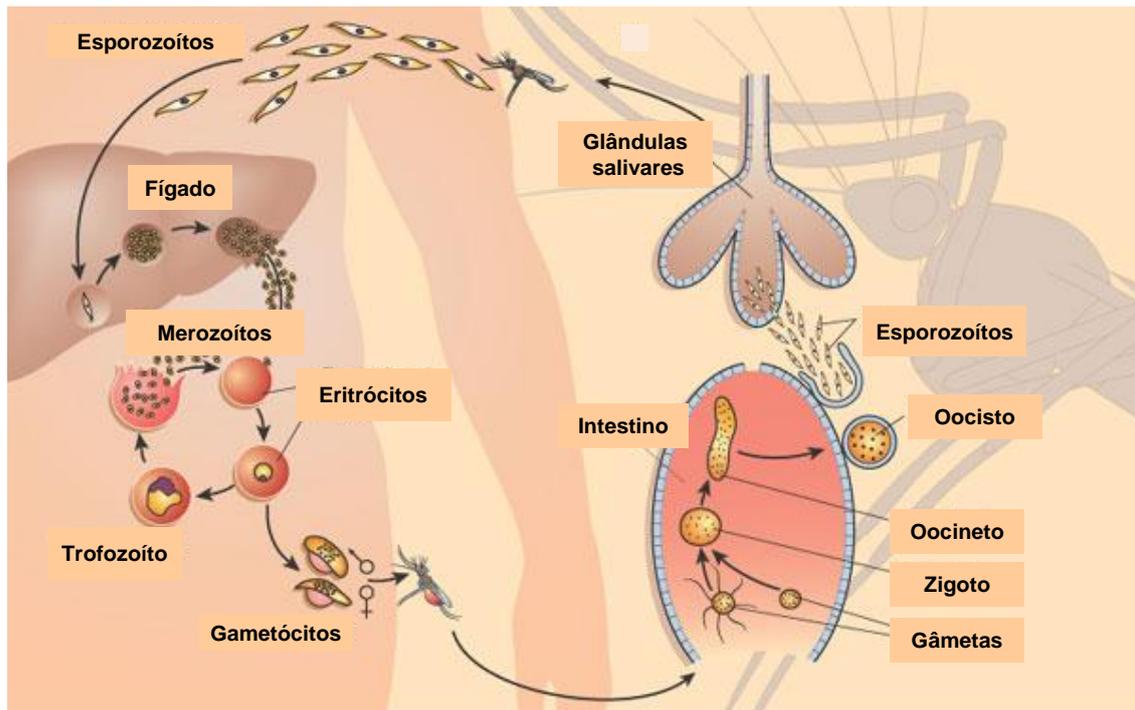


Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Adaptado de Wirth 2002 [26].

### 1.2.2 Períodos pré-patente e de incubação

Nos indivíduos não imunes infectados pelo *P.falciparum*, o tempo que medeia entre a inoculação dos esporozoítos e a detecção de parasitemia é de dez dias, variando entre cinco a dez dias e o período de incubação é de onze dias, variando entre seis a catorze dias. O período de incubação pode ser mais prolongado, quer em casos de imunidade adquirida por antecedentes de múltiplas exposições, quer em casos de profilaxia anti-malárica ou de prévio tratamento anti-malárico parcial que embora possa mitigar, não impede o desenvolvimento da doença [27].

### 1.2.3 Malária não complicada

A rotura dos esquizontes e a destruição dos eritrócitos são eventos que marcam o início das manifestações clínicas da malária. As manifestações clínicas são frequentemente sobreponíveis às de outras patologias, condicionando erros de diagnóstico por omissão ou por excesso [28]. Os sintomas podem ser inespecíficos, simulando uma síndrome gripal e iniciar de forma insidiosa ou súbita. Destes, os mais proeminentes incluem febre, calafrios, cefaleias e diaforese e podem coexistir com outros sintomas, tais como osteomioartralgias, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, vertigens e tosse seca. O exame físico pode ser normal, embora possam ser detectados sinais, tais como febre, taquicardia, icterícia, palidez, hipotensão ortostática, hepatomegália e esplenomegália. Nos indivíduos não imunes, o exame pode ser completamente banal, mesmo sem febre [27].

### 1.2.4 Malária Severa

O *P. falciparum* é a espécie causadora da maioria das complicações que integram as diferentes síndromas de malária severa, mesmo em países como a Índia [29], onde existem alguns registos de complicações causadas pelo *P. vivax* [30, 31].

O sequestro de eritrócitos parasitados e não parasitados pelo *P. falciparum* na microcirculação de múltiplos órgãos e particularmente no cérebro é extremamente valorizado na patogénese da malária severa em geral e na da malária cerebral, em particular. Contudo, cada vez mais se associam as disfunções dos órgãos a alterações metabólicas resultantes, em última instância, do desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e a resposta anti-inflamatória à infecção pelo *P. falciparum* [32-34]. O factor de necrose tumoral (TNF) e o interferão gama (IFN- $\gamma$ ) são as citocinas pró-inflamatórias que mais se conotam com o processo imunopatológico da malária severa [35-37]. As propriedades microbidas [38] e o efeito vasodilatador do óxido nítrico [39], cujo aumento de produção durante a infecção por *P. falciparum* resultaria da indução da enzima óxido-nítrico sintetase (iNOS2A) [40], constituem argumentos para valorizar o seu

efeito na fisiopatologia da malária severa. O óxido nítrico aumentado difundir-se-ia através do tecido cerebral, alteraria o fluxo sanguíneo cerebral, reduziria a captação do glutamato e em consequência promoveria a excitotoxicidade, interferindo com a função neuronal [41].

Em 1990, a OMS definiu os critérios de malária severa para uniformizar a assistência clínica e os estudos epidemiológicos [42]. No ano de 2000, estes critérios foram revistos pela OMS, tendo sido incluídas outras manifestações clínicas e laboratoriais que agravam o prognóstico, tais como o *distress* respiratório [43]. Alguns estudos concluíram que os critérios da OMS de 2000 preservaram a elevada sensibilidade na detecção das complicações mais graves e tornaram-se de mais fácil aplicação [44, 45].

A malária cerebral, o edema pulmonar, a insuficiência renal aguda, a anemia severa e as manifestações hemorrágicas são as complicações mais graves da malária severa [27]. A acidose metabólica e a hipoglicemia são as complicações metabólicas mais comuns [46]. Nas crianças africanas são mais frequentes a malária cerebral, a hipoglicemia, a anemia severa e a acidose metabólica [12]. Na Índia, as manifestações de disfunção multiorgânica assumem grande importância na apresentação da malária severa em crianças [47].

No mesmo doente, podem coexistir várias complicações, que após se terem instalado subitamente, evoluem eventualmente de forma rápida conduzindo à morte em poucas horas ou dias. Na prática clínica, a detecção destas complicações deve ser o mais precoce possível e o tratamento deve ser imediato, porquanto a malária severa é considerada uma emergência médica [48].

A tabela 1 resume a frequência das manifestações de malária severa em crianças.

Tabela 1. **Frequência das manifestações de malária severa em crianças.**

	Sintomas/Sinais/Síndrome	Muito frequente	Comum	Rara
Neurológicas	Convulsões	X		
	Prostração	X		
	Alteração do estado de consciência	X		
	Coma	X		
Hematológicas	Anemia severa	X		
	Icterícia		X	
	Hemorragias			X
Equilíbrio ácido-base	Acidose metabólica	X		
Metabólicas	Hipoglicemia	X		
	Hiperlactatemia		X	
	Hiperparasitemia	X		
Circulatórias	Hipotensão e colapso circulatório		X	
Respiratórias	Edema pulmonar			X
	Distress respiratório	X		
Hepáticas	Insuficiência hepatocelular			X
Renais	Insuficiência renal aguda			X
	Hemoglobinúria			X

## **Complicações da malária severa não cerebral**

### **Anemia severa**

A anemia severa da malária é uma complicação muito frequente nas crianças residentes em áreas hiperendêmicas de malária, contribuindo para a elevada morbidade e mortalidade da malária [49] e é definida por uma concentração de hemoglobina inferior a 5 g/dl ou hematócrito inferior a 15%. Esta anemia é muitas vezes agravada por uma anemia ferropénica pré-existente. Os sintomas e os sinais da anemia dependem da velocidade com que se instalou o défice de hemoglobina. Uma redução súbita da hemoglobina pode desencadear anoxia cerebral e falência cardíaca. A patogénese da anemia é complexa, sendo certo que para ela contribui a hemólise massiva intravascular condicionada pelo *P. falciparum*. No entanto, a eliminação da circulação de eritrócitos não parasitados, por lise mediada pelo complemento e por fagocitose, devida à deposição de complexos imunes e activação do complemento, também pode ser um factor subjacente [50]. Por outro lado, aceita-se que os doentes com malária têm uma eritropoiese deficiente que condiciona a diminuição da produção de eritrócitos [51, 52].

### **Hiperparasitemia**

A hiperparasitemia é um sinal laboratorial que, por si só, de acordo com os critérios da OMS é uma manifestação de malária severa [43]. Contudo, a evolução clínica das crianças que têm este sinal parece ser menos aguda. A relação entre a parasitemia e a severidade da malária varia de acordo com as populações e com o grupo etário. Uma parasitemia igual ou superior a 4%, em crianças não imunes de áreas de endemicidade instável, constitui um factor de risco acrescido para a morte por malária, devendo por esta razão ser considerado um sinal de malária severa [47]. Em áreas de endemicidade estável, considera-se como sinal de malária severa uma parasitemia igual ou superior a 20% no sangue periférico [43] com a presença de pigmento malárico (trofozoítos maduros ou

esquizontes), embora se deva ter em conta que os valores limiares a considerar dependem da experiência local [53].

### **Hipoglicemia**

A hipoglicemia é uma manifestação comum em doentes com malária severa [54], independentemente de estarem ou não sob terapêutica com quinino, especialmente em grávidas e em crianças [55]. Esta complicação pode estar relacionada com a hiperinsulinemia induzida pelo quinino [56], mas também pode ser observada em doentes com valores normais de insulina. O jejum prolongado que amiúde acompanha a malária, condicionado, quer pela anorexia, quer pelas náuseas e pelos vômitos, é um factor de risco importante a valorizar na génese da hipoglicemia [57]. A sua detecção requer uma monitorização regular da glicemia, porquanto sintomas e sinais frequentes na hipoglicemia, tais como a ansiedade, a dispneia, a taquicardia, a sudação, o coma, as posturas anómalas e as convulsões generalizadas, também são característicos da malária severa *per se* [27].

### **Acidose metabólica**

A hipoxia tecidual, o aumento do metabolismo corporal e a falência das funções catabólicas hepáticas são factores que contribuem para a acidose metabólica. A hiperventilação é um dos sinais de alerta de acidose metabólica severa que poderá fazer parte de um quadro de edema pulmonar ou mesmo de síndrome de *distress* respiratório agudo (SDRA) ou ainda ser uma manifestação de uma pneumonia associada. A acidose metabólica é um dos sinais de pior prognóstico na malária severa [54, 58, 59].

### **Hipovolemia, hipotensão e choque**

As manifestações de hipovolemia são muito frequentes, para as quais podem contribuir a febre persistente, a sudação profusa, a ingestão inadequada de fluidos e os vômitos. A anemia severa da malária e a obstrução microvascular causada pelo sequestro dos eritrócitos parasitados, contribuem para o agravamento da hipovolemia que evolui com hipotensão, choque e hipoperfusão

de órgãos vitais, tais como o cérebro e os rins. A hipoxia tecidual acarretará um metabolismo anaeróbio e acidose láctica [59].

### **Complicações pulmonares**

A dispneia é o sinal de alerta de complicações pulmonares que habitualmente evoluem com hipoxemia e insuficiência respiratória que requer entubação. Estas complicações são mais frequentes nos adultos do que nas crianças [60]. O edema pulmonar é uma complicação muito grave, geralmente não é cardiogénico e pode progredir para a SDRA que evolui com aumento da permeabilidade capilar pulmonar. A lesão pulmonar aguda, diferente da SDRA, geralmente ocorre alguns dias após o início da doença e pode desenvolver-se rapidamente, mesmo após uma aparente boa resposta ao tratamento anti-malárico inicial e a eliminação da parasitemia [61].

### **Icterícia**

Quer a hemólise, quer a disfunção hepática, podem ser a causa da icterícia. Todavia, a icterícia causada por disfunção hepática habitualmente é de intensidade moderada a severa, não sendo frequente a progressão para encefalopatia hepática por insuficiência hepatocelular [62, 63].

### **Complicações renais**

As manifestações de envolvimento renal variam desde azotémia pré-renal até necrose tubular aguda, secundária a isquemia renal. Tal como ocorre com as manifestações pulmonares, as complicações renais são mais frequentes nos adultos do que nas crianças [64].

### **Coagulopatia**

A malária habitualmente não cursa com quadros hemorrágicos, apesar de ser comum a ocorrência de trombocitopenia [65]. A coagulação intravascular disseminada é descrita em menos do que 10% dos doentes com malária severa [66].

### 1.2.5 Malária Cerebral

Segundo os critérios da OMS, a definição estrita de malária cerebral requer, para além da presença de formas assexuadas de *Plasmodium* no sangue periférico, a ocorrência de coma não despertável e a exclusão de qualquer outra causa identificável de encefalopatia [43].

Esta definição estrita aplica-se exclusivamente à investigação em malária cerebral. Na verdade, do ponto de vista prático, o exercício clínico em áreas endémicas de malária recomenda que a hipótese de malária cerebral deva ser sempre considerada no diagnóstico diferencial, perante um doente com parasitemia assexuada de *P. falciparum* que manifeste qualquer alteração do estado de consciência. Contudo, estudos de necropsia demonstraram que, mesmo quando se julga estarem excluídas outras causas de encefalopatia, nem sempre a constatação de formas assexuadas de *P. falciparum* no sangue de crianças em coma, corresponde à malária cerebral [67].

O conceito de coma não despertável requer incapacidade de localização de estímulos dolorosos, não existindo paresia nos membros superiores. O uso de escalas para avaliação do coma permite quantificar o seu grau de severidade, minorando assim a subjectividade dos examinadores. A escala de Glasgow e a escala de Blantyre são as mais frequentemente utilizadas na prática clínica. A escala de Blantyre é uma modificação da escala de Glasgow adaptada para crianças, incluindo as que ainda não aprenderam a falar [68]. A escala de Glasgow também é utilizada em crianças mais crescidas [69], podendo ser feitas adaptações à utilizada nos adultos [70]. O estado de coma não despertável corresponde a uma pontuação igual ou inferior a dois em cinco na escala de Blantyre e igual ou inferior a seis na escala de Glasgow. Nesta pontuação do coma deve ser sempre tomada em consideração a melhor resposta ao estímulo doloroso e, nos casos em que o coma se instalou após uma crise convulsiva generalizada, esta quantificação só deverá ser valorizada uma hora após o fim da crise, por causa do conhecido coma transitório pós-convulsivo.

As meningoencefalites bacterianas ou virais devem ser estudadas no diagnóstico diferencial, porquanto não é rara a coexistência de parasitemia com estas infecções [71, 72].

Nos últimos anos, tem-se vindo a valorizar alguns sinais de retinopatia na malária cerebral que crescem maior acuidade ao diagnóstico [73]. Na retina visualizam-se áreas pálidas na periferia e na mácula (poupando a fóvea), descoloração vascular, tornando-se os vasos alaranjados ou brancos, múltiplas hemorragias retinianas, predominantemente brancas no centro, assim como exsudatos algodinosos e papiledema. Estas alterações são demonstráveis por fotografia e por angiografia fluoresceínica bem como por estudos de correlação clínico-histopatológica [67, 74, 75].

Nas crianças, de um modo geral, a malária cerebral tem um início agudo, com febre e as manifestações sugestivas de envolvimento cerebral ocorrem num período entre 24 a 48 horas. As convulsões generalizadas ou multifocais, não raramente repetidas e prolongadas, são muitas vezes o primeiro “sinal de alarme”, produzindo um estado convulsivo, sem recuperação da consciência [76]. No entanto, há casos em que a deterioração do estado de consciência é gradual, iniciando com prostração que se manifesta por incapacidade da criança se manter sentada ou de deglutir. Mais raramente, a instalação do coma é precedido de manifestações psicóticas que se mantêm durante alguns dias. O registo electroencefalográfico em crianças com malária cerebral revela alterações compatíveis com uma encefalopatia difusa, mas a sua maior utilidade consiste na detecção de uma diversidade de crises clínicas subtis e electrográficas [77, 78]. Nos adultos, a instalação do coma é gradual e a ocorrência de convulsões é muito menos frequente (15 a 20%).

Tratando-se de um quadro de encefalopatia difusa, o exame neurológico pode evidenciar qualquer tipo de anomalia, incluindo hemiplegia [79]. Nos casos mais graves, os reflexos do tronco cerebral podem ser anormais e são muito frequentes as anomalias da motilidade ocular com desvio conjugado do olhar [43]. As posturas anómalas dos membros são muito frequentes nas crianças, com hiperextensão e pronação dos quatro membros ou flexão dos membros superiores, combinada com extensão dos membros inferiores [80]. Estas posturas

podem ser permanentes ou ocorrer de forma intermitente e, tanto podem ser sinais de hipoglicemia, como podem traduzir hipertensão intracraniana [17] que ocorre com frequência na evolução da malária cerebral [81, 82]. Embora um padrão respiratório anormal na evolução clínica possa ser causado por edema pulmonar, aquele prenuncia complicações, tais como a acidose metabólica, a hipertensão intracraniana com eventual risco de herniação transtentorial, crises epiléticas subtis ou ainda pneumonia [83].

As convulsões generalizadas prolongadas e repetidas associadas ao coma prolongado, à acidose metabólica, à hipoglicemia, ao *distress* respiratório e às manifestações de hipovolemia são complicações que agravam o prognóstico da malária cerebral [84-86].

### **Sequelas da malária cerebral**

Após recuperação do coma, algumas crianças têm alterações transitórias, tais como psicose e ataxia. Contudo, podem ocorrer défices neurológicos que revertem depois de alguns meses, como ocorre com a cegueira cortical e com a afasia, ou ainda défices irreversíveis, tais como hemiparesia, défice cognitivo e atraso do desenvolvimento psico-motor [87-90]. A síndrome neurológica pós-malária é um quadro auto-limitado de manifestações neurológicas e psiquiátricas que ocorre num período até dois meses, após um episódio de malária cerebral. Todavia, o seu aparecimento tem sido relacionado com o tratamento prévio com mefloquina em doentes que não tiveram malária cerebral [90]. Estudos realizados no Gabão [91], no Quênia [92] e no Mali [93] sugerem uma forte associação positiva entre a malária cerebral e a epilepsia.

## 1.3 Genética da Malária

### 1.3.1 Componente genética das doenças infecciosas

Desde 1954, ano em que foi publicado o primeiro estudo sobre um alelo de resistência à malária [94] que a investigação de factores genéticos de susceptibilidade às doenças infecciosas tem acumulado progressos notórios. Esta evolução tem-se processado em interface com muitas das mais activas disciplinas das ciências biomédicas, tais como a genética e a genómica [95], a imunobiologia [96], a evolução [97, 98], os estudos de genética de populações [99], a biologia dos agentes patogénicos [100], a ecologia [101] e a epidemiologia das doenças infecciosas [102].

O volume crescente de informação resultante daquela interface multidisciplinar [103] consolida o conhecimento de que a expressão clínica das doenças infecciosas é condicionada, não só pela virulência do agente, mas também pela interacção de múltiplas variantes genéticas do hospedeiro com factores de risco ambientais [104]. Deste modo, justifica-se a caracterização das doenças infecciosas como doenças complexas ou multifactoriais, nas quais a herança da susceptibilidade genética não segue um padrão Mendeliano de hereditariedade e a interacção com o agente infeccioso é determinada pela interferência de múltiplas variantes genéticas. Nesta asserção, incluem-se como exemplos, a malária, a infecção VIH/SIDA, a tuberculose, a schistosomose, a lepra, a cólera e as hepatites virais [105, 106]. Esta noção da contribuição poligénica nas manifestações das doenças foi inicialmente reconhecida em doenças não infecciosas, tais como a hipertensão arterial, a diabetes mellitus, a doença de Alzheimer, a obesidade, a asma, a esquizofrenia, diversos tipos de neoplasias malignas e as coronariopatias. Estas doenças não infecciosas têm sido igualmente objecto de aturada investigação quanto à identificação de factores genéticos de susceptibilidade [107].

A variação genética [108] pode explicar parcialmente, por exemplo, porque razão algumas crianças desenvolverão malária cerebral fatal ou *kwashiorkor*, enquanto que outras crianças que vivem no mesmo meio, igualmente expostas aos parasitas da malária e a carências alimentares, não desenvolvem estas

síndromas clínicas severas. Todavia, para a grande maioria dos genes estudados, subjacente à noção de influência poligénica na susceptibilidade às doenças infecciosas, está o facto de que cada variante genética contribuirá de forma modesta para a patogénese ou para a evolução clínica da doença [106]. Deste modo, tendo em conta a diminuta influência de cada factor genético no risco de manifestar certas características fenotípicas da doença (medido por exemplo pelo odds-ratio), conclui-se que estes efeitos genéticos na maior ou menor resistência à infecção têm individualmente uma reduzida dimensão na fisiopatologia da doença infecciosa. Sendo este o panorama típico retirado dos estudos sobre as componentes genéticas das doenças infecciosas, em que o odds-ratio (OR) dos *loci* identificados é geralmente inferior a três, haverá a tendência para questionar a utilidade de tal investigação. Contudo, se os eventuais efeitos genéticos reduzidos forem detectados no contexto de uma doença extremamente comum, e portanto com forte impacto na saúde pública, e se houver múltiplos genes a exercer acção semelhante, então o efeito global da componente genética poderá ser significativo e os conhecimentos retirados destes estudos podem, no seu conjunto, adquirir relevância para a compreensão da patogénese da doença [109]. Assim, considera-se que, a longo prazo, o impacto da investigação genética no domínio das doenças complexas será mais ao nível da população do que ao nível individual, facto que recomenda uma cuidadosa interpretação dos resultados de associação pela comunidade científica [110, 111].

Os estudos da genética da malária severa em geral, e da malária cerebral em particular, têm-se desenvolvido com a convicção de que, subjacente ao amplo espectro fenotípico da infecção por *P. falciparum*, está a interacção de factores genéticos com outros factores, não apenas inerentes ao ser humano (exposição prévia ao parasita), mas também imanentes do parasita (variabilidade genética) e a parâmetros epidemiológicos locais (taxa de transmissão). O resultado desta investigação é o crescente número de publicações que relatam a associação entre a malária cerebral ou outras formas de malária severa e variantes genéticas em mais de trinta genes humanos [112, 113]. Estes conhecimentos integrarão os pilares de sustentação dos futuros programas de controlo da malária, obtidos não só com o combate ao *Plasmodium*, recorrendo a anti-maláricos eficazes e ao

*Anopheles* com insecticidas apropriados, mas também com a descoberta de vacinas anti-maláricas seguras.

Os factores genéticos poderão interferir em qualquer fase da infecção, desde a picada do mosquito, até à morte provocada pela malária severa. Sem subvalorizar a importância dos factores ambientais, estima-se que, em crianças africanas, os factores genéticos contribuam com 25% da variação observada no risco para desenvolver a malária severa. A fracção deste risco explicável por factores genéticos que comprovadamente conferem resistência à malária severa, tal como a hemoglobina S (HbS), é exígua (2%), levando a concluir que muitos outros factores genéticos ainda estão por identificar [114].

### 1.3.2 O impacto da malária no genoma humano

A adaptação ao meio ambiente faz parte da história da evolução do ser humano e, em alguns casos, pode resultar de uma forte pressão selectiva que favoreça certas características particulares, bem como as variantes genéticas que lhes estão subjacentes [115].

A África é considerada a região com maior diversidade genética humana, largamente representada no genoma das populações da região subsaariana. Em parte, esta diversidade genética deverá reflectir o impacto das doenças infecciosas na evolução do genoma. Será plausível considerar que esta evolução tenha incorporado, num certo grau, a tendência para reduzir a susceptibilidade às doenças infecciosas a que estas populações estão expostas [115-117].

A hemoglobina S (HbS) é um caso paradigmático de evolução balanceada. Neste caso, a aquisição de um mecanismo de resistência à malária, evidenciado pela concordância geográfica entre a distribuição da hemoglobina S e a endemicidade da malária [118], originou a aquisição de um traço. A homozigotia SS, embora não interfira na fertilidade [119], implica uma redução significativa da esperança de vida, devido às diferenças funcionais da hemoglobina que origina [120]. Todavia, o estado heterozigótico proporciona uma esperança de vida normal e uma forte protecção particularmente contra as formas severas da malária [94, 121].

O *Plasmodium spp.*, constitui um dos factores mais evidentes de pressão selectiva recente no genoma humano [122]. A coexistência do parasita e do hospedeiro humano ao longo dos últimos 10 000 anos [123] suscitou em ambos a evolução de mecanismos de protecção. Do lado do parasita, estes mecanismos espelham-se não só na crescente emergência de polimorfismos genéticos que propiciam a resistência aos anti-maláricos, mas também na complexa e diversificada gama de antigénios que o *Plasmodium* utiliza para evadir os mecanismos da defesa imunitária [124-126].

No hospedeiro humano, mesmo tendo em conta que em populações distintas os factores de resistência à malária se desenvolveram de modo diferente, está demonstrado que as mutações que reconhecidamente oferecem maior efeito protector contra a malária severa ocorreram em genes que codificam para proteínas do eritrócito, “nicho residencial” do *Plasmodium*. A elevada frequência da HbS nos países endémicos da África Ocidental (Figura 4) [127] e o forte grau de protecção que esta mutação confere contra as formas severas de malária, são entendidos como prova evidente do forte efeito selectivo da malária na evolução do genoma humano [94, 128-130].

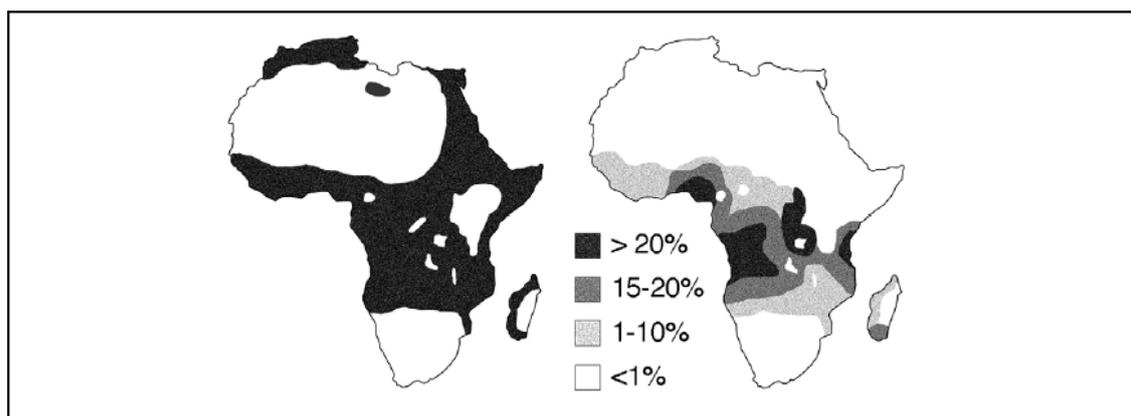


Figura 4. **Coexistência geográfica de malária falciparum e alelo HbS.** Allison AC, 2009 [127].

(Esquerda) A região em África onde havia transmissão do *P. falciparum* antes da introdução das medidas de controlo contra a malária. (Direita) Frequência do alelo *HbS* nas populações Africanas.

A hemoglobinopatia C (HbC), as talassémias e o défice de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), com diferentes padrões de distribuição na África Ocidental, constituem também alterações genéticas que defendem as populações

das formas severas de malária e são igualmente bons exemplos das marcas imprimidas no genoma humano pela pressão selectiva da malária [131-137].

Um bom exemplo da heterogeneidade da pressão selectiva do *Plasmodium* em diferentes grupos étnicos é a quase completa protecção contra a infecção por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) das populações da África ao sul do Sahara, não obstante existirem todas as condições ambientais para a transmissão do *P. vivax*. Este comportamento de resistência destas populações contrasta com a vulnerabilidade de todas as outras populações humanas ao *P. vivax* [127]. Para a invasão dos eritrócitos, o *P. vivax* requer a formação de um complexo entre o antígeno Duffy (antígeno de um grupo sanguíneo) e um receptor para as quimiocinas (DARC – acrónimo do inglês *Duffy antigen receptor for chemokines*). A falta de expressão do DARC na superfície do eritrócito deve-se à existência de um polimorfismo genético no gene *FY*, o alelo *FY\*O*, que resulta num fenótipo negativo para o grupo sanguíneo Duffy [138].

Estudos efectuados na África ocidental, demonstraram que os povos da etnia Fulani do Burkina Faso [139] e do Mali [140] tinham uma prevalência significativamente baixa de parasitemia e de episódios cínicos de malária, comparativamente a outros grupos étnicos que habitam em aldeias vizinhas. Nestes povos, também se registaram níveis mais elevados de anticorpos anti-*Plasmodium* e uma baixa frequência de variantes protectoras da globina e de outros factores clássicos de resistência à malária [141]. Estas observações são da maior relevância para estudos genéticos da malária, porque indicam claramente que o estudo de um determinado factor genético ou gene poderá evidenciar efeitos genéticos diferentes em populações distintas.

Na “malha” deste equilíbrio de forças ecológicas também se incorpora a evolução das populações do mosquito do género *Anopheles*, com sinais evidentes de resistência adquirida aos insecticidas usados no combate à malária [142, 143].

## **1.4 Análise Genética da Malária**

Na investigação genética da malária cerebral e da malária severa, a abordagem que tem sido utilizada com maior frequência é a análise de associação genética em estudos de casos-controlos [144]. As asserções genéricas resultantes desta análise advêm da comparação das frequências alélicas e genotípicas dos casos com as dos controlos [145]. Se as frequências das variantes genéticas analisadas forem mais elevadas nos casos do que nos controlos, considera-se que estas variantes conferem susceptibilidade à malária. Todavia, se as frequências nos casos forem significativamente inferiores às dos controlos, considera-se que as variantes conferem resistência à malária e, portanto, são protectoras. Este método de análise genética tem sido muito utilizado no estudo de doenças com componente poligénica. Actualmente, os estudos de associação genética incorporam uma sofisticação apreciável, quer nos métodos laboratoriais para análise das variantes genéticas, quer nos métodos estatísticos para análise dos dados de estudos que integram um grande número de *loci* genéticos e de indivíduos [146].

Os estudos de associação genética e particularmente os estudos de casos-controlos pressupõem exigências no desenho do estudo e implicam condicionantes à análise e à interpretação dos resultados. Na perspectiva desta tese, estes aspectos são abordados tendo em consideração os seguintes factores: a doença em questão, a população em estudo e os meios de análise disponíveis.

### **1.4.1 Recrutamento dos casos e dos controlos**

Os critérios de inclusão e o número de indivíduos a integrar no estudo são dois aspectos de particular importância a considerar no recrutamento dos participantes.

A inclusão de doentes nos distintos grupos deverá obedecer a critérios clínicos claramente fixados, de modo a favorecer a homogeneidade clínica da amostra e a interpretação das associações genéticas. No desenho do estudo, a selecção dos casos pressupõe uma definição inequívoca dos critérios de

diagnóstico, bem como de todos os critérios de exclusão. A selecção dos controlos baseia-se no princípio básico dos estudos de casos-controlos que consiste em responder à questão se determinado parâmetro (neste caso frequências alélicas e genotípicas) é mais frequente nos que têm a doença do que naqueles que não a têm.

Nos estudos de malária severa consideram-se como controlos, quer indivíduos com malária não complicada, quer indivíduos sem malária. No caso específico da malária cerebral, em que o coma é uma das características que, em sentido estrito, a distingue de outras síndromas de malária severa, os controlos também podem ser doentes com manifestações de malária severa não cerebral.

Naturalmente que, tratando-se de um estudo retrospectivo, a selecção dos controlos é feita no momento em que o caso se torna caso e, portanto, os controlos serão os indivíduos que naquele momento não têm a doença. O mesmo será dizer que a selecção dos controlos não se faz entre aqueles que não desenvolverão a doença, o que no caso de uma doença comum como a malária é impossível garantir. Na verdade, esta abordagem que deixa em aberto a possibilidade de no futuro alguns dos controlos tornarem-se casos, pode reduzir o poder estatístico do estudo, mas tem o mérito de ser equivalente ao que ocorre nos estudos de coorte. Nestes, as taxas de risco em qualquer momento do estudo baseiam-se em comparações entre os que desenvolveram a doença com os que, naquele momento, embora encontrando-se em risco de a desenvolver, ainda não a manifestaram [147].

A base populacional dos indivíduos a utilizar como controlos deve ser comparável à dos grupos de doentes, no que diz respeito não só à etnicidade, mas também a outros factores não genéticos, tais como a área de residência e o enquadramento socioeconómico e cultural. Estes factores podem provocar enviesamentos na exposição dos indivíduos à doença. A etnicidade é um factor particularmente relevante nas populações da África subsaariana, devido à grande diversidade genética e à mistura étnica que pode existir em vários graus, resultante da frequente coabitação de diferentes etnias no mesmo espaço geográfico. As características dos controlos devem reflectir oportunidades iguais às dos casos para serem incluídos no estudo, na eventualidade de

desenvolverem a doença. Nesta asserção, reside a importância da fonte de selecção dos casos e dos controlos: se exclusivamente a partir da comunidade, ou se estendendo também a indivíduos doentes que recorram ao hospital onde são atendidos os casos.

Em investigação genética, torna-se boa prática que os estudos de associação de casos-controlos sejam complementados por estudos robustos à estratificação da população. Uma abordagem complementar capaz de eliminar os artefactos produzidos pela estratificação étnica é a realização de estudos baseados em famílias, avaliando a transmissão da presumida variante de resistência/susceptibilidade, comparando os genótipos da criança afectada com os genótipos dos progenitores heterozigóticos. De acordo com a hereditariedade Mendeliana, a probabilidade de transmissão de uma dada variante genética é de 0,5. Se a variante genética estiver na realidade associada à doença, a transmissão genética desta variante, de progenitores heterozigóticos para uma criança afectada, ocorrerá em número superior ao esperado, no caso de se tratar de uma variante que confere susceptibilidade à doença ou em número inferior ao esperado, caso se trate de uma variante de resistência. Esta ocorrência é designada por distorção da transmissão genética e o teste estatístico que a quantifica designa-se por Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) [148-150].

No entanto, pelo facto de a malária ser uma doença de curta duração, os estudos de famílias nem sempre são fáceis de concretizar; pode ser difícil determinar o estado clínico dos irmãos dos afectados, uma vez que muitas outras doenças fatais confundem-se com a malária e a recolha de amostras biológicas (sangue ou esfregaços bucais) de ambos os progenitores nem sempre é possível. Estas dificuldades impõem importantes limitações ao estudo genético da malária.

O número de casos e de controlos pode condicionar a análise e as conclusões de um estudo de associação genética, porquanto a obtenção de um poder estatístico suficiente para detectar uma diferença na frequência de uma variante genética entre os dois grupos, está muito dependente da frequência dessa variante na população [151] (Ver Figura 5, após “Associação genética e desequilíbrio de ligação”). Exemplificando: um estudo típico poderia almejar um poder estatístico de 80% para detectar uma associação com um valor de  $P$

inferior a 0,05, assumindo que o genótipo da variante influenciava o risco de doença com um OR de 2. Se o genótipo da variante ocorrer numa frequência aproximada ou inferior a 0,2, o número de participantes necessários para obter um OR com valor estatístico será na ordem dos milhares, a menos que o OR seja muito elevado. Se a frequência for mais alta (0,3 – 0,4), os números de pacientes necessários será mais reduzido, na ordem das centenas. Estes cálculos de poder estatístico são relevantes para avaliar a dimensão dos efeitos genéticos que o estudo pode detectar.

### 1.4.2 Associação genética e o desequilíbrio de ligação

Por regra, os estudos de associação genética não permitem retirar a ilação de que uma variante genética associada à doença constitui *per se* o factor etiológico da associação detectada. De facto, o fenómeno de desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *linkage disequilibrium*) [152-154] leva a que, muito frequentemente, numa determinada população, diversas variantes genéticas localizadas próximas numa determinada região cromossómica, sejam herdadas em conjunto, dificultando assim a identificação da variante que está implicada na etiologia da doença [155]. Quando, num cromossoma, dois ou mais alelos se localizam muito próximos um do outro, a sua segregação não ocorrerá de forma independente, porque a probabilidade de serem separados um do outro por recombinação meiótica será muito reduzida. Nestas circunstâncias, diz-se que os dois (ou mais) alelos se encontram em linkage e a probabilidade de serem herdados em conjunto é muito elevada. Esta associação alélica origina o fenómeno de *linkage disequilibrium* (LD).

Os alelos de um cromossoma nesta situação de LD constituem haplótipos que, salvo algumas excepções, ocorrem em pares (diplótipos), provindo cada um de um progenitor. As excepções são as situações em que existe apenas um haplótipo, tais como nos cromossomas sexuais masculinos e em certas anomalias cromossómicas que são monossómicas [156]. Assim, a identificação de haplótipos na população em estudo, através da avaliação da associação alélica de múltiplos *loci* numa dada região cromossómica, assume uma importância

maior. Nesta análise, constroem-se mapas de LD, quantificando-se o LD entre cada par de marcadores localizados numa dada região cromossômica. Estes mapas permitem a identificação de blocos de LD que representam a demarcação física de haplótipos na região estudada. A medida de LD habitualmente utilizada em estudos de casos-controles é o  $r^2$  variando entre 0 (ausência de LD) e 1 (LD completo), em contraste com o parâmetro  $D'$  que é utilizado principalmente em estudos de genética de populações [152].

Em termos operativos, os estudos de associação genética retiram vantagem do fenómeno de LD, porquanto, em regiões de elevado LD ( $r^2$  superior a 0,7), não é necessário estudar a variante causal do fenótipo em estudo para detectar a associação genética. Nestes casos, infere-se que a associação genética detectada é obtida através de uma variante que se encontra em LD com a variante que causa o fenótipo em estudo. Por outro lado, a existência de LD nas regiões em estudo, facilita a identificação dos polimorfismos a estudar, visto que a análise de um número limitado de polimorfismos pode ser suficientemente informativa para capturar a variabilidade genética numa região de LD [157].

A figura 5 [151] mostra o número mínimo necessário de casos e de controlos (tamanho mínimo da amostra – TMA) para obter um poder estatístico de 95% com um erro de tipo I de 5%, assumindo que os dois alelos no *locus* da doença se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), para uma medida de LD com  $D' = 1$ , considerando uma doença com uma prevalência de 0,012 [151].

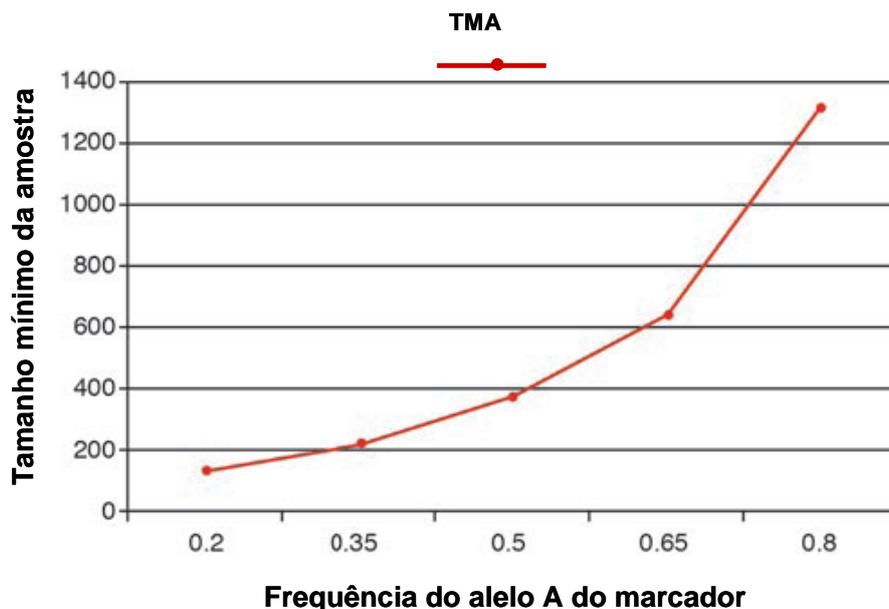


Figura 5. Tamanho mínimo da amostra (casos e controlos) para um desenho de casos-controlos de acordo com os valores das frequências alélicas dos polimorfismos. Adaptado de Gordon e Finch, 2005 [151].

### 1.4.3 Genes e polimorfismos alvo

Muito recentemente, tornou-se possível a realização de estudos de associação à escala genómica (GWAS, acrónimo do inglês *Genome Wide Association Studies*) [146]. Esta metodologia baseia-se na análise de dezenas de milhares de polimorfismos genéticos em milhares de indivíduos e requer recursos financeiros avultados [107]. O desenho destes estudos procura, por um lado, analisar variantes genéticas ao longo de todo o genoma, evitando enviesamentos na selecção dos *loci* alvo do estudo e, por outro lado, utilizar um número suficiente de casos e de controlos que garanta poder estatístico para identificar efeitos genéticos reduzidos (OR 1,2 a 1,3).

O primeiro estudo genético da malária severa, incluindo a malária cerebral, à escala genómica foi publicado recentemente e excepto para o caso da mutação *HbS*, não identificou associação com nenhuma outra variante de genes de proteínas relacionadas com o eritrócito [158], nem com outras associações previamente descritas com a malária severa. Contudo, o estudo também evidenciou novas associações com variantes genéticas anónimas e ainda não

relacionadas com genes específicos, identificadas em dezanove regiões genómicas, algumas das quais parecendo ser específicas de malária cerebral. Está assim gerada a expectativa que, num futuro próximo, a análise detalhada deste estudo possa revelar novos factores genéticos que influenciam a susceptibilidade/resistência à malária, bem como a dos resultados de um estudo multicêntrico que decorre em onze países endémicos de malária, no âmbito de um consórcio [159].

Todavia, o conhecimento acumulado na investigação genética da malária deriva sobretudo de estudos de associação genética dirigidos a genes e polimorfismos alvo que são identificados em diferentes contextos, designadamente com base em argumentos funcionais, em analogias com o seu envolvimento noutras doenças e em modelos animais de malária. Assim, os genes candidatos mais intensamente estudados estão implicados na adesão do eritrócito infectado e na regulação da resposta imune e da inflamação, mas é infrequente que sejam conhecidos genes candidatos em que esteja identificada uma relevância biológica inequívoca para a doença.

Nos últimos anos, houve um incremento de recursos tecnológicos disponíveis para identificar e seleccionar polimorfismos genéticos. As variantes genéticas mais frequentemente utilizadas nos estudos de genes candidatos são os polimorfismos mononucleotídicos (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*, SNPs). A selecção dos SNPs beneficia principalmente os que se situam nas regiões codificantes dos genes, pressupondo que possam ter algum significado funcional. É o que acontece com os SNPs que provocam alterações no produto da expressão do gene. No entanto, tal como ocorre com os genes candidatos, nem sempre se comprova o significado funcional de um SNP. Mesmo os SNPs das regiões não codificantes dos genes, tais como os da região promotora, podem condicionar a regulação da actividade do gene [160].

Por outro lado, a selecção de SNPs nos genes alvo deve ter em consideração a estrutura de LD das regiões a estudar. De facto, a informação disponível em bases de dados públicas, nomeadamente o projecto HapMap, permite seleccionar os SNPs a estudar, tendo em conta a população. Todavia, este método de selecção não é insensível às diferenças étnicas que podem existir

entre as populações. Um outro aspecto a considerar é que alguns SNPs são conhecidos por terem uma alta probabilidade de insucesso de genotipagem. Nestes casos, é recomendável adicionar outros SNPs, de modo a capturar a variação dessa região, seleccionando o SNP mais próximo com um LD elevado ( $r^2$  superior a 0,7) e/ou um SNP em completo LD, usando a informação do projecto HapMap, se os indivíduos tiveram uma ancestralidade semelhante [160]. Estes SNPs seleccionados na base do LD (“*tagSNPs*” ou “*htSNPs*”) permitem reduzir o número de SNPs a genotipar na população em estudo.

Aceitando a ideia de poligenismo genético que pressupõe que cada variante contribui com um efeito genético pequeno na susceptibilidade/resistência à doença, nos estudos de associação tem fundamento considerar o efeito conjunto de múltiplos SNPs de um dado gene ou de uma dada região de um cromossoma. *Haplotype tagging* é a abordagem usada em alguns estudos em que se seleccionam e genotipam apenas os SNPs que definem os haplótipos comuns (os *tagSNPs*). No entanto este método sujeita-se não só às limitações inerentes à definição dos blocos de LD na população, mas também ao facto de muitos genes candidatos e regiões genómicas possuírem muitos haplótipos [161].

#### 1.4.4 Complexidade genética e a malária

A compreensão da natureza complexa da susceptibilidade/resistência à malária implica a noção de que os efeitos das múltiplas variantes genéticas envolvidas deverão actuar de forma combinada e não isolada, interagindo entre si, sem se afastar consideravelmente do que ocorre em condições fisiológicas. Deste modo, para efeitos desta tese, é apropriado abordar a interacção entre dois ou mais genes na base do conceito de epistasia. Por outro lado, a manifestação fenotípica de um dado genótipo num indivíduo, estará sujeita a influências que determinarão não só a maior ou menor expressão de uma variável quantitativa, mas também a qualidade do fenótipo. Nesta asserção, cabem os conceitos de penetrância e expressividade de um gene e de traços quantitativos.

## Epistasia

Apesar de alguma controvérsia no conceito de epistasia, a sua existência é amplamente aceite e reconhecida como um contribuinte importante para a variação genética nos traços complexos. De facto, alguns dos melhores exemplos de epistasia emergem do estudo da saúde humana [162].

Nesta tese, o conceito de epistasia restringe-se apenas ao entendido na perspectiva da interacção entre genes que não fazem parte do mesmo *locus* e que, de facto, até podem estar muito afastados uns dos outros no genoma. Desta interacção deverá resultar uma consequência fenotípica benéfica ou deletéria [163].

Com a convicção de que a epistasia faz parte da arquitectura genética que determinará a susceptibilidade/resistência às doenças comuns, as interacções complexas entre os genes tornam-se ainda mais importantes do que os efeitos independentes de cada gene. Independentemente do método estatístico utilizado, paramétrico ou não paramétrico, para a detecção da epistasia nos estudos de casos-controlos, assume-se que esta interacção poderá fornecer dados sobre os mecanismos e as vias envolvidas na doença, sobretudo dos que se relacionam com a interacção biológica entre as proteínas implicadas. Todavia, não é fácil fazer inferências biológicas directas a partir dos resultados de testes estatísticos. Por um lado, é preciso ter em conta que os métodos de regressão que se usam servem para testar a epistasia apenas entre os *loci* que foram genotipados. Por outro lado, é necessário considerar que estes *loci* não são necessariamente as variantes etiológicas da associação à doença, mas que se encontram em LD com a ou com as variantes etiológicas. Em consequência, provavelmente a epistasia entre os *loci* genotipados se dilua comparativamente com a epistasia das variantes etiológicas, embora a extensão com a qual isto ocorre dependerá da magnitude do LD. Na verdade, os estudos moleculares poderão, mais do que a estatística, dar resposta às interacções biológicas [164].

## **Penetrância incompleta e expressividade variável dos genes**

Quer a penetrância, quer a expressividade, são medidas que servem para descrever a diversidade da expressão fenotípica de um gene. Quando o fenótipo distingue inequivocamente o genótipo não mutante do genótipo mutante, a mutação tem uma penetrância de 100%. Contudo, muitas mutações manifestam uma penetrância incompleta, isto é, nem todos os indivíduos com o genótipo expressam o fenótipo correspondente. A penetrância define-se então como a percentagem de indivíduos com um dado alelo que exibe um fenótipo associado àquele alelo [153].

O fenótipo de um alelo mutante que se desenvolveu num determinado meio ambiente pode ser semelhante ao de um indivíduo com o alelo não mutante que teve origem num ambiente diferente. A penetrância incompleta pode ser consequência do efeito de outros genes que podem actuar como modificadores, epistásicos ou repressores no restante genoma, impedindo assim a expressão do fenótipo típico. Pode acontecer também que o gene não tenha nenhuma função e, neste caso, o fenótipo do alelo mutante será imperceptível.

A expressividade mede o grau de expressão de um dado alelo no fenótipo, isto é, mede a intensidade de um fenótipo. Os factores ambientais e a variação na constituição alélica do restante genoma podem explicar a expressividade [153].

A penetrância incompleta e a expressividade variável podem dificultar qualquer tipo de análise genética, incluindo a análise de famílias [153]. O estudo de alelos de baixa penetrância nas neoplasias malignas, como doenças complexas que são, tem sido uma linha de investigação importante no interesse de esclarecer as diferentes taxas de risco observadas em famílias com mutações oncogénicas altamente penetrantes [165].

## **O estudo de traços quantitativos**

Os traços quantitativos são traços complexos, para os quais a variação fenotípica tem uma distribuição contínua com a variação da população, aproximando-se frequentemente de uma distribuição estatística normal, numa escala apropriada. A título de exemplos, como traços quantitativos, os níveis de

expressão génica são fenótipos moleculares, enquanto que a pressão arterial é um fenótipo fisiológico [166].

A apresentação do traço quantitativo como uma variável contínua deve-se à complexidade genética que emerge da segregação de alelos em múltiplos *loci* [167]. O efeito de cada um destes alelos no fenótipo do traço geralmente é relativamente pequeno e a sua expressão é sensível ao meio. Os efeitos alélicos também podem depender da estrutura genética e do sexo do indivíduo. Esta complexidade pode fazer com que não haja uma clara correlação entre o genótipo e o fenótipo, o que significa dizer que estes traços não estão sujeitos a taxas Mendelianas. A altura é um traço quantitativo clássico. Todavia, a acondroplasia que é uma forma de nanismo, e portanto não corresponde a uma variação fisiológica, resulta de uma mutação autossómica dominante Mendeliana no gene do receptor 3 do factor de crescimento de fibroblasto [166].

A importância da avaliação de traços quantitativos no estudo das doenças complexas advém do facto da susceptibilidade genética às doenças complexas comuns como a malária, ter na sua base uma variação genética quantitativa. A identificação de genes que afectam os traços quantitativos pressupõe o prévio mapeamento de *loci* que os afectam (QTL – de *quantitative trait loci*). Os QTL são regiões genómicas nas quais segregam um ou mais alelos que afectam o traço. Após o seu mapeamento, a análise centra-se em cada região de QTL com o objectivo de um estreitamento ulterior dos intervalos genómicos que contêm o gene ou os genes que afectam a variação do traço. A etapa final, que é a mais desafiadora, é a identificação dos genes causais.

Os SNPs estão entre os marcadores mais frequentemente utilizados para o mapeamento de QTLs. Se um QTL estiver associado a um SNP, então, em média, os indivíduos com diferentes genótipos para este SNP terão um valor médio diferente do traço quantitativo. A figura 6 [168] exemplifica o efeito genético exercido pelos genótipos de um marcador de dois *loci* diferentes sobre o peso do cerebelo de murganhos de estirpe BXD.

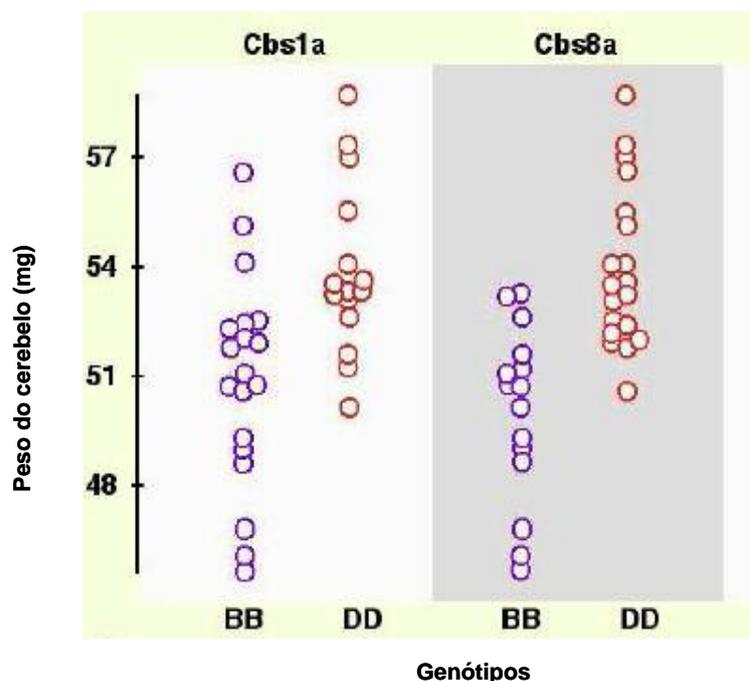


Figura 6. Efeito genético de *locus* de traço quantitativo sobre o peso do cerebelo em murganhos BXD. Adaptado de Airey, 2001 [168]. A análise individual dos marcadores revelou o efeito aditivo dos genótipos BB em ambos os *loci* Cbs1a (cromossoma 1) e Cbs8a (cromossoma 8), promovendo a diminuição do peso do cerebelo dos murganhos. Existe uma diferença de 6,4 mg no peso entre as estirpes BXD com os genótipos BB (n = 9) ou DD (n = 9), em ambos os *loci*.

O mapeamento por associação, contrário ao mapeamento por *linkage*, investiga a associação entre um marcador (por exemplo, um SNP) e diferentes valores de um traço quantitativo em indivíduos não aparentados, retirados directamente de uma população. É imprescindível determinar os valores do fenótipo e os genótipos de todos os indivíduos na população em estudo para todos os SNPs. Depois, utiliza-se um método estatístico para verificar, para cada SNP, a existência de diferenças significativas no valor do traço quantitativo entre os indivíduos com genótipos diferentes. Se forem detectadas diferenças significativas, então o QTL estará associado ao SNP. Este procedimento é repetido para cada SNP (ou para cada par de SNPs adjacentes) para se efectuar um estudo do genoma para os QTLs. O estudo de tecidos que se julguem relevantes para o traço quantitativo pode fornecer algumas evidências relacionadas com a funcionalidade dos SNPs. A associação do gene ao QTL

pode ser corroborada por evidências, tais como a alteração da proteína e modificações dos níveis de ARNm ou do ARN. [166].

## 1.5 Os Genes estudados

### Genes das moléculas de adesão

No cérebro, a barreira hematoencefálica (BEE), os aspectos específicos do metabolismo celular, do transporte de metabolitos e do tráfego intracelular, caracterizam a sua microcirculação, distinguindo-a da existente noutros órgãos. Contudo, a resposta da microcirculação cerebral à inflamação parece ser semelhante à que ocorre nos outros órgãos e tecidos, onde a activação e a disfunção endotelial contribuem para a disfunção arteriolar, capilar ou venular. Nesta resposta inflamatória inserem-se: o stress oxidativo; a disfunção da barreira hematoencefálica manifesta por excessiva permeabilidade; o aumento de expressão das moléculas de adesão das células endoteliais; o recrutamento de leucócitos e de plaquetas circulantes e aderentes. Apesar disso, parece haver algumas diferenças qualitativas e quantitativas na resposta específica da microcirculação cerebral à inflamação. No entanto, desconhece-se se tais diferenças se devem às características muito peculiares do endotélio cerebral ou se são consequência da acção específica de algumas células do tecido cerebral e/ou das células endoteliais, no que concerne aos mecanismos de sinalização molecular ou aos mediadores da inflamação [169].

Estas considerações, que são genéricas a qualquer processo inflamatório cerebral, também se aplicam à infecção pelo *P. falciparum* que obviamente implicará o acréscimo de toda a complexidade específica da interacção hospedeiro-agente patogénico.

O sequestro dos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* na microcirculação cerebral, em conjunto com os leucócitos e as plaquetas, é considerado um dos factores chave da patogénese da malária cerebral. Todavia em necropsias de casos de malária severa, o sequestro também se observa noutros órgãos, tais como os pulmões, o tracto gastrointestinal, o miocárdio e o músculo-esquelético [170, 171] e existem algumas evidências de que possa não ser exclusivo do *P. falciparum* [172]. O sequestro deve-se à adesão dos eritrócitos parasitados às células endoteliais dos capilares cerebrais e das vénulas pós-

capilares [173, 174]. Também se verifica a adesão entre os eritrócitos parasitados (auto-aglutinação), bem como aos eritrócitos normais, dando origem ao fenómeno de “formação de rosetas” (*rosetting*) que, apesar de não ser específico, é considerado importante na patogénese da malária cerebral [175].

A adesão dos eritrócitos parasitados às células endoteliais é um processo complexo, que requer a interacção das proteínas do parasita, que se expressam na superfície dos eritrócitos do hospedeiro, com as proteínas do eritrócito (receptores de adesão) [176]. Todavia, a variedade dos receptores de adesão do hospedeiro leva a que o fenótipo de adesão dos eritrócitos parasitados não seja homogéneo e, apesar dos vários estudos realizados, não existe uma correlação clara entre a severidade da doença e o fenótipo de adesão dos eritrócitos parasitados [177-179]. Contudo, se do lado do parasita a variação antigénica das proteínas de superfície do *P. falciparum* (*P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1- PfEMP1*) justifica as diferenças qualitativas e quantitativas observadas na ligação aos vários receptores [180], do lado do hospedeiro, as variações genéticas nos receptores de adesão também poderão influenciar a expressão do fenótipo de adesão.

Estudos de necropsia demonstraram a expressão de algumas moléculas de adesão nos capilares da microcirculação cerebral de doentes com malária cerebral, designadamente CD36, ICAM-1 e E-selectina [181].

### ***CD36 (Thrombospondin receptor)***

O gene *CD36* é constituído por quinze exões e cobre uma extensão aproximada de 32 kb no cromossoma 7 q11.2. Este gene codifica para o receptor CD36, que é uma glicoproteína que se expressa na superfície de várias células, tais como plaquetas, células endoteliais, células dendríticas, macrófagos, células hematopoiéticas, adipócitos e células musculares estriadas [182, 183].

O receptor CD36 é um dos mediadores da adesão dos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* às células endoteliais e às células dendríticas [184]. Apesar de não estar devidamente esclarecido o papel das células dendríticas na malária, levanta-se a hipótese da sua adesão aos eritrócitos

parasitados interferir com a sua capacidade de apresentação dos antígenos do parasita [185].

Na Gâmbia e no Quênia, foi demonstrado que os homozigóticos para o alelo *CD36<sup>+</sup>1264G* (dbSNP rs3211938) tinham maior um risco de progressão para a malária cerebral [186]. Contrariamente, num outro estudo que incluía população do Quênia, verificou-se que a heterozigotia do mesmo alelo protegia contra a malária severa [187]. Na Tailândia, foi descrita associação entre uma sequência dinucleotídica TG no intrão 3 e a redução do risco de malária cerebral [188]. Todavia, num estudo de casos-controlos de malária severa, malária cerebral e anemia severa, realizado na Gâmbia com 1288 indivíduos, incluindo trios (pais e criança afectada), não foi encontrada qualquer associação entre a malária severa e o polimorfismo *CD36<sup>+</sup>1264G*, nem com outros sessenta e nove SNPs do gene *CD36* [189].

### ***ICAM1 (CD54)***

Este gene situa-se no cromossoma 19p13.3-p13.2 e codifica para a glicoproteína da superfície celular, ICAM1 (CD54). Esta glicoproteína participa em processos inflamatórios e na resposta imune mediada pelas células T, expressando-se nas células endoteliais e nas células envolvidas na resposta imune [190].

Num estudo de necropsia de casos de malária cerebral constatou-se uma expressão significativamente maior das moléculas de adesão ICAM 1 e de E – selectina nos capilares cerebrais que evidenciavam sequestro dos eritrócitos parasitados [181]. Em estudos realizados *in vitro*, verificou-se que o polimorfismo *ICAM-1Kilifi* (dbSNP rs5491), que é relativamente comum em populações africanas de áreas endémicas de malária, reduz a adesão do parasita ao endotélio [191]. Estas constatações motivaram a realização de vários estudos de casos-controlos que testaram a associação entre o polimorfismo *ICAM-1Kilifi* e a malária severa, incluindo a malária cerebral. Contudo, os resultados revelaram-se algo confusos: no Quênia, este polimorfismo conferia susceptibilidade à malária cerebral [191] e no Gabão evidenciou-se como um factor de resistência contra a

malária severa [192]. Em estudos ulteriores, realizados com populações da Gâmbia, do Malawi e do Quênia [193, 194], bem como do Senegal [195], não foi encontrada nenhuma associação. Mais recentemente ainda, na Índia, foi descrito que um outro SNP do gene *ICAM1* conferia um maior risco de progressão para a malária severa [196].

### ***PECAM 1 (CD31- Platelet/endothelial cell adhesion molecule)***

O gene *PECAM1* localiza-se no cromossoma 17q23 [197] e codifica para a molécula de adesão PECAM1 que o *P. falciparum* utiliza como receptor para se ligar às plaquetas e às células endoteliais [176].

Estudos de associação realizados em Papua-Nova Guiné e no Quênia não revelaram associação entre a malária severa e um polimorfismo comum da região codificante no codão 125 (Leu→Val / dbSNP rs668) [198]. Todavia, num estudo realizado na Índia, verificou-se que o alelo G do SNP rs668 era um factor de maior risco para a malária severa na região endémica, enquanto que na região não endémica era protector [196]. Na Tailândia, foi descrita associação entre um haplótipo do gene *PECAM1* e susceptibilidade à malária cerebral, comparativamente com outras formas de malária severa [199].

#### **1.5.1.1 Genes da imunidade inata**

Da investigação dirigida à imunidade na malária, retira-se a ideia consensual de que a eficácia da resposta imune depende da rápida indução de uma resposta intensa mediada por citocinas pró-inflamatórias e de mecanismos efectores capazes de controlar atempadamente a replicação do parasita, promovendo a sua subsequente eliminação e a resolução da infecção [200].

A importância da imunidade inata, na definição da resposta subsequente da imunidade adaptativa na fase eritrocítica da infecção pelo *Plasmodium*, parece irrefutável. Considera-se que o principal papel da imunidade inata seja a produção de citocinas imunorreguladoras, como a interleucina – 12 (IL-12) e o interferão

gama (IFN $\gamma$ ) que sendo cruciais para o desenvolvimento de respostas imunes tipo Th1 envolvem células CD4 +, células B e células efectoras. Estas medeiam a resposta imune adaptativa celular ou a dependente de anticorpos ou a dependente de anticorpos [201, 202].

### ***NOS2 (Nitric oxide synthase 2, inducible)***

O gene *NOS2* localiza-se no cromossoma 17q11.2-q12, cobrindo uma extensão de 37 kb e codifica para a enzima indutora óxido nítrico sintetase (iNOS2) que se expressa no fígado em resposta a agentes patogénicos e a citocinas inflamatórias [203]. A enzima iNOS2 promove a oxidação catalítica da L-arginina, produzindo o óxido nítrico, que é um radical livre de semi-vida curta, com acção microbicida [204].

A actividade anti-*Plasmodium* do óxido nítrico foi evidenciada *in vitro*, quer em culturas de hepatócitos primários humanos infectados com *P. falciparum*, quer em culturas de hepatócitos de murganhos (BALB/c) infectados com *P. yoelii* [205]. Num estudo de casos-controlos, demonstrou-se uma maior expressão génica de *NOS2* nos casos de malária não complicada do que nos doentes com malária complicada e sugeriu-se que o óxido nítrico exercia um papel benéfico na eliminação do parasita [206]. Existe também evidência de que o óxido nítrico inibe a adesão dos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* e, deste modo, protege contra a malária cerebral [207]. No Gabão, foi descrita associação entre o alelo *NOS2A-954C* (dbSNP rs1800482) e protecção contra a malária severa [208, 209]. Contudo, esta associação não foi reproduzida na Tanzânia [210]. Um outro SNP localizado na região promotora do *NOS2A* (-1173 C→T) (dbSNP rs9282799) foi associado na Tanzânia e no Quénia a protecção contra a malária cerebral e a anemia severa da malária [211]. Na Gâmbia, foi descrita associação entre um microsatélite do gene *NOS2* e o maior risco de morte por malária severa [212]. Num estudo de casos-controlos com população gambiana, verificou-se que o polimorfismo *NOS2A-1659T* (dbSNP rs8078340) e um haplótipo definido pelo mesmo SNP aumentavam o risco de malária cerebral; esta associação foi reforçada pelo TDT efectuado em 334 crianças [213]. Na Índia, foi descrita

associação entre um maior número de repetições de um microssatélite CCTTT da região promotora do *NOS2* e susceptibilidade à malária cerebral [214].

### ***TLR4 (Toll-like receptor 4)***

Este gene situa-se no cromossoma 9q32-q33; a proteína codificada por este gene, o receptor TLR4, pertence à família dos receptores *Toll-like*, que são componentes importantes da imunidade inata, e expressa-se principalmente na placenta e na subpopulação mielomonocítica dos leucócitos [215]. Os receptores *Toll-like* desempenham um papel central no reconhecimento dos padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (PAMPs – acrónimo do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) e medeiam a produção de citocinas necessárias ao desenvolvimento de uma imunidade eficaz [216].

A importância do glicosilfosfatidilinositol do *P. falciparum* na indução de respostas pró-inflamatórias foi sugerida por estudos em modelos animais (murganhos). Constatou-se que *in vitro*, o glicosilfosfatidilinositol induzia a expressão de moléculas de adesão (ICAM1, VCAM1 e E-selectina), bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF) e do óxido nítrico [217]. Murganhos previamente imunizados com glicosilfosfatidilinositol e posteriormente infectados com *P. berghei* mostraram-se resistentes às manifestações de malária severa [218]. Em murganhos com deficiência de receptores *Toll-like* não se verificou protecção contra a malária cerebral [219].

Num estudo de casos-controlos realizado no Gana concluiu-se que SNPs do gene *TLR4*, *Asp299Gly* – dbSNP rs4986790 – e *Thr399Ile* – dbSNP rs4986791, aumentavam o risco de desenvolver malária severa em 1,5 e 2,6 vezes, respectivamente [220]. Contudo, estas evidências de associação entre SNPs de *TLR* e malária severa não foram detectadas em grandes coortes (> 6000 indivíduos) de populações do Malawi e da Gâmbia, que incluíam estudos em famílias [221].

### ***MBL2 [Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)]***

Este gene situa-se no cromossoma 10q11.2-q21 e codifica para a proteína sérica lecitina de ligação à manose (MBL). A MBL é uma proteína oligomérica

solúvel, produzida principalmente no fígado, que pertence à superfamília das lectina do tipo C. Estas proteínas participam na adesão celular, na activação das plaquetas e do complemento, no reconhecimento de agentes patogénicos, na endocitose e na fagocitose [222].

A participação da MBL na imunidade inata caracteriza-se pela sua ligação aos carboidratos da superfície de muitos agentes patogénicos, tais como a manose, a N-acetil-glucosamina, N-acetil-manosamina, glucose e a L-fucose, podendo também activar a via clássica do complemento [223].

Estudos de casos-controlos realizados no Gabão e no Gana demonstraram que polimorfismos do gene *MBL* aumentavam o risco de malária severa, causando alguns deles níveis séricos baixos da proteína [224-226]. Todavia, na Gâmbia não se verificou nenhuma associação entre a malária severa e variantes do gene *MBL* [227].

### ***CR1 [Complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)]***

Este gene localiza-se no cromossoma 1q32 e codifica para uma glicoproteína de membrana de tipo 1, o CR1, que é um membro da família dos receptores da activação do complemento. A proteína CR1 existe nos eritrócitos, nos leucócitos, nos podócitos glomerulares e nas células dendríticas foliculares esplénicas; medeia a ligação celular a partículas e a complexos imunes que activam o complemento. Nesta glicoproteína, situam-se os antígenos do sistema do grupo sanguíneo Knops [228].

O receptor CR1 é valorizado na fisiopatologia da malária cerebral por participar num dos mecanismos do fenómeno de “formação de rosetas” que é promovido por alguns clones do *P. falciparum*, através da ligação à proteína do *P. falciparum* PfEMP-1 [229, 230].

Os níveis plasmáticos de CR1 são determinados geneticamente. Em Papua-Nova Guiné, área endémica de malária, cerca de 80% da população saudável tem níveis plasmáticos baixos de CR1 [231]. Alguns polimorfismos genéticos de *CR1* relacionados com o défice plasmático do receptor CR1 associam-se não só a protecção contra a malária severa, mas também com a  $\alpha+$

talassémia, que também é altamente prevalente nesta população. Num estudo de casos-controlos, foi comprovado que a protecção que tais polimorfismos conferiam contra a malária severa era independente da exercida pela  $\alpha$ -talassémia [231]. Estudos realizados na Gâmbia, não evidenciaram associação entre a malária severa e polimorfismos do gene *CR1* [193, 232]. No Quênia, verificou-se que polimorfismos do gene *CR1* conferiam resistência contra a malária cerebral [233]. Na Tailândia, verificou-se que o aumento da expressão da proteína CR1 do eritrócito estava associado a um alelo do gene *CR1* localizado na região promotora que protege contra a malária severa [234]. Num estudo realizado na Índia concluiu-se que existia uma correlação entre polimorfismos do gene *CR1* que determinam o nível de expressão do receptor CR1 nos eritrócitos, a endemicidade da malária e o risco de malária severa. Os indivíduos das áreas não endémicas com níveis baixos do receptor CR1 eram mais susceptíveis à malária severa [235].

#### **1.5.1.2 Citocinas, receptores de citocinas e outros mediadores da inflamação**

A activação das células endoteliais condicionada pela interacção com os eritrócitos parasitados, pode levar à indução de uma variedade de citocinas e de outros mediadores inflamatórios [34]. A resposta inflamatória que o parasita induz no hospedeiro é um factor crítico para a patologia da malária [236]. Os modelos experimentais de malária cerebral sugerem um papel importante do equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 nas complicações associadas à malária cerebral [237]. Os estudos genéticos de malária cerebral em humanos tentam dar suporte a esta perspectiva, pretendendo-se demonstrar que o excesso de citocinas pró-inflamatórias ou o défice de citocinas anti-inflamatórias originado por factores genéticos, possam explicar os diferentes graus de susceptibilidade às formas severas de malária [238].

#### ***TNF [Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)]***

O gene *TNF* situa-se no cromossoma 6p21.3 e codifica para a citocina factor de necrose tumoral (TNF) [239]. Os efeitos biológicos da citocina codificada

por este gene e a localização gene *TNF*, na região da classe III do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), cerca de 250 kb centroméricas do *locus* do HLA-B e 850 kb teloméricas do *locus* do HLA-DR, têm motivado a investigação de polimorfismos no *locus* do gene *TNF* que poderiam contribuir para associações do MHC a doenças infecciosas. Esta asserção aplica-se particularmente a doenças como a malária, nas quais se tem demonstrado que níveis plasmáticos elevados da citocina TNF são preditivos de pior prognóstico [240]. Provavelmente, a citocina TNF represente uma parte da resposta protectora normal à malária, podendo ser induzida pela invasão associada ao glicosilfosfatidilinositol e às proteínas 1 e 2 de superfície do merozoíto (MSP-1 e MSP-2). Por outro lado, a citocina TNF induz a expressão da molécula de adesão ICAM – 1 no endotélio cerebral [35].

Estudos clínicos demonstraram uma associação positiva entre os níveis da citocina TNF e a gravidade da malária [240-242]. Vários estudos genéticos correlacionaram polimorfismos do gene *TNF* com a malária cerebral. Na Gâmbia as crianças homozigóticas para o alelo *TNF-308A* (dbSNP rs1800629) tinham um risco relativo de 4,0 para a malária cerebral e de 7,7 para a morte e sequelas por malária cerebral [243]; verificou-se que a associação à doença era independente da variação das classes I e II de HLA. Num estudo ulterior, utilizando a mesma amostra, concluiu-se que a anemia severa e a malária cerebral se associavam a alelos diferentes [244]. Em estudos de casos-controlos com crianças da Gâmbia e do Quênia constatou-se que o alelo *TNF-376A* (dbSNP rs1800750) conferia um risco 4 vezes maior de progressão para a malária cerebral [245].

### ***IL-10 (Interleukin 10)***

O gene *IL-10* localiza-se no cromossoma 1q31-32 e codifica para a interleucina 10 (IL-10) que é uma citocina importante na limitação da resposta inflamatória [246].

Embora se tenha demonstrado que a interleucina-10 (IL-10) protege contra a malária cerebral experimental [247], o papel desta citocina imunossupressora na malária cerebral em humanos ainda não foi devidamente

explorado. A medição dos níveis plasmáticos de IL-10 em doentes com anemia severa da malária não tem revelado resultados sobreponíveis, sendo descritos como baixos nuns casos e elevados noutros. No Mali, foram detectados níveis plasmáticos elevados de IL-10 associados à malária cerebral, comparando com controlos saudáveis e com controlos com malária não complicada [248, 249].

Num estudo de casos-controlos realizado na Tailândia, que incluía doentes com malária cerebral, o polimorfismo da região promotora -1082G/A que afecta a produção de IL-10, não revelou qualquer associação à malária severa, [250]. Na Gâmbia, não foi encontrada associação entre a malária severa e nenhum dos dez SNPs estudados no gene *IL-10*. Contudo, o estudo de associação haplotípica de casos-controlos revelou que um haplótipo do gene *IL-10* reduzia significativamente o risco de malária severa, resultado que o estudo familiar de desequilíbrio de transmissão não confirmou [251].

### ***IL10RB (Interleukin 10 receptor, beta)***

O gene *IL10RB* juntamente com os genes *IFNAR1*, *IFNAR2* (*interferon alpha, beta and omega receptor 2*) e *IFNGR2* (*interferon gamma receptor 2*) forma um cluster de genes dos receptores das citocinas da classe II do interferão no cromossoma 21 (21q22.1-q22.2; 21q22.11). A proteína codificada pelo gene *IL10RB* é um receptor indispensável à transdução do sinal induzido pela citocina IL-10 em coexpressão com o receptor *IL10RA* (*Interleukin 10 receptor, beta*) [246].

Estudos de associação de casos-controlos com polimorfismos do gene *IL10RB* efectuados em populações do Quênia e da Gâmbia concluíram que a presença do alelo mutante de alguns polimorfismos estudados (dbSNPs rs3171425 e rs1058867) aumentava significativamente o risco de malária severa, comparando com controlos saudáveis [252].

### ***IFNAR1 [Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1]***

Este gene localiza-se no cromossoma 21q22.11 e codifica para uma proteína de membrana do tipo I que forma uma das duas cadeias de um receptor para os interferões alfa e beta [253].

Um estudo com modelos animais de malária (murganhos) demonstrou que a parasitemia era mais baixa nos animais infectados com *P. yoelii* que tinham sido tratados com um híbrido humano recombinante de interferão alfa [254].

Na Gâmbia, foi descrito que certas variantes genéticas do *IFNAR1* protegiam contra a malária cerebral [255]. Um estudo de casos-controlos de malária severa com populações do Quênia, da Gâmbia e do Vietname, evidenciou que a presença do alelo mutante de certas variantes do gene *IFNAR1* conferia susceptibilidade à malária severa [252].

### ***HMOX1 [Heme oxygenase (decycling) 1]***

O gene *HMOX1* localiza-se no cromossoma 22q13.1 e codifica para as duas isoenzimas heme oxigenase 1 indutiva (HO-1) e heme oxigenase 2 constitutiva (HO-2). Devido às suas propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes, a enzima HO-1 preserva a homeostase vascular, incluindo a protecção das células endoteliais contra a toxicidade do heme, que é um dos indutores da sua expressão [256].

Cada eritrócito infectado por *P. falciparum* pode libertar aproximadamente 40% da sua hemoglobina que será imediatamente oxidada, com a consequente libertação do heme, que é uma molécula com acções pró-oxidante e pró-inflamatória, tóxica, tanto para o parasita, como para o hospedeiro. O parasita polimeriza o heme, convertendo-o num produto não tóxico, a hemozoína [257]. As células do hospedeiro aumentam a produção da enzima HO-1 que degrada o heme em biliverdina, monóxido de carbono e ferro 2+, sendo a biliverdina convertida em bilirrubina por acção da biliverdina redutase [258].

Estudos de malária em murganhos sugeriram não só que o heme livre exerce um papel crucial na patogénese da malária cerebral experimental, mas também que a sua degradação pode protegê-los, evitando a resposta inflamatória que destruiria a barreira hematoencefálica [259].

Foram descritos níveis elevados da enzima HO-1 no granuloma de Dürck, [260], uma alteração histopatológica da malária cerebral grave [261]. Embora até ao momento ainda não esteja determinado o papel da HO-1 na patogénese da malária cerebral, cada vez mais se admite que os mecanismos protectores do hospedeiro são críticos na determinação da evolução da malária para a malária cerebral [262, 263].

Um estudo de casos-controlos em Myanmar (Tailândia - grupo étnico Karen), que incluía 30 doentes com malária cerebral e 120 controlos com malária não complicada sugeriu a associação entre o comprimento dos microssatélites GT na região promotora do gene *HMOX1* e a apresentação clínica da malária, sendo a frequência dos homozigóticos para os alelos com menos do que 28 repetições significativamente mais elevada nos doentes com malária cerebral dos que nos controlos [264].

### ***HP (Haptoglobin)***

Este gene situa-se no cromossoma 16q22.1 e codifica para uma pré-proteína que origina as cadeias alfa e beta que compõem a haptoglobina. Esta liga-se à hemoglobina livre do plasma, permitindo o acesso de enzimas catalíticas [265].

A ahaptoglobinemia e a hipohaptoglobinemia devem-se a mutações na região estrutural do gene *HP* e/ou nas suas regiões reguladoras. No Gana, os polimorfismos da região promotora do gene *HP*, *A-61C* (dbSNP rs5471) e *C-101G* (dbSNP rs5470) foram associados a ahaptoglobinémia e a hipohaptoglobinémia, em amostras de indivíduos sem malária, respectivamente [266].

Os estudos de associação efectuados na África subsaariana entre polimorfismos da região promotora do gene *HP* e a malária severa têm produzido resultados diferentes. Na Gâmbia, não foi observado nenhum tipo de associação, enquanto que no Sudão e no Gana foram descritas associações entre polimorfismos do gene *HP* e um maior risco para a malária cerebral [267-269].

## **1.6 Estudo Genético de Síndromes de Malária Severa em Angola**

A intrincada interacção dos factores genéticos do hospedeiro com os do parasita, num determinado meio ambiente, condiciona os estudos de genética da malária. Toda esta interacção contribui para determinar a apresentação clínica e a evolução da malária que varia desde manifestações frustres facilmente resolvidas pelo hospedeiro, até às formas complicadas e potencialmente fatais da malária severa. Nas áreas de elevada endemicidade e de alta transmissão, os diferentes polimorfismos genéticos podem ainda influenciar não só o risco de desenvolvimento de parasitemia em indivíduos expostos ao parasita, mas também o risco de um indivíduo com parasitemia desenvolver a doença.

A diversidade étnica das populações e a heterogeneidade geográfica dos factores de susceptibilidade/resistência observadas nas regiões endémicas levantam dificuldades adicionais ao desenho dos estudos genéticos da malária. A realização destes estudos confronta-se ainda com dificuldades práticas, quando se pretende incluir a identificação e a análise de familiares de doentes com malária.

### **1.6.1 Amostragem no estudo genético da malária**

Os estudos genéticos para a detecção de factores de resistência à infecção pelo *Plasmodium* comparam indivíduos com e sem infecção assintomática. Esta pesquisa realiza-se nas comunidades, em regime ambulatorio e baseia-se na avaliação da parasitemia, que é uma variável quantitativa. Os estudos genéticos da malária não complicada, igualmente realizados nas comunidades, incluem também a quantificação da parasitemia, mas requerem ainda a presença de febre que é outra variável quantitativa. Avançando na escala de complexidade dos estudos genéticos da malária, depara-se com a diversidade clínica da malária severa (fenótipo), que se apresenta com múltiplas complicações. Por sua vez, o fenótipo malária severa manifesta-se sob a forma de várias síndromas (sub-fenótipos), como é o caso da malária cerebral. Esta avaliação do fenótipo malária severa, que é uma variável qualitativa e dos seus sub-fenótipos, tais como a

malária cerebral e outros, só é concretizável com estudos efectuados em doentes internados [112].

A realização de um estudo de associação genética em meio hospitalar estará sujeita à dinâmica própria da instituição, não sendo despendidos os seus recursos administrativos e outros referentes à assistência médica e aos cuidados de enfermagem. Deste modo, a investigação não se poderá dissociar dos procedimentos relacionados com o registo dos doentes, arquivo dos processos clínicos e obtenção de dados estatísticos, bem como dos recursos para a realização de exames complementares de diagnóstico. Nos casos de doenças graves, como a malária severa, acresce ainda a necessidade de cuidados assistenciais que requerem equipamento de suporte e de monitorização de funções vitais, bem como pessoal com capacidade para efectuar uma monitorização apertada do estado clínico e actuar prontamente com cuidados gerais e específicos, incluindo a administração de terapêutica indicada.

Apesar do grande ónus dos estudos hospitalares, ao recrutar cem crianças com malária severa, estar-se-á efectivamente a retirá-las de um universo de provavelmente 10 000 crianças que vivem nas áreas circunvizinhas do hospital, com os níveis mais baixos de protecção contra a malária severa, o que enriquece a amostra para os efeitos genéticos fortes [112].

Uma parte considerável dos estudos genéticos de malária cerebral nem sempre individualiza os casos de malária cerebral, incluindo-os no fenótipo malária severa, por ser comum a coexistência de várias complicações no mesmo doente. Por outro lado, os controlos são doentes com malária não complicada, doentes sem malária ou ainda indivíduos assintomáticos não infectados. Com este tipo de desenho de estudo, torna-se difícil distinguir se os efeitos genéticos detectados representam factores de risco de severidade da malária ou se são factores de risco específicos para o desenvolvimento de complicações da malária severa, tais como a malária cerebral.

## 1.6.2 Desenho do estudo

O principal objectivo desta tese consistiu em identificar variantes genéticas que aumentem ou diminuam especificamente o risco de progressão da malária severa para a síndrome de malária cerebral, permitindo distinguir a malária cerebral de outras formas de malária severa. O estudo pretende distinguir factores genéticos específicos da síndrome malária cerebral de factores que, não sendo específicos da evolução para a malária cerebral, contribuam para a susceptibilidade/resistência à malária severa.

Para identificar factores genéticos específicos de malária cerebral, desenhou-se um estudo de casos-controlos comparando crianças com malária cerebral (casos) com crianças com malária severa, mas sem manifestações clínicas de malária cerebral (controlos). Adicionalmente, os casos de malária cerebral são comparados a crianças de outros dois grupos controlo: crianças com malária não complicada e crianças não infectadas. Serão considerados factores de risco específico de malária cerebral, os que forem exclusivamente detectados no estudo comparativo entre os casos de malária cerebral e os controlos com malária severa não cerebral. Factores genéticos que sejam detectados na comparação entre os casos de malária cerebral e os controlos de malária não complicada e/ou não infectados serão caracterizados como factores inespecíficos de malária cerebral.

Tendo em consideração a grande diversidade genética das populações africanas e sendo desconhecido o grau de mistura étnica na região onde ocorreu o recrutamento dos pacientes, poderão obter-se resultados falsos positivos devidos a associações espúrias. Assim, recorreu-se à abordagem complementar de analisar o desequilíbrio de transmissão alélica, como forma de excluir a estratificação genética da população que poderá ser um factor enviesante do estudo. Deste modo, o TDT é utilizado para confirmar se a transmissão alélica de marcadores associados à malária cerebral está efectivamente desviada no grupo dos casos ou, não sendo possível detectá-la no casos, verificar de forma indirecta o efeito dos marcadores através da transmissão alélica nos controlos. A impossibilidade de garantir em todos os pacientes a colheita de amostras de

sangue de ambos os progenitores, levou a que se adoptasse a solução de utilizar apenas os genótipos das mães para o estudo da distorção da transmissão.

Neste estudo, a selecção de genes candidatos e de polimorfismos (SNPs) baseia-se no conhecimento *a priori* do envolvimento do gene na patogénese da malária cerebral que frequentemente resulta de estudos da malária cerebral experimental em modelos de malária com murganhos, cuja extrapolação directa para a malária cerebral humana deve ser feita com reservas [247, 259, 270, 271].

Angola é um país endémico de malária, onde coexiste uma elevada prevalência da HbS [272, 273], sendo a malária uma das causas mais importantes de morbilidade e de mortalidade em crianças menores de cinco anos [274].

Angola situa-se na parte ocidental da costa atlântica da África Austral, fazendo fronteira a norte com a República do Congo, a norte e a nordeste com a República Democrática do Congo, a sudeste com a Zâmbia e a sul com a Namíbia. Tem 1 246 700 km<sup>2</sup> de superfície e 8,3 habitantes/km<sup>2</sup>, para uma população estimada em dezasseis milhões, distribuídos por dezoito províncias e 164 municípios. Mais de metade da população é constituída por crianças com menos de quinze anos de idade e 25% destas tem menos do que cinco anos. Luanda, a capital, situa-se a noroeste, no litoral, com uma população estimada em três milhões.

Segundo o relatório da UNICEF sobre a “Situação Mundial da Infância 2008”, no ano de 2006 a taxa de mortalidade infantil abaixo dos cinco anos de idade em Angola foi de 250 mortes por 1000 nados vivos [275].

De acordo com os dados do Serviço Nacional de Vigilância Epidemiológica – Programa Nacional de Controlo da Malária (PNCM) (<http://malaria-angola.com/Malaria.aspx>) do Ministério da Saúde de Angola (2005), anualmente são notificados mais de um milhão e 500 mil casos clínicos de malária, com uma letalidade em crianças menores de 5 anos que varia entre os 15-30%. Em 2008, foram notificados três milhões de casos de malária não complicada, 200 000 casos de malária grave e nove mil mortes provocadas pela malária. As grávidas também representam um grupo em elevado risco de desenvolver complicações da malária.

Do ponto de vista de distribuição da endemicidade em Angola (Figura 7) [276], a malária é hiperendémica no norte e mesoendémica com transmissão estável, no litoral centro. As 4 províncias do sul que fazem fronteira com a Namíbia (Namibe, Cuando Cubango, Cunene e Huíla) têm uma transmissão predominantemente sazonal e são consideradas de risco epidémico. Luanda é uma província de risco epidémico, com períodos de alta transmissão durante 4 a 7 meses, de Outubro a Maio, coincidentes com a maior pluviosidade e períodos de baixa transmissão, de 4 meses na estação seca, de meados de Maio a Setembro (Plano estratégico nacional para o controlo da malária em Angola 2005-2009; PNCM). Durante a estação das chuvas, o clima é húmido, com temperaturas que variam entre os 25° e os 30°C e na estação seca as temperaturas médias descem para valores entre os 18° e os 22°C (Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica de Angola).

O principal vector da malária em Angola é a fêmea do mosquito do complexo *Anopheles gambiae* (*sensus lactus, arabiensis e melas*) e *Anopheles funestus*. O *P. falciparum* é a espécie mais comum, causando 90% de todas as infecções, seguido do *P. vivax* (cerca de 7%) e do *P. malariae* (1%) (Plano estratégico nacional para o controlo da malária em Angola 2005-2009 - PNCM).

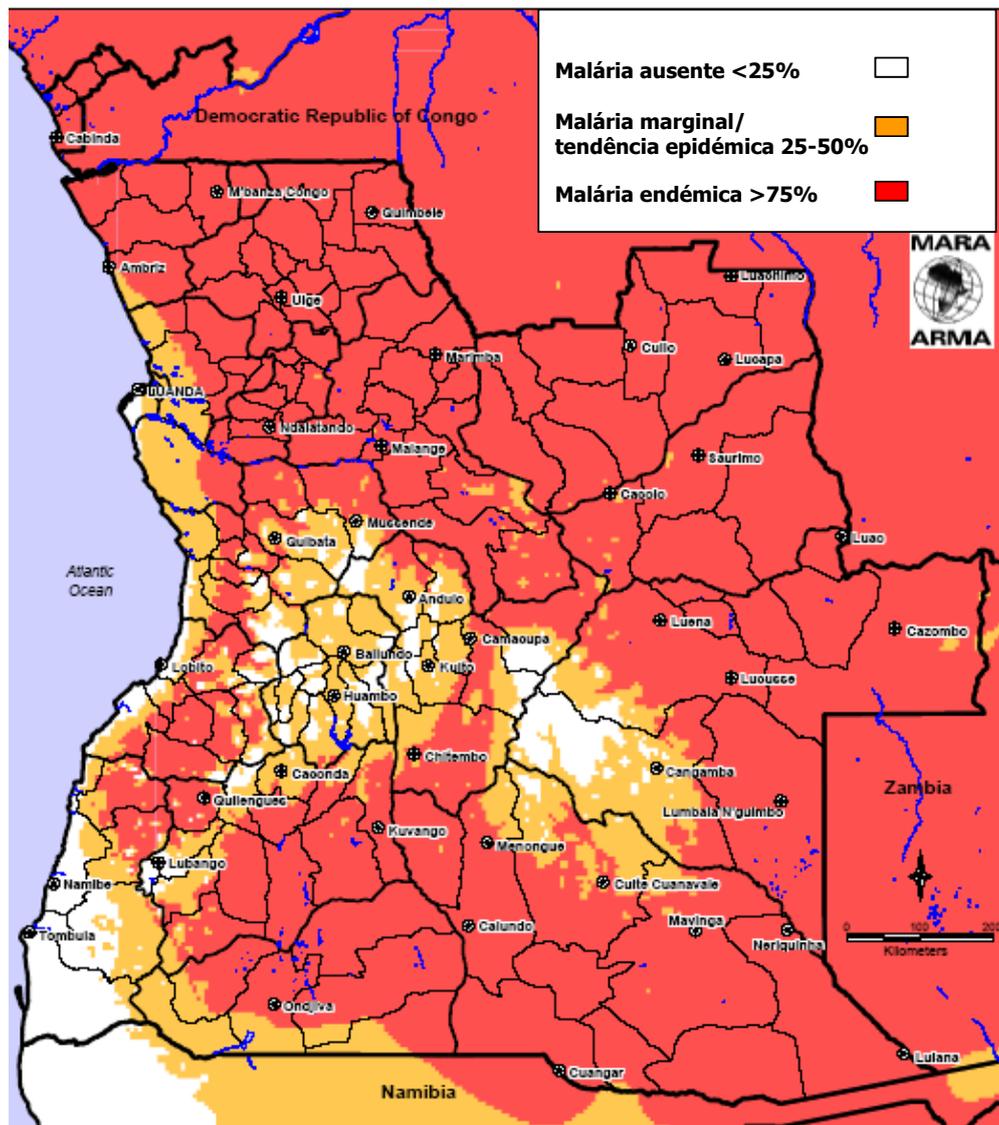


Figura 7. **Modelo de distribuição da malária em Angola.** Adaptado de MARA/ARMA collaboration (<http://www.mara.org.za>). Craig, M.H. et al. 1999 [276].

Angola integra os países que subscreveram a Declaração de Abuja sobre o Programa *Roll Back Malária* (RBM), na cimeira dos Chefes de Estado da Organização da Unidade Africana em 25 de Abril de 2000 (Plano estratégico nacional para o controlo da malária em Angola 2005-2009; PNCM). Um dos objectivos do RBM é a redução para metade do número de óbitos por malária, até ao ano de 2010. O Ministério da Saúde de Angola, através do PNCM, em parceria com agências das Nações Unidas e com outras instituições nacionais e internacionais, definiu um plano estratégico para vigorar de 2005 a 2009, que visa reduzir a prevalência da malária em Angola, nos próximos quatro anos, de três

milhões de casos clínicos para 900 000 casos. Este plano estratégico compreende as seguintes medidas e actividades:

- Programa de gestão e desenvolvimento de sistemas;
- Vigilância, Informação e Pesquisa;
- Promoção da saúde, Mobilização comunitária e Advocacia;
- Resposta às emergências e epidemias;
- Controlo integrado do vector e manuseio da protecção individual;
- Diagnóstico e manuseio dos casos e aprovisionamento adequado de medicamentos.

A maioria da população de Angola descende de povos de origem bantu e distribui-se por nove grandes grupos etnolinguísticos, designadamente: Kikongo, (Noroeste); Kimbundu (Centro-Oeste); Oxiwambo (Sudoeste); (oxikwanyama e oxindonga); Luvale (Leste); Lunda-cokwe (Nordeste); Ngangela e Oxiherero (Sudeste); Umbundu, (Centro - Sudoeste) e Olunyaneka-Nkhumbi (Sud-Centro-este). De salientar, porém, que outras componentes surgem da miscigenação que, desde cedo, começou a existir, primeiro entre diversos grupos que migraram para o território e, posteriormente, com europeus (principalmente portugueses) durante o período da colonização. O grupo étnico Kimbundu caracteriza-se por um maior grau de miscigenação, particularmente na zona de Luanda. Existem contudo alguns povos não bantu e um número considerável de europeus.

Durante a guerra civil que se verificou no País, gerou-se um movimento migratório de populações do interior para o litoral. Em consequência, constata-se actualmente em Luanda, a presença de representantes de quase todos os grupos etnolinguísticos.



## **2. OBJECTIVOS**

---

### **2.1 Objectivo Geral**

Esta tese teve como objectivo geral a identificação de determinantes genéticos que estejam associados especificamente à malária cerebral e a outras formas de malária severa na população infantil angolana.

### **2.2 Objectivos Específicos**

Nesta tese pretendeu-se identificar e discriminar, exclusivamente no contexto da malária severa, variantes genéticas que aumentem ou diminuam o risco de progressão para a síndrome de malária cerebral, permitindo deste modo distinguir a malária cerebral de outras formas de malária severa.

Assim, o estudo focou-se na análise de genes e polimorfismos que têm sido correlacionados com a susceptibilidade ou resistência a diferentes formas de malária severa, com o objectivo de:

- a. Distinguir factores genéticos que especificam formas cerebrais e formas não cerebrais de malária severa;
- b. Identificar factores genéticos de severidade da malária.



### **3. DOENTES E MÉTODOS**

---

#### **3.1 Aprovação Ética e Consentimento Informado**

Neste estudo participaram 749 crianças dos 6 meses aos 13 anos de idade, todas residentes em Luanda. Todos os procedimentos relacionados com a amostragem e com as colheitas das amostras biológicas dos participantes realizaram-se no Hospital Pediátrico David Bernardino (HPDB) em Luanda, após aprovação do Comité de Ética do HPDB que foi homologado pelo Ministério da Saúde de Angola (Anexo1). O Conselho de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa aprovou o desenho do estudo (Anexo 2). A inclusão no estudo exigia o prévio consentimento informado escrito dos pais ou do representante da criança. O modelo de consentimento informado foi redigido em português, sendo traduzido oralmente, sempre que necessário, para a língua materna do interlocutor (Apêndices 1 e 1a). O estudo respeitou os princípios éticos da Declaração de Helsínquia [277].

#### **3.2 Desenho do Estudo**

Tendo em mente os objectivos da tese, desenhou-se um estudo caso/múltiplos controlos, em que os casos de malária cerebral (MC) foram estudados por contraste com três grupos controlo: i) doentes com formas não cerebrais de malária severa (SnC) ii) doentes com formas não complicadas de malária (MnC); iii) crianças assintomáticas não infectadas (NIF).

A figura 8 representa esquematicamente o desenho do estudo de casos (MC) *versus* controlos (SnC, MnC e NIF).

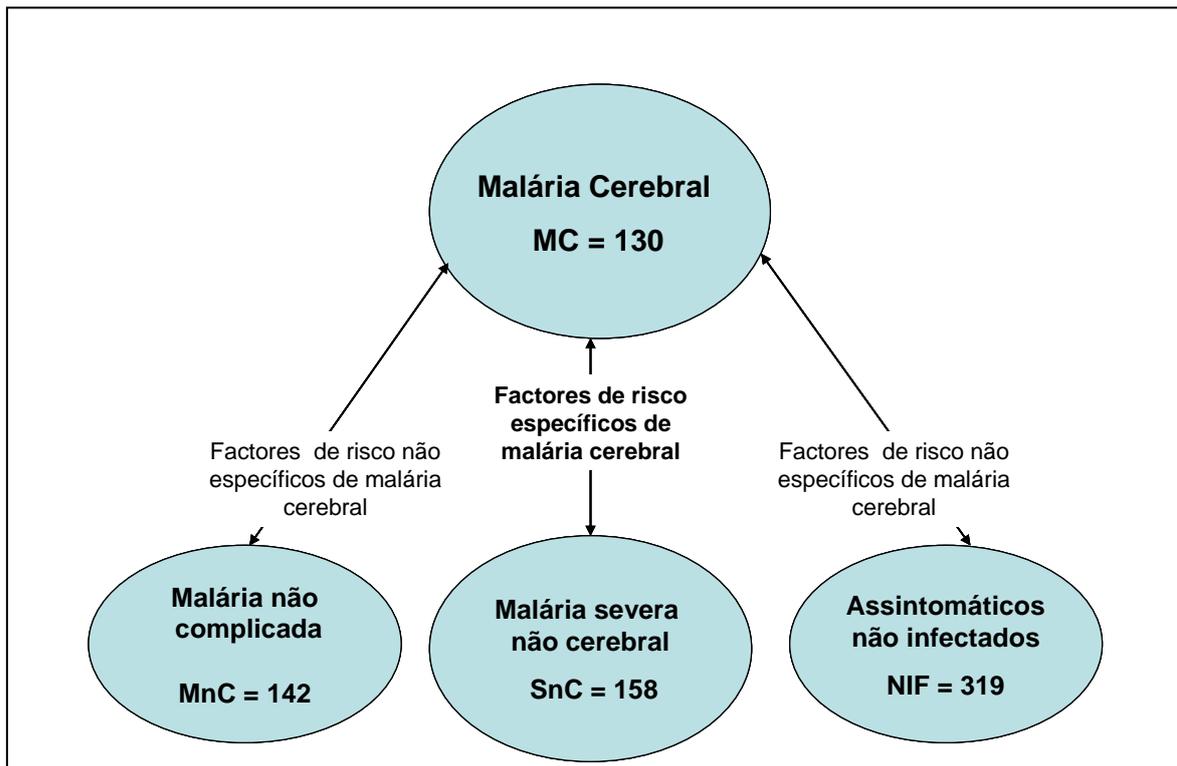


Figura 8. Representação esquemática do desenho do estudo de casos-controlos.

Este desenho do estudo permite a interpretação do papel de eventuais sinais de associação na patogénese e na evolução natural da doença:

a) Qualquer variante genética que seja detectada exclusivamente na comparação dos casos MC com os controlos SnC será classificada como um **factor específico da síndrome malária cerebral**. Nesta condição, a atribuição de especificidade à variante genética detectada, fundamenta-se no facto de tal variante exercer o seu efeito apenas no contexto da malária severa, permitindo distinguir os doentes que evoluem para a malária cerebral (MC) dos doentes com outras manifestações de malária severa que não de malária cerebral (SnC).

b) Qualquer factor que para além de ter sido detectado na comparação dos casos MC *versus* controlos SnC, também seja detectado na comparação dos casos MC com os controlos MnC e/ou NIF, será interpretado como um factor que actua em diferentes estádios da progressão da doença e será considerado como um **factor não específico de malária cerebral**.

Todavia, se os sinais de associação forem detectados apenas entre os casos MC e/ou os controlos MnC e NIF, investigar-se-ão eventuais sinais de associação, comparando os doentes com malária severa não cerebral (SnC) com os controlos MnC e NIF. Caso se detecte associação nestas comparações (SnC *versus* MnC e/ou NIF) classificar-se-ão as variantes implicadas como **factores de severidade de malária**. Pelo contrário, a inexistência de qualquer sinal de associação nesta última comparação (SnC *versus* MnC e/ou NIF) confirmará a designação de factor não específico de malária cerebral. Existe a opção de reunir num só grupo de casos de malária severa todos os doentes com malária cerebral e com malária severa não cerebral e compará-los com os controlos NIF, confirmando-se deste modo os factores genéticos de malária severa.

A selecção dos participantes decorreu no período compreendido entre Fevereiro de 2005 e Maio de 2007; a selecção dos doentes com malária predominou nos períodos de maior transmissão, de Outubro a Maio. Com excepção das crianças não infectadas, sempre que possível, colheram-se amostras biológicas das mães das crianças dos casos e dos controlos SnC e MnC. Todos os doentes foram seleccionados através do serviço de urgência do HPDB, sendo os casos MC e os controlos SnC doentes internados e os controlos MnC doentes ambulatoriais. A amostragem dos controlos NIF efectuou-se no serviço de vacinação do HPDB.

O HPDB, localizado no centro da zona urbana de Luanda, é a maior unidade de saúde de atenção pediátrica do Serviço Nacional de Saúde de Angola, concebida para a prestação de assistência de nível terciário. Contudo, o HPDB tem sido alvo de um grande afluxo de doentes com patologia diversa que carecem de níveis menos diferenciados de atenção sanitária e que dificultam a prestação exclusiva de cuidados terciários. O hospital está organizado em doze serviços de internamento, com um total de 296 leitos e um serviço de urgências que possui trinta e cinco leitos. Dos doze serviços de internamento, dois destinam-se a doentes com malária cerebral e a doentes com malária severa não cerebral. A média mensal de internamentos do HPDB é de 2265 doentes e a taxa de ocupação geral é de 97%. O serviço de urgências atende, em média, 8494 doentes por mês.

De acordo com os dados fornecidos pela Secção de Estatística do HPDB, a malária foi em 2006 a 3ª causa de internamento com 3493 casos, antecedida pelas doenças respiratórias agudas e pela anemia severa, e em 2007 a 2ª causa de internamento com 6537 casos, após a anemia severa. Nestes dois anos, excluindo os recém-nascidos, a malária foi a 4ª causa de morte, após as meningites, o tétano e as doenças diarreicas agudas, com uma taxa de letalidade de 14,1% em 2006 e de 10,9% em 2007. As figuras 9 e 10 mostram os dados de morbilidade e de mortalidade da malária cerebral no serviço de internamento de 2005 a 2007.

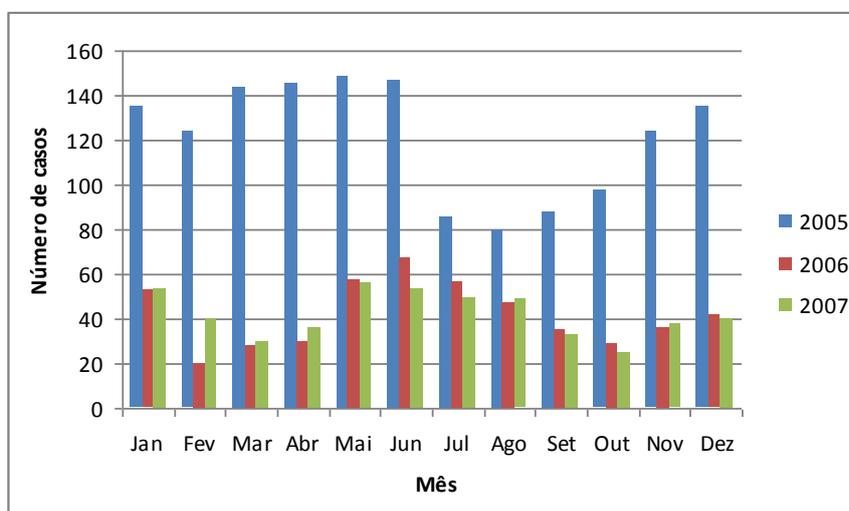


Figura 9. Internamentos por Malária Cerebral de 2005 a 2007 no HPDB.

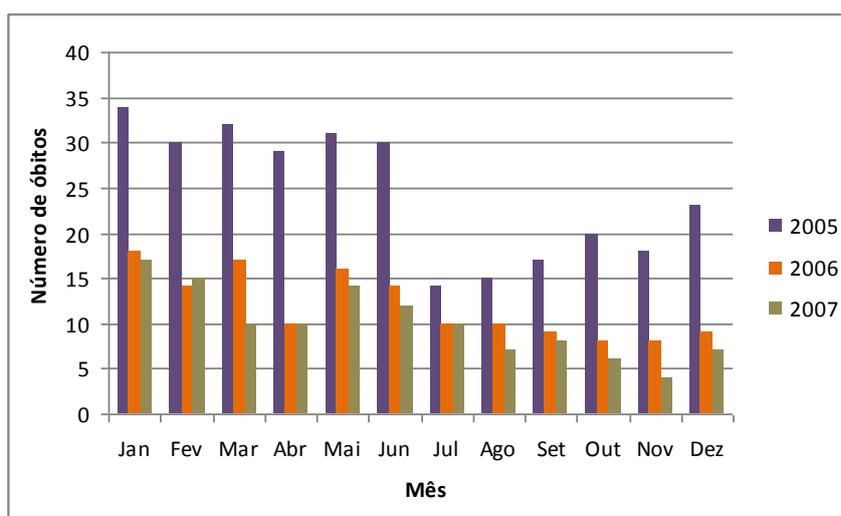


Figura 10. Óbitos causados por Malária Cerebral de 2005 a 2007 no HPDB.

O diagnóstico laboratorial de malária baseou-se na detecção de parasitemia assexuada de *P. falciparum* em gota espessa corada com Giemsa. A quantificação da parasitemia estimou-se pelo número de eritrócitos parasitados em 100 campos microscópicos (ampliação 1000 X) e a densidade parasitária foi calculada a partir deste valor [278].

A triagem dos casos de malária cerebral e dos controlos com malária (SnC e MnC) efectuou-se no serviço de urgência, durante a admissão. A inclusão no estudo, quer dos casos MC, quer dos controlos SnC, foi decidida após a realização do exame neurológico no serviço de internamento. A inclusão definitiva no estudo genético, só se efectivava após a confirmação de infecção por *P. falciparum*, determinada pela técnica de reacção em cadeia de polimerase (PCR) específica de cada espécie, realizada no ADN genómico extraído a partir do sangue periférico.

Na admissão no serviço de urgência, a todos os doentes integrantes deste estudo, efectuava-se hemograma e determinava-se a glicemia. A execução de exames complementares adicionais dependia da evolução clínica. Todos os doentes foram tratados de acordo com as orientações terapêuticas de malária vigentes no HPDB.

### **3.3 Critérios de Definição dos Fenótipos Clínicos**

#### **Malária cerebral**

O diagnóstico de malária cerebral obedeceu aos critérios de definição estrita da OMS para efeitos de investigação.[43]; valorizou-se o estado de coma não despertável, que se definia pela incapacidade de localizar os estímulos dolorosos, e excluíram-se outras causas de encefalopatia. Nos doentes em que o coma tinha sido precedido de uma crise convulsiva, para efeitos do presente estudo, a avaliação do grau de coma era valorizada uma hora após o fim da convulsão. Este procedimento justifica-se pelo bem reconhecido coma transitório pós-convulsivo.

Os casos de malária cerebral tinham de reunir todos os critérios seguintes:

a) Coma

- Pontuação inferior a três na Escala de Blantyre, para as crianças menores de sessenta meses

Ou

- Pontuação inferior a três na Escala de Glasgow, para as crianças com idade igual ou superior a sessenta meses.

b) Ausência de critérios de diagnóstico para qualquer outra causa possível de encefalopatia, incluindo a hipoglicemia (glicemia no sangue venoso inferior a 40 mg/dl)

d) Exclusão de meningite – exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) sem pleiocitose (até 8 linfócitos/mm<sup>3</sup>) nem hipoglicorráquia (doseamento da glicose no LCR superior a 50mg/dl ou correspondente a 50% do valor da glicemia, nunca inferior a 40mg/dl).

### **Malária severa não cerebral**

Este grupo inclui doentes com anemia severa da malária e/ou hiperparasitemia. A anemia severa (ASM) foi definida por hemoglobina inferior a 5 g/dl ou hematócrito inferior a 15% e a hiperparasitemia (HP) requeria um valor de parasitemia superior a 100 eritrócitos parasitados por cada campo microscópico (ampliação 1000X).

A presença de outro diagnóstico ou de qualquer perturbação neurológica instalada durante a evolução da doença, incluindo convulsões, excluiu a criança do estudo.

## Malária não complicada

Os doentes deste grupo não tinham qualquer manifestação sugestiva de complicação da malária, bem como qualquer outra patologia susceptível de explicar uma síndrome febril.

## Assintomáticos não infectados

Os controlos deste grupo não tinham qualquer sintoma sugestivo de doença e a PCR para *Plasmodium*, realizada em ADN genómico extraído a partir de mancha de sangue de papel de filtro, era negativa.

A Tabela 2 mostra, resumidamente, os critérios de definição dos distintos grupos de casos e de controlos com malária.

Tabela 2. Critérios de definição dos fenótipos de malária.

Fenótipo Critério	Malária severa não cerebral			
	Malária cerebral	HP	ASM	MnC
Nº de eritrócitos parasitados/campo	≥1	>100	≥1 ou >100	<100
Anemia severa (Hb <5g/dl ou hematócrito <15%)	Presente ou Ausente	Presente ou Ausente	Presente	Ausente
Hipoglicemia (glicemia <40mg/dl)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Estado de consciência	Coma	Ausente	Ausente	Ausente
Estudo do LCR (Células e glicose)	≤8 Linfócitos/mm <sup>3</sup> Glicose > 50mg/dl	Não estudado	Não estudado	Não estudado

Abreviaturas: HP, hiperparasitemia; ASM, anemia severa; MnC, malária não complicada; Hb, hemoglobina; LCR, líquido cefalorraquidiano.

### 3.4 Cálculo do Poder Estatístico

O cálculo do poder estatístico foi efectuado com o programa *Genetic Power Calculator* (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>). Para efeitos do estudo de casos-controlos, o poder estatístico era de 83,4%, com um erro de tipo I de 0,05, estudando 118 casos com uma proporção de casos *versus* controlos de 1,2, considerando uma frequência de 0,15 para o alelo de alto risco A, um risco relativo genotípico Aa de 1,8 no modelo dominante, o valor de 0,9 para o D-prime e uma frequência alélica do alelo B de 0,15. Para um erro de tipo I de 0,01, o poder estatístico reduzia consideravelmente para 63,9% e seriam necessários 176 casos.

Para o estudo da transmissão alélica com 200 pares mãe-criança, o poder estatístico era de 80,1%, com um erro de tipo I de 0,05, considerando uma frequência de 0,15 para o alelo de alto risco A. Para um erro de tipo I de 0,01, o poder estatístico reduzia consideravelmente para 59,0% e seriam necessários 297 pares.

### 3.5 Selecção de Genes Candidatos e de Polimorfismos

Foram seleccionados SNPs de genes considerados candidatos, por já terem sido publicados estudos sobre a sua associação à malária cerebral ou à malária severa em humanos, bem como SNPs de genes relevantes para a malária cerebral em modelos animais (malária murina).

A identificação dos SNPs foi realizada a partir de pesquisas de literatura e de bases de dados (dbSNP 126 e Ensembl release 45), tendo em consideração a informação sobre frequências alélicas da população Yoruba (África subsaariana, grupo étnico nigeriano), disponibilizada pelo projecto HapMap. A selecção dos SNPs baseou-se na prioridade, sempre que possível, aos das regiões codificantes, usando como alternativa os das regiões intrónicas e os das regiões reguladoras dos genes. Outro critério prioritário era que o SNP tivesse sido validado por frequência, optando-se pelos polimorfismos que tinham o alelo de menor frequência superior a 5% e os pertencentes a distintos blocos de LD (*haplotype tagging SNPs – htSNP*).

A genotipagem foi realizada em 2 etapas e os resultados preliminares da 1ª genotipagem determinaram que a segunda etapa se focalizasse nos genes que mostravam associação à malária cerebral. Esta metodologia de incremento progressivo do número de SNPs não foi seguida para os genes em que já tinham sido publicados SNPs com associações descritas à malária cerebral e/ou à malária severa, em que se procurou analisar todos os SNPs relevantes na primeira etapa.

Na 1ª genotipagem foram estudados SNPs dos seguintes genes: *TGFB1* (*Transforming growth factor, beta 1*), *TGFB2* (*Transforming growth factor, beta 2*), *TNF* (*Tumor necrosis factor*), *CD36* (*Thrombospondin receptor*), *TLR4* (*Toll-like receptor 4*), *MBL2* [*Mannose-binding lectin (protein C) 2*], *HBB* (*Hemoglobin, beta*), *NOS2* (*Nitric oxide synthase 2, inducible*), *ICAM 1* (*Intracellular adhesion molecule 1, CD54*), *ICAM 4* (*Intracellular adhesion molecule 4*) e *ICAM 5* (*Intracellular adhesion molecule 5*) e *HMOX1* [*Heme oxygenase (decycling) 1*]. Na segunda genotipagem foram ainda genotipados SNPs dos seguintes genes: *CR1* (*Complement receptor 1*), *PECAM1* (*Platelet-endothelial cell-adhesion molecule, CD31*), *HP* (*Haptoglobin*), *IFNAR1* [*Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1*] e *IL10RB* (*interleukin 10 receptor, beta*).

No total (1ª e 2ª genotipagens) foram estudados 126 SNPs de 17 genes candidatos. Na tabela Suplementar A (Apêndices) estão discriminados os SNPs estudados nas 2 genotipagens.

### 3.6 Colheita e Processamento das Amostras

Nos doentes com malária (casos e controlos) foi efectuada colheita de sangue venoso em tubo com citrato de sódio para preparação de células (BD Vacutainer® CPT™). Nos controlos NIF e sempre que a colheita de sangue se mostrasse difícil, optava-se pela colheita de sangue em manchas de papel de filtro, num diâmetro entre 1 a 1,5 cm (Watman FTA classic cards®), com uma capacidade máxima de colheita de 500 µl de sangue total. Com o objectivo de assegurar mais uma fonte de extracção de ADN genómico, procedia-se também à colheita de esfregaços da mucosa bucal. Estes foram conservados a +4º em

tubos de 1ml com etanol absoluto. Às mães dos casos MC e dos controlos doentes (SnC e MnC) colheu-se sangue venoso em tubo CPT™. Não foram feitas colheitas de material biológico às mães dos controlos NIF.

Após a separação, de acordo com o protocolo definido (Apêndice 2), o plasma e as células foram conservados a -80° até ao momento da extracção do ADN.

### **3.7 Detecção de ADN de *Plasmodium***

Para a detecção de *Plasmodium* spp., utilizou-se uma técnica adaptada de *nested* PCR [279]. A 1ª reacção destinava-se à amplificação da sequência do género *Plasmodium* e a 2ª reacção era específica de cada espécie. Após a 2ª amplificação, o produto era sujeito a electroforese em gel de agarose a 2%, com coloração de brometo de etídio (5 µl para cada 100 ml de gel) numa voltagem constante de 130 V. A positividade da reacção era determinada pela detecção do produto da 2ª amplificação (espécie-específico), de acordo com o seu peso molecular, através de iluminação com raios ultra-violeta.

Cada uma das reacções efectuou-se num volume de 20 µl consistindo em 2 µl 10 X de tampão (500 mM KCL e 100 Mm Tris pH 8,3), 1,6 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 0,5 µl de dNTPs a 5mM, 1 µl de *primer forward* a 2,5 µM, 1 µl de *primer reverse* a 2,5 µM, 0,02 U/µl de HotStarTaq a 5 U/µl, 1 µl de amostra de ADN para a 1ª reacção ou 1 µl do produto amplificado da 1ª reacção e 14,82 µl de água bi-distilada. A 2ª reacção era realizada em 4 tubos separados, contendo cada um o par de *primers* específico. Os *primers* de cada reacção e as condições dos programas de cada amplificação constam do Apêndice 3.

### **3.8 Extracção e Quantificação do ADN Genómico**

O ADN genómico foi extraído a partir dos leucócitos, dos eritrócitos e da mancha de sangue de papel de filtro, utilizando um sistema automático de isolamento de ácidos nucleicos, baseado em tecnologia de esferas magnéticas (Chemagen®).

A extracção de ADN genómico dos esfregaços bucais também se processou automaticamente com o equipamento e reagentes de Qiagen BioRobot® EZ1 workstation.

Todo o processo de extracção de ADN era seguido de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes.

As preparações de ADN genómico foram quantificadas usando o reagente PicoGreen (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante e foram diluídas em tris-EDTA para obter uma concentração de 5-10ng/μl.

### 3.9 Genotipagem

A detecção dos SNPs realizou-se com um sistema de espectrometria de massa que analisa os produtos da reacção alelo-específica obtidos através de PCR multiplex e de uma reacção de extensão de base única (Sequenom iPLEX®), numa plataforma SEQUENOM © sistema MassARRAY™. Este sistema utiliza o espectrómetro de massa *time of flight* (TOF) com uma técnica de ionização por laser, com protecção conferida por uma matriz que impede a destruição do produto pelos raios laser (MALDI – TOF - *Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight*) [280].

O desenho dos testes multiplex baseia-se nas sequências específicas de cada SNP fornecidas com cinquenta bases, quer a montante, quer a jusante do local polimórfico de interesse. Efectua-se uma reacção de PCR multiplex que, em circunstâncias óptimas, pode genotipar quarenta SNPs simultaneamente em cada reacção de PCR. Os *primers* para PCR e para a reacção de extensão são gerados tendo em conta que o peso molecular do produto amplificado obtido para cada variante de cada SNP na reacção multiplex, deve ser único e distinguível de todos os outros produtos na escala de massa do sistema MALDI -TOF. O método consiste numa reacção inicial PCR *locus*-específica, seguida de uma reacção de extensão de base única. O *primer* para a extensão de base única é concebido para hibridizar imediatamente a montante do local polimórfico de interesse. Os produtos resultantes da extensão dos *primers* são analisados usando o sistema

de espectrometria MALDI -TOF e os genótipos são diferenciados com base na massa de cada alelo.

Em resumo, a PCR multiplex foi realizada em reacções de 5 µl em placas de 384 poços com 5 ng de ADN genómico, 0,5 U de HotStar Taq polimerase (Qiagen), 100 nM de *primers*, 1,25 X de HotStar Taq buffer, 1,625 mM de MgCl<sub>2</sub> e 500 µM de dNTPs. Após a activação das enzimas a 94 ° C durante 15 minutos, o ADN foi amplificado com 45 ciclos de 94 ° C X 20 segundos, 56 ° C X 30 segundos, 72 ° C X 1 minuto, seguido de um período de 3 minutos de extensão a 72 ° C. Os dNTPs que não foram incorporados foram removidos com a enzima SAP (0,3 U, Sequenom®). Os produtos de PCR foram usados como moldes para a reacção de extensão de base única realizada através da adição de *primers* de extensão de base única (SBE - Single Base Extension), nas concentrações de 0,625 M (*primers* com baixo peso molecular) a 1,25 M (alto peso molecular) utilizando enzima iPLEX e tampões em reacções de 9 µl.

O controlo de qualidade da genotipagem exigiu para cada SNP uma taxa mínima de sucesso da genotipagem de 90%, a correcta genotipagem de amostras HapMap, sempre que o genótipo do SNP fosse conhecido, e frequências genóticas em equilíbrio ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Hardy-Weinberg (HWE).

### **3.10 Expressão génica por PCR em Tempo Real**

A quantificação da expressão do gene *HMOX1* foi realizada em 43 doentes com malária cerebral. Para a extracção de ARN colheu-se uma amostra de 500 µl de sangue venoso que foi imediatamente conservada numa solução estabilizadora do ARN (RNA later®) e preservada a -80° C.

O ARN total foi extraído com o kit RiboPure-Blood (Ambion®), seguindo o protocolo do fabricante. Um micrograma do ARN total foi convertido em ADNc (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche), usando *random hexamer primers*. A quantificação da expressão génica foi obtida através do uso de TaqMan® Gene Expression Assay Hs00157965\_m1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reacções de quantificação da expressão génica foram efectuadas de acordo com as instruções do fabricante num sistema ABI Prism 7900HT. A

quantificação relativa do ARNm específico para o gene *HMOX1* foi obtida após normalização para a expressão de ARNm do gene *Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1)* medida simultaneamente na mesma reacção de PCR.

### 3.11 Doseamento Plasmático do Heme

A medição dos níveis plasmáticos do heme livre efectuou-se conforme foi descrito anteriormente [259]. Resumidamente, as amostras de plasma foram filtradas por uma coluna Microcon YM-3 (Millipore®) com uma centrifugação a 21,000g durante 90 minutos, a 14 ° C, para a remoção de proteínas com peso molecular de 3kDa. Seguidamente, o heme livre foi quantificado nas amostras usando um método cromogéneo de acordo com as instruções do fabricante (QuantiChrom™ Heme Assay Kit, Bioassay Systems).

### 3.12 Análise Estatística

Toda a análise estatística não genética, designadamente a caracterização da amostra e todas as associações com variáveis de interesse clínico, foi realizada com o programa *SPSS* versão 15.0, considerando-se como significativo um valor de  $P < 0,05$ . O teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado no estudo da associação entre variáveis qualitativas e a comparação de variáveis contínuas foi realizada através de testes não paramétricos do *U* de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis em variáveis cuja distribuição se afastava da Normal.

A análise estatística de associação genética efectuou-se conforme as seguintes etapas:

- 1) Associação casos-controlos para cada SNP (testes de associação alélica e genotípica);
- 2) Construção de mapas de *linkage disequilibrium* (LD) apenas para os genes que evidenciaram pelo menos dois SNPs associados à malária cerebral;

- 3) Reconstrução de haplótipos e associação haplotípica casos-controlos;
- 4) Estudos de transmissão alélica.

Foram ainda efectuadas análises de interacção génica e de traços quantitativos, designadamente de expressão génica de *HMOX1* e de valores de heme livre no plasma.

### **3.12.1 Associação casos-controlos para cada SNP**

Uma vez que a metodologia para o estudo de associação de casos-controlos foi seguida com o objectivo inicial de detecção preliminar de polimorfismos associadas à malária cerebral em cada gene candidato, com vista a ulterior análise haplotípica tendo em conta o LD, não se efectuou nenhum tipo de correcção para testes múltiplos na análise individual de SNPs.

A análise de associação dos SNPs à malária cerebral e/ou à malária severa efectuou-se segundo os modelos de regressão logística implementados no pacote *SNPassoc* para o programa *R* (versão 2.7.0). Os resultados foram obtidos tendo em conta três modelos genéticos diferentes: dominante, recessivo e aditivo [281, 282]. Um nível de significância de 5% para a razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*) foi considerado como evidência sugestiva de associação, conduzindo à selecção dos genes para a análise ulterior.

### **3.12.2 Construção de mapas de desequilíbrio de ligação**

Para os genes que evidenciaram pelo menos dois SNPs com valores de *P* sugestivos de associação específica à malária cerebral, ao comparar os genótipos dos casos de malária cerebral com os dos controlos de SnC, utilizou-se a análise de *linkage disequilibrium* procedendo à construção de mapas de LD. Deste modo, pretendeu-se avaliar se a posição relativa dos SNPs associados à malária cerebral poderia exercer algum efeito conjunto na associação detectada na análise individual.

O LD entre os SNPs foi medido usando o coeficiente de correlação entre pares de *loci* ( $r^2$ ), calculado a partir do valor de  $D$ , usando a seguinte equação, sendo  $D = p_1p_2 - p_1 \times p_2$ :

$$r^2 = \frac{D^2}{p_1p_2q_1q_2}$$

Sendo  $p_1$  e  $p_2$  as frequências do alelo 1 e  $q_1$  e  $q_2$  as frequências do alelo 2.

Os mapas de LD foram visualizados recorrendo ao pacote *snp.plotter R package* [283] e à função *HAPLOVIEW*. Nos mapas de LD foram identificados os blocos de LD nas regiões dos genes estudados.

### 3.12.3 Reconstrução de haplótipos e análise casos-controlos

Para cada gene, onde foram encontradas regiões de LD contendo SNPs associados à malária cerebral, analisou-se a contribuição da estrutura haplotípica para a associação genética. A análise de haplótipos foi realizada para verificar se as associações dos SNPs individuais correspondiam a efeitos genéticos independentes ou se, pelo contrário, correspondiam a um único efeito genético conferido por determinado(s) haplótipo(s).

A fase dos genótipos e a frequência dos haplótipos foram estimadas utilizando-se os SNPs integrantes do bloco de LD, recorrendo ao método *Gene counting* [284] implementado no pacote *GAP* do programa *R* [285]. A análise de associação efectuou-se apenas com os haplótipos que tinham frequência superior a 5%, que é o valor mínimo estabelecido por convenção para definir um haplótipo comum, por oposição a haplótipos raros.

A associação entre os haplótipos e a malária também foi avaliada com a análise de regressão logística, usando o mesmo pacote [281] e um nível de significância de 5% para a razão de verossimilhança. O método fornece vários testes globais de associação, tais como a *global score statistic* (GSS) e a  $\max(Z^2_k)$

*statistic* (MaxST) [286], bem como testes que permitem avaliar o significado estatístico de haplótipos .

Os scores específicos para os haplótipos individuais ( $z_k^2$  ou *Hap-score*) permitem avaliar, para cada um deles, a existência de uma associação estatisticamente significativa à resistência ou susceptibilidade à doença, quando o valor da GSS indica significância estatística global. No entanto, quando existem evidências de uma forte associação de apenas poucos haplótipos à doença, o valor global de MaxST torna-se mais adequado para avaliar essa mesma associação global [7]. O efeito de cada haplótipo depende do valor do respectivo *Hap-score*: um *score* positivo significa que o haplótipo é mais frequente nos casos do que nos controlos e se a diferença for significativa o haplótipo confere susceptibilidade; um *score* negativo terá o significado inverso. Para as GSS e MaxST, bem como para cada haplótipo, foram calculados valores de *P* empíricos através de testes de permutação, com o método de Monte-Carlo produzindo 1000 simulações para cada conjunto de dados [286].

### **3.12.4 Testes de desequilíbrio de transmissão**

O estudo familiar restringiu-se à análise da transmissão dos genótipos das mães para os respectivos filhos, uma vez que a maioria dos doentes era acompanhada pela mãe e não se conseguia assegurar a colheita das amostras biológicas dos pais. Recorreu-se ao programa *TRANSMIT* (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk>) que possibilita a realização do TDT quando parte dos genótipos são desconhecidos por falta de progenitores e a análise com haplótipos mesmo que a fase seja desconhecida [287].

## **3.13 ESTUDO DE INTERACÇÃO GÉNICA**

Uma vez que foram estudados vários genes, efectuou-se a análise de interacção entre pares de SNPs de genes diferentes. Tendo em conta o objectivo específico desta tese, esta análise restringiu-se aos SNPs com associação à malária cerebral, exclusivamente ao comparar os casos de malária cerebral (MC)

com os controlos com malária severa não cerebral (SnC), excepto para o dbSNP rs334.

A análise foi efectuada segundo o modelo de regressão logística, utilizando o pacote *SNPassoc* implementado no programa *R* (versão 2.7.0); caso-controlo era a variável de resposta (dicotómica) e as variáveis independentes eram os genótipos dos SNPs testados. Um nível de significância de 5% para a razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*) foi considerado como evidência sugestiva de interacção *génica* [281, 282].

### **3.14 ANÁLISE DE TRAÇOS QUANTITATIVOS**

A análise de QTL dos níveis de expressão *génica* e do heme livre no plasma foi efectuada com o programa *Plink* (versão 1.06) que calcula os níveis de significância, quer usando o modelo assintótico, quer o modelo empírico [288] <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>. A análise de QTL considerou o modelo linear (efeito aditivo) e os testes de permutações foram efectuados usando o método de Monte-Carlo para gerar 1000 simulações para cada conjunto de dados.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste estudo, procedeu-se à análise de associação genética de SNPs de 17 genes com fenótipos de malária severa em crianças angolanas, com o intuito principal de distinguir factores genéticos que estejam especificamente associados à malária cerebral, de factores genéticos que embora estejam associados à severidade da malária não sejam específicos de malária cerebral. O desenho do estudo compara um grupo de 130 casos de crianças com malária cerebral (MC) com três grupos controlos de crianças com: i) outras formas de malária severa (SnC = 158), ii) com malária não complicada (MnC = 142) e iii) crianças não infectadas (NIF = 319).

### 4.1 Caracterização da Amostra

Todo o recrutamento dos doentes participantes neste estudo foi efectuado a partir do Serviço de Urgências do Hospital Pediátrico David Bernardino (HPDB). Todos os controlos com malária não complicada (MnC) eram doentes ambulatoriais, enquanto que os casos de malária cerebral (MC) e os controlos com malária severa não cerebral (SnC) eram doentes internados. Os controlos não infectados (NIF) foram todos recrutados a partir do Serviço de Vacinação do HPDB.

### Apresentação clínica

Verificou-se que mais do que 50% dos doentes com o fenótipo MC manifestavam também anemia severa (ASM) e/ou hiperparasitemia (HP). Deste modo, foram identificados os seguintes sub-fenótipos: malária cerebral isolada (MCi), malária cerebral associada a anemia severa (MC/ASM), malária cerebral associada a hiperparasitemia (MC/HP) e malária cerebral associada a anemia severa e hiperparasitemia (MC/ASM/HP) (Tabela 3).

**Tabela 3. Distribuição dos doentes com malária cerebral nos diferentes sub-fenótipos.**

Sub-fenótipos	Frequência (%)
MCi	62 (47,7)
MC/HP	31 (23,8)
MC/ASM	22 (16,9)
MC/ASM/HP	15 (11,5)
Total	130 (100)

Abreviaturas: MCi, malária cerebral isolada; MC/HP, malária cerebral e hiperparasitemia; MC/ASM, malária cerebral e anemia severa; MC/ASM/HP, malária cerebral associada a anemia severa e hiperparasitemia.

**Tabela 4. Distribuição dos doentes com malária severa não cerebral nos diferentes sub-fenótipos.**

Sub-fenótipo	Frequência (%)
HP	77 (48,7)
ASM	26 (16,5)
HP/ASM	55 (34,8)
Total	158 (100)

Abreviaturas: HP, hiperparasitemia; ASM, anemia severa; HP/ASM, hiperparasitemia e anemia severa.

Do mesmo modo, embora em menor número, alguns controlos com malária severa não cerebral (SnC) manifestavam concomitantemente anemia severa e/ou hiperparasitemia, identificando-se os seguintes sub-fenótipos: anemia severa (ASM), hiperparasitemia (HP) e anemia severa associada a hiperparasitemia (ASM/HP) (Tabela 4).

A coexistência de várias complicações corrobora a frequente realidade de apresentação clínica das síndromas de malária severa. Os valores absolutos e as percentagens de doentes com sobreposição destas complicações, no quadro dos 288 doentes com malária severa, estão ilustrados com o diagrama de Venn na Figura 11.

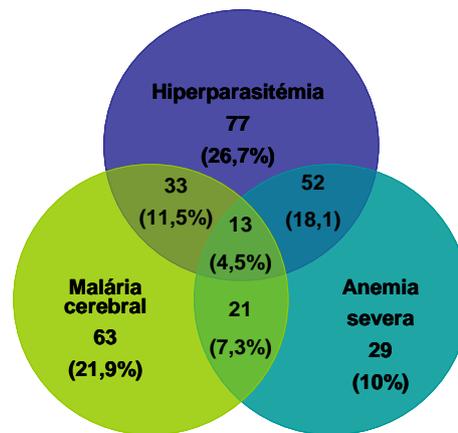


Figura 11. **Sobreposição das complicações de malária severa nos doentes com malária cerebral e com malária severa não cerebral.** Os três círculos (100%) referem-se a todos os doentes com malária severa.

## Sexo e grupos étnicos

A proporção entre os sexos feminino e masculino nos casos e em todos os grupos controlo era 1:1,5. O teste do  $\chi^2$  não evidenciou associação entre o sexo e o fenótipo de malária ( $P = 0,34$ ), bem como entre o fenótipo de malária e o grupo étnico ( $P = 0,74$ ). Contudo, o grupo étnico Kimbundu, que predomina em Luanda, foi o mais representado no nosso estudo (50,7%), enquanto que o grupo étnico Umbundu foi o segundo mais representado (13,7 %).

## Correlação entre a idade e variáveis clínicas

### Fenótipos e sub-fenótipos

A média das idades do grupo de casos MC foi ligeiramente superior às dos grupos controlos SnC e MnC, sendo de 54,2, 45,9 e 50,3 meses, respectivamente. No grupo controlo NIF a média das idades foi de 60,9 meses. Não se verificou associação entre a idade em meses e o fenótipo de malária (teste do  $\chi^2$   $P = 0,16$ ). As figuras 12 e 13 mostram a distribuição das idades, em

meses, nos diferentes fenótipos e em todos os doentes com malária, respectivamente.

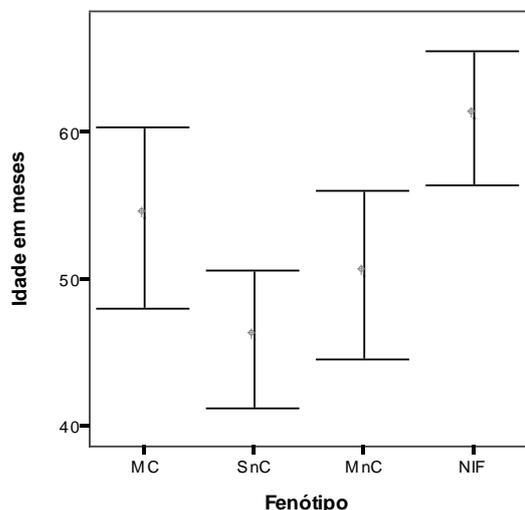


Figura 12. **Distribuição das idades nos diferentes grupos (casos e controlos). As idades estão representadas em meses.** As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% da média das idades em cada grupo. Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

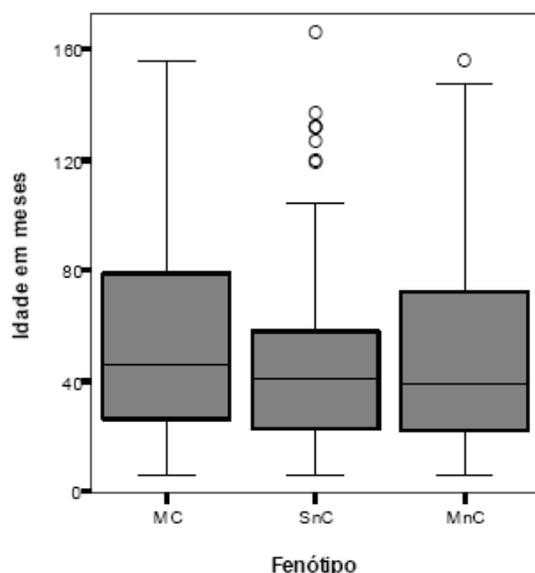


Figura 13. **Distribuição das idades nos distintos fenótipos de malária.** As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às medianas; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e o limite superior o quartil 75%; os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados, excluindo os outliers que são representados por círculos. Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada.

A análise da relação entre os grupos etários e os fenótipos de malária, quer com os de malária severa, malária cerebral e malária severa não cerebral, quer com o fenótipo malária não complicada, revela que a maioria dos doentes tem idade inferior a cinco anos, afectando principalmente as crianças do grupo etário dos 13 aos 59 meses (Figuras 14, 15 e 16).

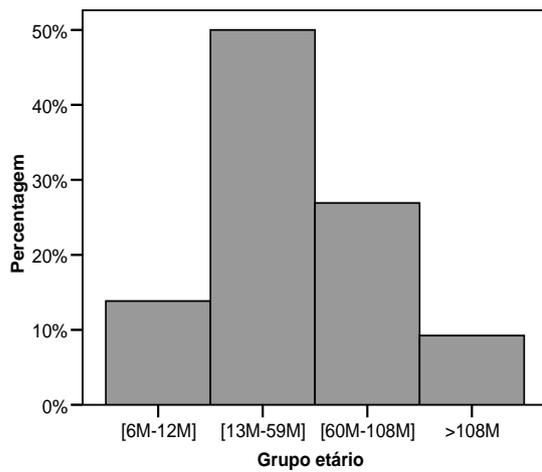


Figura 14. Distribuição dos doentes com malária cerebral nos distintos grupos etários em meses.

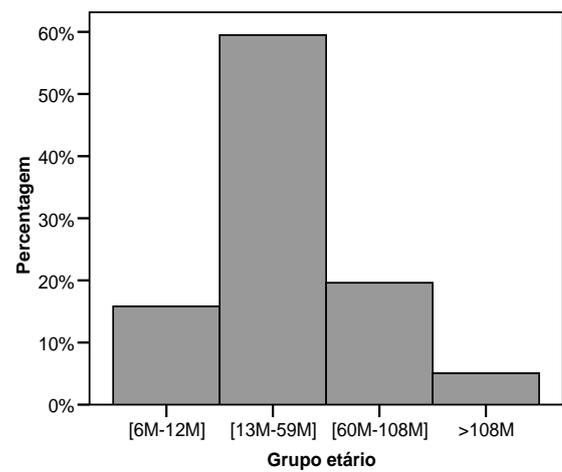


Figura 15. Distribuição dos doentes com malária severa não cerebral nos distintos grupos etários em meses.

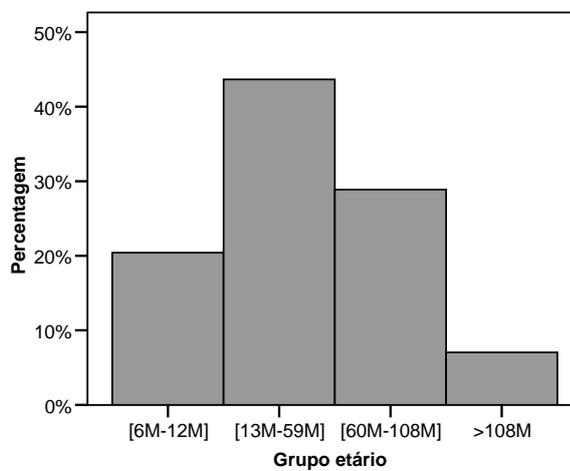


Figura 16. Distribuição dos doentes com malária não complicada nos distintos grupos etários em meses.

O teste do  $\chi^2$  evidenciou um sinal marginal de associação entre os sub-fenótipos de malária cerebral e os grupos etários ( $P = 0,073$ ). Contudo, é de realçar a maior frequência de doentes sem complicações associadas, designadamente anemia severa e hiperparasitemia, nos grupos etários extremos (Tabela 5 e Figura 17).

Tabela 5. **Distribuição dos sub-fenótipos de malária cerebral nos diferentes grupos etários.**

Sub-fenótipo	Grupo etário			
	[6-12]	[13-59]	[60-108]	>108
MCi	77,8%	40,0%	40,0%	66,7%
MC/HP	0%	29,2%	28,6%	16,7%
MC/ASM	5,6%	16,9%	22,9%	16,7%
MC/ASM/HP	16,7%	13,8%	8,6%	0%
Total	100%	100%	100%	100%

**Abreviaturas:** MCi, malária cerebral isolada; MC/HP, malária cerebral e hiperparasitemia; MC/ASM, malária cerebral e anemia severa; MC/ASM/HP, malária cerebral associada a anemia severa e hiperparasitemia.

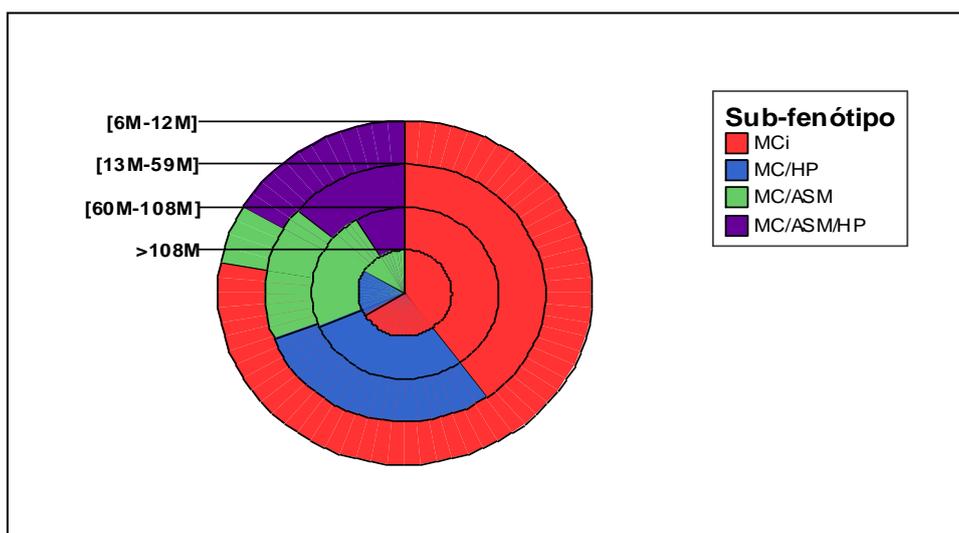


Figura 17. **Distribuição dos diferentes sub-fenótipos de malária cerebral nos grupos etários.** Cada fatia corresponde a um sub-fenótipo de malária cerebral e cada área circular a um grupo etário.

Ao analisar a relação entre os sub-fenótipos hiperparasitemia e/ou anemia severa e os grupos etários, no grupo controlo de doentes com malária severa não cerebral (Tabela 6), não se detectou associação ( $P = 0,31$ ).

Tabela 6. Distribuição dos grupos etários nos diferentes sub-fenótipos de malária severa não cerebral.

Sub-fenótipos	Grupo etário (meses)			
	[6-12]	[13-59]	[60-108]	>108
HP	28,0%	54,3%	45,2%	62,5%
ASM	28,0%	12,8%	19,4%	12,5%
HP/ASM	44,0%	33,0%	35,5%	25%
Total	100%	100%	100%	100%

**Abreviaturas:** HP, hiperparasitemia; ASM, anemia severa; HP/ASM, hiperparasitemia e anemia severa.

A evidência de que a malária severa é mais comum nos menores de cinco anos está em perfeita concordância com o que está descrito nas áreas de malária estável, como é o caso de Luanda, apesar dos limites que foram estabelecidos para a amostragem. Por outro lado, a menor frequência de complicações associadas à malária cerebral nos dois extremos das idades, parece reflectir, por um lado, o papel protector da imunidade materna nos menores de 12 meses e, por outro lado, a imunidade adquirida com a idade nos maiores de 9 anos (> 108 meses) [16, 289, 290].

### Anemia severa

Agrupando os doentes com malária cerebral e os doentes com malária severa não cerebral, verificou-se uma significativa associação entre o grupo etário e a anemia severa com o teste do *U* de Mann-Whitney ( $P = 0,002$ ). Constatou-se que no grupo etário dos 6 aos 18 meses 55% das crianças tiveram anemia e no grupo etário > 95 meses a maioria (82,1%) não teve anemia, independentemente

de ter ou não malária cerebral. O facto da anemia severa da malária ser mais frequente nas crianças mais novas é sobreponível ao habitualmente descrito em áreas de endemicidade estável, conforme foi descrito num estudo que relaciona a morbidade causada pela malária severa com a intensidade de transmissão do *P. falciparum* em crianças da Gâmbia e do Quênia [291].

## Parasitemia

A figura 18 mostra a distribuição dos valores das medianas da parasitemia nos distintos grupos etários em todos os doentes com malária (MC, SnC e MnC), notando-se um aumento dos 6 meses até aos 59 meses, com uma redução ulterior. A comparação múltipla dos valores de parasitemia nos distintos grupos etários, através do teste de Kruskal-Wallis, revelou que existem diferenças significativas ( $P = 0,005$ ). Este tipo de distribuição dos grupos etários em relação aos valores de parasitemia parece sobrepor-se à distribuição dos grupos etários em todos os fenótipos de malária (Figuras 14, 15 e 16), o que pode reproduzir a ideia da aquisição de imunidade com a idade.

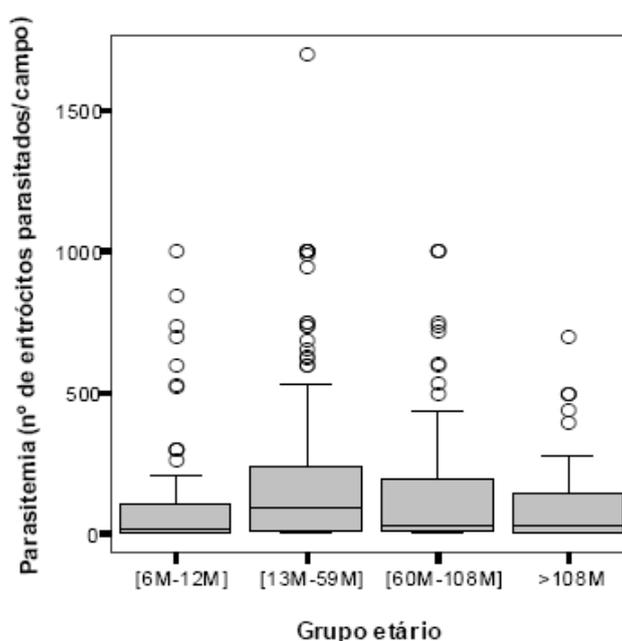


Figura 18. **Distribuição da parasitemia nos diferentes grupos etários em todos os doentes com malária.** As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às medianas; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e o limite superior o quartil 75%; os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados, excluindo os outliers que são representados por círculos.

## Convulsões

Setenta e seis por cento das crianças com malária cerebral tiveram convulsões antes do internamento. Com o teste do  $U$  de Mann-Whitney, analisando todos os doentes com malária cerebral como duas amostras independentes (ter ou não ter convulsões), verificou-se associação entre a idade em meses e a presença ou não de convulsões ( $P = 0,009$ ). Tal como mostra a Figura 19, a média das idades das crianças com convulsões era inferior à das crianças sem convulsões (41 meses *versus* 64 meses).

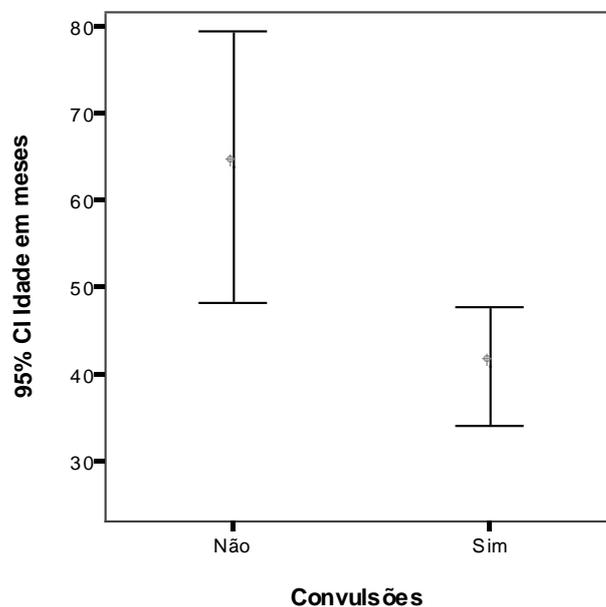


Figura 19. **Distribuição das idades nos doentes com malária cerebral e convulsões.** As idades estão representadas em meses. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% da média das idades em cada grupo.

A elevada frequência de convulsões nos casos de malária cerebral não é surpreendente, porquanto tem sido unânime a constatação de que esta manifestação constitui habitualmente o motivo mais importante para procurar assistência médica de urgência [20, 76, 77]. As convulsões que ocorrem no contexto da malária não complicada e que são interpretadas como convulsões febris observam-se sobretudo nas crianças com idade inferior a 36 meses [292].

## **Mortalidade**

A taxa de fatalidade em todos os doentes com malária severa (MC e SnC) foi de 13%, constatando-se quase uma duplicação do risco de óbito nos indivíduos com o fenótipo malária cerebral,  $P = 3 \times 10^{-3}$ , odds-ratio (OR) = 1,89 [2,33-1,54]. Apesar do viés de selecção, por se terem excluído do grupo de casos de MC os doentes com hipoglicemia e por não ter sido possível identificar os doentes com acidose metabólica, estes resultados ilustram a importante contribuição da malária cerebral na mortalidade da malária severa, no presente estudo.

## 4.2 Associação Genética

A metodologia utilizada nesta tese para identificar variantes genéticas que controlam formas específicas de apresentação clínica de malária severa, baseou-se na comparação das frequências alélicas e genotípicas de doentes com malária cerebral com as de doentes que tendo malária severa não tinham manifestações clínicas de malária cerebral. Deste modo, com a metodologia de análise seguida, dos dezoito genes estudados apenas o *TGFB2* (*Transforming growth factor, beta 2*), evidenciou variantes associadas à malária cerebral exclusivamente ao comparar os casos de malária cerebral (MC) com os controlos com malária severa não cerebral (SnC). De acordo com a interpretação previamente definida, estas variantes que foram unicamente detectadas no estudo de casos-controlos entre MC/SnC são **específicas da síndrome de malária cerebral**. A sua especificidade decorre do facto de elas exercerem o seu efeito apenas no contexto da malária severa, distinguindo os casos de malária cerebral dos controlos com malária severa não cerebral.

Na análise do gene *HMOX1* (*Heme oxygenase-1*) também se detectaram variantes específicas da síndrome malária cerebral. Contudo, algumas variantes do gene *HMOX1* mostraram igualmente sinais de associação ao comparar os casos MC com os controlos com malária não complicada (MnC) e com os controlos não infectados (NIF). Estas variantes são **não específicas da síndrome de malária cerebral**, porquanto embora estejam associadas à malária cerebral, não permitem distinguir os doentes com malária severa (MC de SnC). Realça-se ainda que algumas destas variantes, inicialmente julgadas como inespecíficas da síndrome malária cerebral, na verdade são **factores de risco de malária severa**, porquanto também revelaram sinais de associação ao comparar os doentes com malária severa não cerebral (SnC) com os controlos MnC e/ou NIF.

O gene *CD36* (*Thrombospondin receptor*) evidenciou variantes inespecíficas da síndrome malária cerebral, porquanto mostraram sinais de

associação em todas as comparações entre os casos MC e os controlos SnC, MnC e NIF.

O gene *NOS2* (*Nitric oxide synthase 2, inducible*) evidenciou não só variantes inespecíficas da síndrome malária cerebral, porquanto mostraram sinais de associação em todas as comparações entre os casos MC e os controlos SnC, MnC e NIF, mas também variantes de malária severa (SnC *versus* MnC e/ou NIF).

O alelo *HbS* do gene *HBB* (*Hemoglobin, beta*), não permite distinguir os doentes com malária severa e evidenciou associação quer à malária severa (MC/NIF e SnC/NIF) quer à malária não complicada, ao comparar doentes MnC com os controlos NIF (MnC/NIF).

Os polimorfismos dos genes *IFNAR1* [*Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1*], *HP* (*Haptoglobin*) e *PECAM 1* (*Platelet-endothelial cell-adhesion molecule, CD31*) que foram estudados apenas com o intuito de replicar associações já descritas em humanos à malária severa, apenas mostraram sinais de associação à malária severa, isto é, genericamente demonstraram sinais ao comparar quer os doentes MC quer os doentes SnC com os controlos MnC e/ou NIF.

## 4.2.1 Genes com Associação à Malária Cerebral

### 4.2.1.1 GENE *TGFB2* (*Transforming growth factor, beta 2*)

#### Variantes do gene *TGFB2* especificam o risco de malária cerebral

#### Análise individual dos polimorfismos mononucleotídicos (SNPs)

Na região do gene *TGFB2*, cobrindo uma extensão de 100 kb, foram genotipados vinte e sete SNPs, dos quais vinte e seis foram analisados por preencherem os requisitos de qualidade da genotipagem (Tabelas Suplementares A e B- Apêndices).

Ao comparar as frequências genotípicas dos casos MC com os controles SnC constatou-se que, sob o modelo dominante, nove dos vinte e seis polimorfismos analisados mostraram sinais sugestivos de associação à malária cerebral ( $P < 0,05$ ). O *locus* com a associação mais forte, o SNP rs1342586, obteve um OR = 1,85 [1,14 – 2,99] (Tabela 7).

A análise comparativa dos casos MC com os controles MnC e NIF não demonstrou nenhuma associação à malária cerebral. Estes resultados sugerem que, no contexto da malária severa, todos os polimorfismos do gene *TGFB2* com sinais de associação aumentam especificamente o risco de malária cerebral.

Tabela 7. Polimorfismos mononucleotídicos (SNPs) analisados no gene *TGFB2*.

Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Testes de associação <i>P</i> Odds-Ratio (IC 95%)		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/SnC	MC/MnC	MC/NIF
rs1418554 (A)	18,2	17,3	15,5	16,2	0,743	0,527	0,424
rs1418555 (A)	34,0	34,0	36,2	33,5	0,370	0,407	0,335
rs1417488 (A)	43,5	47,3	48,9	46,8	0,442	0,257	0,540
rs4846476 (C)	14,4	16,2	19,4	15,9	0,654	0,306	0,594
rs12097734 (T)	16,4	18,1	18,1	14,4	0,595	0,622	0,303
rs4625350 (T)	14,2	15,9	15,1	12,9	0,618	0,853	0,367
rs6691619 (A)	5,8	6,0	7,1	7,1	0,893	0,388	0,550
rs6604607 (C)	30,4	26,	26,1	23,6	0,541	0,384	0,071
rs3892225 (G)	15,1	15,4	13,8	14,5	0,764	0,679	0,774
rs2799086 (C)	25,0	26,9	30,1	29,8	0,606	0,253	0,297
rs947712 (A)	50,0	49,3	48,6	49,4	0,736	0,911	0,555
rs2799090 (A)	28,6	23,5	26,3	26,5	0,172	0,604	0,476
rs6703224 (T)	46,8	48,3	47,1	43,3	0,841	0,851	0,277
rs1317681 (T)	17,5	12,3	13,1	15,3	0,047 1,72 (1,00-2,96)	0,130	0,304
rs1891467 (A)	44,4	43,6	44,2	44,7	0,570	0,644	0,688
rs2796821 (T)	35,8	36,9	37,6	64,0	0,885	0,535	0,591
rs12405805 (A)	23,8	21,3	22,0	22,0	0,522	0,479	0,533
rs1934852 (A)	56,6	46,7	51,8	50,6	0,034 1,79 (1,04-3,12)	0,196	0,243

(continua)

Tabela 7. (Continuação)

Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Testes de associação <i>P</i> Odds-Ratio (IC 95%)		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/SnC	MC/MnC	MC/NIF
rs6657275 (G)	56,2	47	51,4	50,2	0,040 1,75 (1,02-2,94)	0,177	0,196
rs6671370 (T)	38,6	43,0	39,5	42,0	0,151	0,872	0,178
rs1342586 (T)	18,9	11,1	15,7	14,7	0,015 1,95 (1,14-3,34)	0,351	0,236
rs4846478 (G)	43,4	34,6	39,1	38,6	0,034 1,70 (1,04-2,79)	0,327	0,144
rs6684205 (G)	56,0	47,0	51,4	50,0	0,046 1,72 (1,01-2,94)	0,195	0,216
rs1418553 (C)	56,0	46,7	51,4	50,0	0,041 1,75 (3,03-2,0)	0,192	0,216
rs900 (T)	43,0	34,3	38,7	39,1	0,030 1,70 (1,04-2,77)	0,302	0,212
rs1473527 (A)	71,0	64,9	69,1	66,9	0,030 1,69 (1,05-2,78)	0,932	0,138

A tabela apresenta as frequências alélicas referentes aos alelos que conferem susceptibilidade à malária cerebral ou aos alelos de menor frequência. Os valores de *P* e os Odds-Ratios referem-se à análise genotípica e foram obtidos por regressão logística sob o modelo dominante. Abreviaturas: AR, alelo de referência; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

### Os polimorfismos do gene *TGFB2* de risco específico para a malária cerebral integram um forte bloco de *linkage disequilibrium*

#### Análise de *linkage disequilibrium*

Ao analisar a posição relativa dos SNPs, verificou-se que os nove SNPs que estavam especificamente associados à malária cerebral mapeavam numa região que abrangia 48 kb. A análise de LD permitiu constatar que oito dos nove SNPs que aumentavam especificamente o risco de malária cerebral mapeavam numa extensão de 27 kb na região estrutural do gene. O rs1317681 que mostrou associação marginal à malária cerebral estava mais afastado, mapeando a uma distância de 15 kb em relação aos outros SNPs. O  $r^2$  entre os nove SNPs, incluindo oito SNPs associados à malária cerebral e o rs6671370 que não estava associado à malária cerebral, variava entre 0,6 e 1,0, pelo que se considerou que

este conjunto de SNPs representava um bloco de LD na região do gene *TGFB2* (Figura 20).

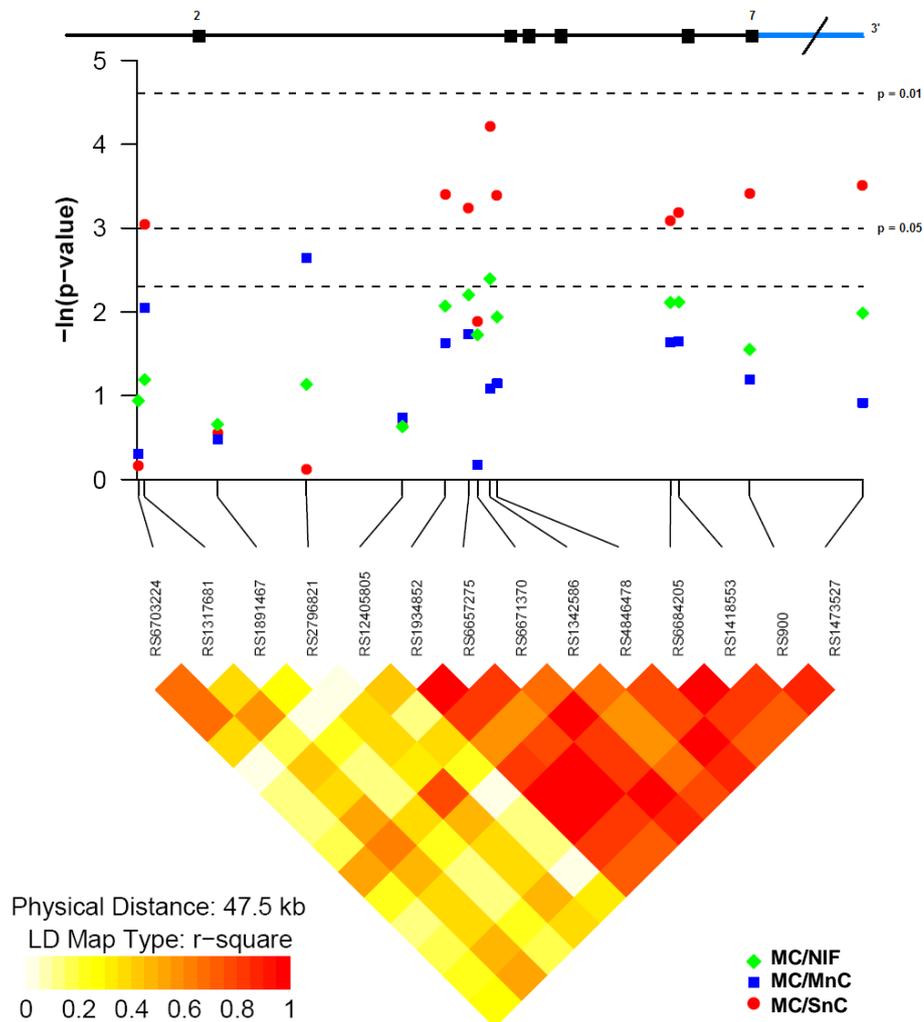


Figura 20. Testes de associação e análise de LD de SNPs analisados no gene *TGFB2*.

O diagrama representa, no eixo das ordenadas, o logaritmo neperiano do valor de  $P$  dos testes de associação dos SNPs enumerados no eixo das abcissas, obtido a partir de análise de regressão logística. Os pontos em vermelho, azul e verde representam os resultados da análise de associação com os SNPs entre os casos de malária cerebral (MC) e os controlos com malária severa não malária cerebral (SnC), malária não complicada (MnC) e não infectados (NIF), respectivamente. A parte superior do diagrama mostra uma representação em escala da estrutura do gene *TGFB2*: os exões estão representados por caixas e referenciados com o respectivo número. A parte inferior do diagrama representa o LD entre um par de SNPs medido pelo  $r^2$ . A imagem, em baixo e à esquerda, corresponde à escala de cores que representam os valores de LD, desde o amarelo ( $r^2 = 0$ ) até ao vermelho ( $r^2 = 1$ ). Este diagrama é uma adaptação da figura produzida pelo *snp. plotter R package*.

## Um haplótipo do gene *TGFB2* confere susceptibilidade específica à malária cerebral

### Associação haplotípica

A reconstrução haplotípica permitiu identificar seis haplótipos representados pelos nove SNPs do bloco de LD que foram designados, por ordem decrescente de frequência, de TGFB2a a TGFB2f (Tabela 8). A análise haplotípica de casos-controlos confirmou a associação global (*Global score statistic* – GSS) dos SNPs à malária cerebral, ao comparar os casos MC com os controlos SnC ( $P$  simulado = 0,041). Esta associação global deveu-se unicamente ao efeito significativo de dois haplótipos, o TGFB2c e o TGFB2f. O haplótipo TGFB2c conferia um risco significativamente maior de progressão para a malária cerebral, comparando com as outras formas de malária severa ( $P$  simulado = 0,035) e o seu efeito genético parecia restringir-se apenas à especificação da forma cerebral da malária severa. Contrariamente, o TGFB2f que é o haplótipo menos frequente na população estudada, diminuía significativamente o risco de progressão para a malária cerebral ao comparar os casos MC com os controlos SnC ( $P$  simulado = 0,036). Este efeito protector também era detectável quando se comparava os casos MC com os controlos MnC (*Hap-score* = -2,08) e em menor grau com os controlos NIF ( $P$  simulado = 0,049) e deriva de uma redução da frequência do haplótipo TGFB2f nos casos MC. Contudo, dada a ausência de valores significativos nos testes de associação global dos haplótipos ao comparar os casos MC com os controlos MnC e NIF (alíneas b) e c) da legenda da Tabela 8), infere-se que este efeito do haplótipo TGFB2f não é suficiente para ser detectado na estatística global.

Ao analisar a configuração alélica dos 2 haplótipos que modificam o risco de progressão para a malária cerebral, TGFB2c – AGATGGTTA e TGFB2f – CAACCACAA, constatou-se que os alelos são opostos em todos os polimorfismos exclusivamente associados à malária cerebral, sendo também opostos os efeitos destas variantes genéticas no risco de desenvolver malária cerebral (Tabela 8). Contudo, realça-se que esta constatação não se aplica ao 3º alelo (A) de cada

haplótipo que corresponde ao SNP rs6671370, que não está associado à malária cerebral, nem ao último alelo (A) que corresponde ao rs1473527. Para este SNP, a associação à malária cerebral não se revelou específica porquanto, ao comparar as frequências alélicas e genótípicas dos doentes com malária severa não cerebral (SnC) com os controlos MnC e NIF, verificou-se que o SNP rs1473527 também aumentava o risco de malária severa não cerebral ( $P = 0,032$ ), com OR equivalentes aos da malária cerebral (OR = 1,67 [1,04 – 2,66], dados não apresentados).

Tabela 8. Associação dos haplótipos do gene *TGFB2* com os fenótipos da malária.

Haplótipos	Frequência dos haplótipos (%)				Malária Cerebral versus Controlos <i>P</i> -simulado (Hap-Score)		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/SnC <sup>a</sup>	MC/MnC <sup>b</sup>	MC/NIF <sup>c</sup>
TGFB2a CAGCCACAG	29,0	35,8	32,5	32,9	0,083	0,404	0,275
TGFB2b AGACGGTTA	24,0	23,0	23,5	23,6	0,797	0,890	0,931
TGFB2c AGATGGTTA	18,3	11,5	16,0	14,8	0,035 (2,21)	0,329	0,190
TGFB2d AGATCGTAA	13,7	12,5	11,2	11,7	0,690	0,550	0,574
TGFB2e CAGCCACAA	9,8	7,6	7,5	8,5	0,361	0,336	0,471
TGFB2f CAACCACAA	4,7	9,7	9,3	8,3	0,036 (-2,26)	0,037 (-2,08)	0,049 (-1,92)

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados. Hap-Score, score do haplótipo que representa susceptibilidade (valores positivos) ou resistência (valores negativos). A reconstrução dos haplótipos foi realizada com os marcadores do bloco de LD: rs1934852, rs6657275, rs6671370, rs1342586, rs4846478, rs6684205, rs1418553, rs900 e rs1473527. Estão representados apenas os haplótipos com frequência superior a 5%.

a) GSS – *P* simulado = 0,041; MaxST – *P* simulado = 0,137

b) GSS – *P* simulado = 0,262; MaxST – *P* simulado = 0,194

c) GSS – *P* simulado = 0,410; MaxST – *P* simulado = 0,260

Com o estudo da transmissão alélica através do Teste de Desequilíbrio da Transmissão (TDT) verificou-se que o haplótipo de susceptibilidade à malária

cerebral, o TGFB2c, foi transmitido às crianças com malária severa não cerebral numa taxa significativamente inferior à esperada ( $P = 0,038$ ) (Tabela 9). Embora o estudo da transmissão deste haplótipo para as crianças com malária cerebral não tenha revelado distorção, a significativa redução da sua transmissão para as crianças com malária severa não cerebral reforça que o haplótipo TGFB2c controla o modo de apresentação da malária severa.

Tabela 9. Testes de Desequilíbrio de Transmissão com os haplótipos do gene *TGFB2* associados à malária cerebral.

Haplótipo	Fenótipo	Número de pares	Observ.	Esper.	Var (O-E)	P
TGFB2c	MC	72	20	18,9	5,3	0,653
AGATGGTTA	SnC	76	7,3	11,1	3,2	0,038
TGFB2f CAACCACAA	MC	72	8	7,9	2,6	0,921
	SnC	76	5,7	5,1	1,7	*
	MnC	72	5,0	3,7	1,1	*

\*Não analisado por ter muito baixa frequência (3%) nos pares mãe-criança; Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; Observ, transmissões observadas; Esper, transmissões esperadas; Var (O-E), variância (observada-esperada).

Na população em estudo, a análise do gene *TGFB2* demonstrou que nove SNPs mostravam sinais sugestivos de associação específica à malária cerebral. A análise haplotípica mostrou que o haplótipo TGFB2c aumentava o risco específico de desenvolver malária cerebral, quando comparado a outras complicações graves da malária.

O gene *TGFB2* foi identificado como um gene candidato de susceptibilidade à malária cerebral num cruzamento genético entre estirpes de murganhos de laboratório e estirpes derivadas de murganhos de vida selvagem,

nos quais a resistência à malária cerebral experimental segregava separadamente da resistência à hiperparasitemia [293]. Esta evidência sugeriu que, no contexto da malária grave, o gene *TGFB2* poderia constituir um factor de risco para a malária cerebral. Tanto quanto se sabe, até ao presente momento, não foi estudado nenhum tipo de associação de variantes genéticas do *TGFB2* à malária cerebral em seres humanos.

A análise de LD da estrutura haplotípica do gene *TGFB2* na população angolana permitiu definir um bloco de LD que abrange 27kb na região estrutural do gene e que não difere substancialmente do mapa de LD da população Yoruba da Nigéria publicado pelo projecto HapMap (Figura Suplementar 1 - Apêndices).

Com a reconstrução haplotípica identificou-se o haplótipo *TGFB2c* (AGATGGTTA) que aumenta a susceptibilidade para a malária cerebral. Inversamente, o *TGFB2F* (CAACCACAA), que é o haplótipo de menor frequência na população em estudo, diminui o risco de malária cerebral. Esta oposição de efeitos genéticos destes dois haplótipos sobre a malária cerebral é coincidente com o facto da combinação alélica de um haplótipo ser precisamente o oposto da combinação alélica do outro. Isto é, para cada um destes dois haplótipos cada SNP bialélico contribui com um alelo diferente. Este resultado evidencia que certas variantes genéticas podem ter efeitos opostos na patogénese da malária cerebral comparativamente a outras formas graves de malária.

Seria desejável a realização de estudos de haplótipos do gene *TGFB2* noutras populações e em áreas com diferentes níveis de endemicidade da malária para determinar se a variação genética no *TGFB2* representa uma vantagem significativa em termos de protecção contra a malária cerebral. Apesar do presente estudo ter demonstrado que certas variantes genéticas do *TGFB2* parecerem controlar o risco de malária cerebral desconhece-se se tais variantes exercem algum efeito funcional.

A citocina Factor transformador de crescimento  $\beta 2$  (TGF- $\beta 2$ ) que é codificada pelo gene *TGFB2* é uma das três isoformas do Factor transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) juntamente com as citocinas TGF- $\beta 1$  e TGF- $\beta 3$ . O TGF- $\beta$  é produzido por uma diversidade de células incluindo as células T, os astrócitos e

as plaquetas e actua na angiogénese, na hematopoiese, na morfogénese e na proliferação celular [294].

O TGF- $\beta$  é uma citocina anti-inflamatória que contribui para a manutenção da tolerância imunológica e em conjugação com a interleucina-2 (IL2) induz a conversão das células  $CD25^-$  para células T reguladoras  $Foxp3^+CD4^+CD25^+$  [295]. Em modelos animais de malária verificou-se que a produção do TGF- $\beta$  modulava a actividade das citocinas inflamatórias e controlava a parasitemia, interferindo assim na evolução da doença [296, 297].

Apesar de não estar esclarecido o papel das citocinas TGF- $\beta$  na malária em humanos [298], num estudo longitudinal de infecção com esporozoítos pela via natural verificou-se que a indução das células T reguladoras provocada pelo TGF- $\beta$  aumentava a taxa de replicação do parasita [299]. Estudos de necropsia demonstraram a acumulação de citocinas da família TGF- $\beta$  nos cérebros de doentes que faleceram com o diagnóstico de malária cerebral [300].

Em doentes com malária severa foram detectados baixos níveis de citocinas tais como o TGF- $\beta$  [301, 302], mas persiste o desafio para esclarecer se as células T reguladoras desempenham algum papel na evolução clínica da malária. Num estudo realizado na Gâmbia, em grupos distintos de crianças com malária não complicada e com malária severa, constatou-se um aumento significativo mas semelhante do número absoluto de células (por litro de sangue) que expressavam o fenótipo das células T reguladoras (em citometria de fluxo  $CD3^+CD4^+FOXP3^+CD127^{low}$ ) em ambos os grupos de doentes na fase de convalescença, comparativamente à fase aguda ou comparando com crianças controlo saudáveis [303]. Neste estudo foi sugerido que nas crianças com malária severa e nas crianças com malária não complicada, as células T reguladoras teriam um fenótipo predominante de células de memória que são activadas durante a fase aguda da doença.

No cérebro as citocinas TGF- $\beta$  regulam a vigilância imunológica, a mielinização e a sobrevivência neuronal [304]. Embora todas as isoformas do TGF- $\beta$  estejam presentes no cérebro, o TGF- $\beta$ 1 e o TGF- $\beta$ 2 são as mais abundantes [305].

Um estudo realizado *in vitro* demonstrou o papel neuroprotector do TGF- $\beta$ 2 produzido pela microglia que são as principais células efectoras da imunidade inata no cérebro [306]. O TGF- $\beta$ 2 protege os neurónios das lesões citotóxicas, promove a diferenciação e a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos e regula negativamente a resposta inflamatória do sistema nervoso central [307]. Estudos realizados em modelos murinos mostraram que após injeção intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal o TGF- $\beta$ 2 atravessava a barreira hematoencefálica (BEE) difundindo-se no espaço extracelular que circunda os neurónios e as células da glia [308].

Os astrócitos, secretores de TGF- $\beta$ , são reguladores potentes de várias funções das células endoteliais dos capilares cerebrais, contribuindo não só para a formação das junções estreitas intercelulares (*tight junctions*) da BEE mas também para a sua elevada resistência eléctrica e expressão de sistemas de transporte altamente selectivos que fornecem nutrientes essenciais ao cérebro [309]. Foi demonstrado que o TGF- $\beta$  media a regulação feita pelos astrócitos na expressão endotelial de factores anticoagulantes [310]. Neste estudo, considera-se a hipótese de o cérebro possuir apenas um aparelho regulador da hemostase que depende dos astrócitos e que ocorre na microcirculação, sendo mediado pelo TGF- $\beta$ . Um estudo retrospectivo de marcadores de lesão parenquimatosa cerebral no LCR, realizado em crianças quenianas com malária severa, demonstrou uma associação positiva entre níveis elevados de S-100B (marcador de degeneração dos astrócitos) e o maior risco de convulsões repetidas [311].

Do ponto de vista prático, o coma é a manifestação que permite distinguir a malária cerebral das restantes formas de malária severa e embora se valorize o sequestro dos eritrócitos parasitados nos capilares cerebrais na patogénese da malária cerebral, o sequestro não é exclusivamente observado no cérebro nos doentes com malária cerebral, sendo observado noutros órgãos [312]. Todavia, em co-culturas de células endoteliais da veia umbilical humana com eritrócitos parasitados por *P. falciparum* provenientes de doentes com malária cerebral, demonstrou-se que os níveis de ARNm das proteínas das junções estreitas intercelulares das células endoteliais diminuía com o tempo de cultura. Contrariamente, quando os eritrócitos provinham de doentes com malária não

complicada observava-se um aumento de ARNm proporcional ao tempo de cultura e no caso dos provenientes de doentes com malária severa não se observaram alterações durante um período de observação de três horas [313]. Considerou-se então a hipótese que os eritrócitos parasitados podem alterar a expressão das proteínas das células endoteliais no local de sequestração e deste modo determinar a severidade da malária.

Assim, tendo em conta o possível papel regulador do TGF- $\beta$  na hemostase cerebral através dos astrócitos (produtores de TGF- $\beta$ , tal como as células endoteliais), incluindo a expressão endotelial de factores anticoagulantes, levanta-se a hipótese de que certas variantes genéticas do *TGFB2* possam contribuir para a desregulação destes mecanismos. A implicação de factores vasculares que favorecem a vasoconstrição cerebral em crianças com malária severa, sublinha a necessidade de se estudar os eventos microvasculares na circulação cerebral [314] sendo corroborada pelas recentes descrições de alterações da regulação do sistema de coagulação na malária cerebral [314, 315].

#### 4.2.1.2 Gene *HMOX1* (*Heme oxygenase-1*)

##### Variantes do gene *HMOX1* especificam o risco de malária cerebral

##### Análise individual dos polimorfismos mononucleotídicos (SNPs)

Foram genotipados onze SNPs na região estrutural do gene *HMOX1* cobrindo 17 kb, dos quais dez foram analisados (Tabelas Suplementares A e B - Apêndices).

No estudo de casos-controlos, ao comparar exclusivamente as frequências alélicas e genotípicas dos casos MC com as dos controlos SnC verificou-se que, sob o modelo dominante, três dos dez SNPs analisados aumentavam o risco de evolução para a malária cerebral ( $OR > 1,81$  e  $P < 0,05$  (Tabela 6). Considerando que esta associação não se verificou em nenhum outro teste de associação, designadamente entre casos MC e controlos MnC e NIF, concluiu-se que, no contexto da malária severa, aqueles SNPs especificam um maior risco de evolução para a malária cerebral.

Ao comparar as frequências alélicas e genotípicas dos casos MC com os controlos MnC, o SNP rs2071748 evidenciou uma tendência para associação à malária cerebral, conferindo susceptibilidade ( $P = 0,062$ ). Contudo, é de realçar o facto que este SNP também mostrou uma diferença estatisticamente significativa ao comparar as frequências genotípicas dos doentes com malária severa não cerebral (SnC) com as dos controlos MnC ( $P = 0,039$ ; dado não apresentado). Com este resultado infere-se que o rs2071748 é um polimorfismo que não está especificamente associado à malária cerebral, sugerindo contribuir para um aumento de risco de progressão para a malária severa.

Tabela 10. Polimorfismos mononucleotídicos (SNPs) analisados no gene *HMOX1*.

Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Testes de Associação <i>P</i> Odds-Ratio (IC 95%)		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/SnC	MC/MnC	MC/NIF
rs17878600 (C)	64,0	60,0	61,0	61,0	0,236	0,424	0,462
rs2071746 (T)	76,0	78,0	71,0	72,0	0,748	0,161	0,251
rs2071748 (A)	70,9	71,8	62,8	65,3	0,904	0,062 1,58 (0,97-2,56)	0,209
rs8139532 (G)	55,2	48,3	52,5	53,0	0,025 1,85 (1,07-3,22)	0,259	0,293
rs7285877 (C)	55,3	48,0	53,6	53,4	0,024 1,85 (1,07-3,22)	0,401	0,317
rs11912889 (G)	54,4	47,3	50,7	52,8	0,032 1,81 (1,05-3,22)	0,341	0,242
rs9622194 (G)	56,3	50,7	55,7	54,0	0,063	0,463	0,157
rs2285112 (G)	76,7	79,5	70,9	74,6	0,833	0,076	0,397
rs5999817 (C)	88,0	88,5	87,8	88,5	0,651	0,961	0,714
rs17883419 (C)	88,0	88,7	84,4	86,3	0,891	0,172	0,492

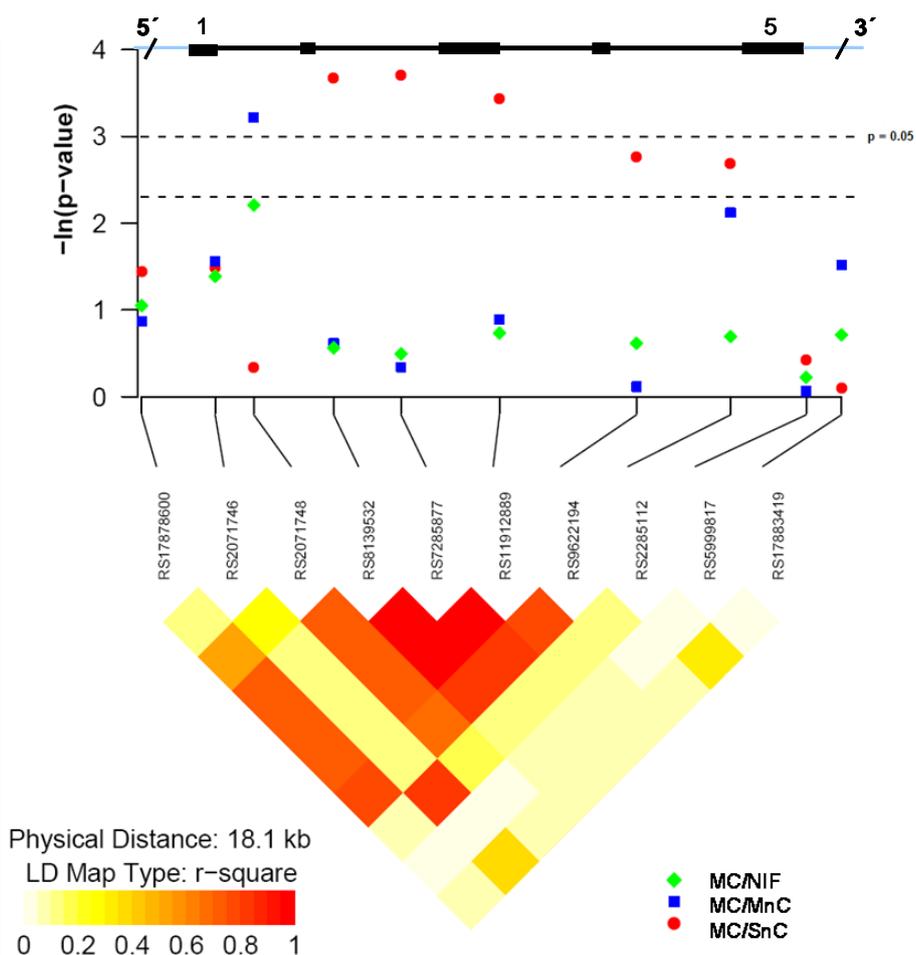
A tabela apresenta as frequências alélicas referentes aos alelos que conferem susceptibilidade à malária cerebral ou aos alelos de menor frequência. Os valores de *P* e os Odds-Ratios referem-se à análise genotípica e foram obtidos por regressão logística sob o modelo dominante. Abreviaturas: AR, alelo de referência; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

### Os polimorfismos do gene *HMOX1* de risco específico para a malária cerebral integram um forte bloco de *linkage disequilibrium*

#### Análise de *linkage disequilibrium*

Prosseguindo com a metodologia definida, analisou-se na região do gene *HMOX1* se a posição relativa dos três SNPs que aumentavam especificamente o risco de desenvolver malária cerebral, contribuiria para definir um bloco de polimorfismos que teriam uma maior probabilidade de serem herdados em conjunto.

De facto, o mapa de LD da região em análise revelou que cinco dos dez SNPs do gene *HMOX1* mapeavam dentro de um bloco que se encontrava em forte LD, sendo o  $r^2 > 0,9$ , numa distância de 9,3 kb (Figura 21). Nesta região, encontravam-se não só os três SNPs específicos de malária cerebral, mas também o SNP rs9622194 que tinha uma associação marginal à malária cerebral ( $P = 0,063$ , Tabela 10) e o rs2071748.



**Figura 21.** Testes de associação e análise de LD dos dez SNPs genotipados no gene *HMOX1*. o diagrama representa, no eixo das ordenadas, o logaritmo neperiano do valor de P dos testes de associação dos SNPs enumerados no eixo das abcissas, obtido a partir de análise de regressão logística. Os pontos em vermelho, azul e verde representam os resultados da análise de associação com os SNPs entre os casos de malária cerebral (MC) e os controlos com malária severa não malária cerebral (SnC), malária não complicada (MnC) e não infectados (NIF), respectivamente. A parte superior do diagrama mostra uma representação em escala da estrutura do gene *HMOX1*: os exões estão representados por caixas e referenciados com o respectivo número. A parte inferior do diagrama representa o LD entre um par de SNPs medido pelo  $r^2$ . A imagem, em baixo e à esquerda, corresponde à escala de cores que representam os valores de LD, desde o amarelo ( $r^2 = 0$ ) até ao vermelho ( $r^2 = 1$ ). Este diagrama é uma adaptação da figura produzida pelo *snp. plotter R package*.

## Um haplótipo do gene *HMOX1* confere susceptibilidade inespecífica à malária cerebral

### Associação haplotípica

Recorreu-se à metodologia de reconstrução haplotípica, usando todos os SNPs do bloco de LD, de forma a estudar a possibilidade de algumas combinações alélicas daqueles SNPs exercerem um efeito conjunto no risco específico de progressão da malária severa para a malária cerebral.

Identificaram-se seis haplótipos que, por ordem decrescente de frequência, se designaram de HMOX1a até HMOX1f. Destes, apenas três (HMOX1a, HMOX1b e HMOX1c) foram analisados por terem uma frequência superior a 5% na população (Tabela 7). O haplótipo mais frequente, HMOX1a (AATAA), era constituído pela combinação dos alelos alternativos (opostos) aos alelos de susceptibilidade dos SNPs especificamente associados à malária cerebral (rs8139532, rs7285877 e rs11912889). Apesar de ser o mais frequente, o haplótipo HMOX1a não evidenciou qualquer associação à malária cerebral. No entanto, foram identificados dois haplótipos que continham os alelos de susceptibilidade à malária cerebral. A frequência do haplótipo HMOX1c (AGCGG) era significativamente maior nos casos MC ao compará-los não só com os controlos SnC mas também com os controlos MnC e NIF (Tabela 11). Contudo, os resultados dos testes globais de associação (GSS e MaxST) mostram que a associação mais forte é a que se verifica ao comparar os casos MC com os controlos MnC. Este resultado sugere que o haplótipo HMOX1c é um factor genético inespecífico que aumenta o risco de progressão para a malária cerebral.

Uma vez que a associação do haplótipo HMOX1c à malária cerebral era mais evidente ao comparar os casos MC com os controlos MnC ( $P = 0,002$ ), sugerindo ser um factor inespecífico de susceptibilidade à malária cerebral, investigou-se a transmissão deste haplótipo das mães para os controlos com malária não complicada. Os resultados do TDT demonstraram que as mães transmitiram o haplótipo HMOX1c às crianças com malária não complicada numa taxa significativamente inferior à esperada ( $P = 0,004$ ) (Tabela 12). Esta menor

transmissão do haplótipo HMOX1c às crianças com malária não complicada reflecte o efeito deste haplótipo no controlo da evolução da malária.

Tabela 11. Associação dos haplótipos do gene *HMOX1* com os distintos fenótipos da malária.

Haplótipos	Frequência dos haplótipos (%)				MC versus Controlos <i>P</i> -simulado (Hap-Score)			SnC versus controlos <i>P</i> -simulado (Hap-Score)	
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/ SnC <sup>a</sup>	MC/ MnC <sup>b</sup>	MC/ NIF <sup>c</sup>	SnC/ MnC <sup>d</sup>	SnC/ NIF <sup>e</sup>
HMOX1a AATAA	41,3	45,7	42,1	43,2	0,360	0,938	0,620	0,377	0,586
HMOX1b GGCGG	29,1	28,0	37,5	34,7	0,708	0,056 (-1,94)	0,220	0,015 (-2,42)	0,063 (-1,78)
HMOX1c AGCGG	22,7	14,8	11,7	14,6	0,026 (2,11)	0,002 (3,06)	0,013 (2,41)	0,259	0,992

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados. Hap-Score, score do haplótipo que representa susceptibilidade (valores positivos) ou resistência (valores negativos). A reconstrução dos haplótipos foi realizada com os marcadores do bloco de LD, rs2071748, rs8139532, rs7285877, rs11912889 e rs9622194. Estão representados apenas os haplótipos com frequência superior a 5%.

a) GSS – *P* simulado = 0,061; MaxST – *P* simulado = 0,084

b) GSS – *P* simulado = 0,009; MaxST – *P* simulado = 0,006

c) GSS – *P* simulado = 0,105; MaxST – *P* simulado = 0,038

d) GSS – *P* simulado = 0,151; MaxST – *P* simulado = 0,067

e) GSS – *P* simulado = 0,105; MaxST – *P* simulado = 0,160

Contudo, é de especial relevância o facto do efeito do haplótipo HMOX1c (AGCGG) na susceptibilidade à malária cerebral ser revertido para um efeito protector no haplótipo HMOX1b (GGCGG) que apesar de evidenciar um sinal marginal ( $P = 0,056$ ) deve ser valorizado tendo em conta os valores de  $P$  simulado dos testes globais de associação (GSS e MaxST) (Tabela 11). A reversão deste efeito correlaciona-se com a substituição do alelo A do rs2071748 no HMOX1c pelo alelo G no HMOX1b. Este haplótipo (HMOX1b) era menos frequente não só nos casos MC mas também nos controlos SnC, quando comparados com os controlos MnC e NIF (Tabela 11). Uma vez que as frequências nos casos MC e nos controlos SnC eram muito semelhantes, levantou-se a hipótese do haplótipo HMOX1b ser um factor de protecção inespecífico contra a malária severa e não especificamente contra a malária cerebral. Com o intuito de analisar esta hipótese, agruparam-se todos os doentes com malária cerebral e com malária severa não cerebral como malária severa e através do TDT estudaram-se as transmissões do haplótipo HMOX1b em 224 pares mãe-criança afectada. O TDT demonstrou que a transmissão do haplótipo HMOX1b às crianças com malária severa foi significativamente inferior à esperada ( $P = 0,042$ ), dando consistência à hipótese que este haplótipo não é um factor específico de protecção contra a malária cerebral mas sim contra a malária severa em geral (Tabela 12).

Tabela 12. **Testes de Desequilíbrio de Transmissão com os haplótipos associados do gene *HMOX1*.**

Haplótipo	Fenótipo	Número de doentes	Observ.	Esper.	Var (O-E)	$P$
HMOX1b GGCGG	MC + SnC	224	127,0	131,6	30,7	0,042
	MnC	106	75,9	71,5	14,7	0,303
	MC	103	42,2	39,8	10,8	0,543
HMOX1c AGCGG	SnC	112	34,2	37,0	10,5	0,416
	MnC	106	23,1	32,5	9,0	0,004

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados. Observ, transmissões observadas; Esper, transmissões esperadas; Var (O-E), variância (observada-esperada).

## Os alelos associados à malária cerebral controlam a expressão do gene *HMOX1*

A análise de associação genética sugeriu que certas variantes do gene *HMOX1* podem condicionar o modo de apresentação clínica da malária. Tendo em conta que a enzima heme oxigenase-1 (HO-1), codificada pelo gene *HMOX1*, é induzida na infecção pelo *P. falciparum*, investigou-se nos doentes com malária cerebral se tais variantes poderiam influenciar também o nível de expressão do gene *HMOX1*. Através da técnica de PCR em Tempo Real quantificou-se o ARNm do gene *HMOX1* nas células do sangue periférico de 43 doentes com malária cerebral e constatou-se que a média de expressão relativa era de 4.91 ( $\pm$  4.26). A análise de QTL nível de expressão génica foi efectuada com o programa *Plink* (versão 1.6) testando-se o modelo genético aditivo. Esta análise revelou associação significativa de quatro SNPs do bloco de LD do gene *HMOX1* ao traço de expressão do *HMOX1* (Tabela 13).

Tabela 13. **Análise de locus de traço quantitativo (QTL) referente à expressão génica de *HMOX1*.**

Referência dbSNP	AR	BETA	L95	U95	P simulado
rs2071748	G	0,36	-1,65	2,37	0,731
rs8139532	G	2,07	0,29	3,85	0,021
rs7285877	C	2,07	0,29	3,85	0,021
rs11912889	G	2,23	0,44	4,03	0,012
rs9622194	G	1,88	0,13	3,63	0,028

AR, alelo representado na configuração do haplótipo *HMOX1b*. Os resultados referem-se à análise de QTL utilizando o modelo aditivo. Beta é o coeficiente de regressão. L95 e U95 representam os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança de 95% do coeficiente de regressão.

É interessante realçar que os quatro SNPs que controlavam a expressão do gene *HMOX1* incluíam os três SNPs associados à malária cerebral, sugerindo que estas variantes genéticas poderiam contribuir para a evolução da malária, através do controlo da síntese da enzima HO-1.

### **Os alelos associados à malária cerebral controlam os níveis de heme livre plasmático**

A HO-1 é a enzima que cataboliza o heme livre plasmático. Como forma de avaliar a consistência da associação observada entre os SNPs do gene *HMOX1* e o nível de expressão génica que influencia a síntese da enzima HO-1, foram determinados os valores do heme livre no plasma em 56 doentes com malária cerebral e em 52 controlos SnC. A média dos valores dos níveis plasmáticos de heme livre em todos os doentes foi de 7,6 uM, embora registando-se uma ampla variação de 1,3 uM a 71,6 uM. Verificou-se que todos os controlos SnC excepto um (2%) tinham níveis de heme livre abaixo do valor médio de 7,6 uM (Figura 22). Por outro lado, 13 dos 56 casos de malária cerebral (24%) evidenciaram níveis elevados de heme livre (> 7,6), contribuindo para uma diferença significativa na distribuição dos níveis de heme livre nos casos MC comparativamente com os controlos SnC ( $P = 0,003$ , teste de Smirnov-Kolmogorov).

Não foi encontrada nenhuma correlação clínica que explicasse a associação dos valores elevados de heme livre à malária cerebral, nomeadamente com o grau de parasitemia, a severidade da anemia, a presença da mutação *HbS*, a gravidade do coma ou com o óbito.

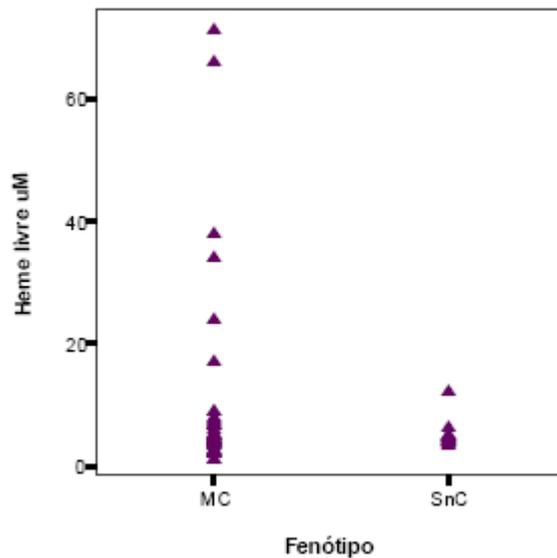


Figura 22. **Distribuição dos valores de heme livre plasmático nos doentes com malária severa.** A concentração plasmática (uM) do heme livre foi medida no plasma na admissão em 56 doentes com malária cerebral (MC) e em 52 doentes com malária severa não cerebral (SnC). Cada triângulo representa o valor absoluto do heme livre em cada doente.

Através da análise de QTL explorou-se se os SNPs que controlavam o nível de expressão do gene *HMOX1* também influenciavam os níveis plasmáticos do heme livre nos doentes com malária cerebral. A análise de QTL, sob o modelo aditivo, demonstrou associação significativa dos níveis de heme livre aos cinco SNPs do bloco de LD do gene *HMOX1* (Tabela 14). Neste grupo estavam incluídos os três SNPs (rs8139532, rs7285877 e rs11912889) que não só aumentavam o risco específico de evoluir para a malária cerebral mas também os níveis de expressão do gene *HMOX1*. O SNP rs2071748, que distingue o haplótipo *HMOX1b* protector contra a malária severa do haplótipo *HMOX1c* que confere susceptibilidade à malária cerebral (Tabela 11), também se mostrou marginalmente associado ao controlo genético dos níveis de heme livre no plasma ( $P = 0,047$ ). Não se verificou associação ao efectuar o mesmo tipo de análise nos controlos com malária severa não cerebral.

Tabela 14. Análise de *locus* de traço quantitativo (QTL) referente ao nível plasmático de heme livre.

Referência dbSNP	AR	BETA	L95	U95	P simulado
rs2071748	G	-8,66	-16,74	-0,57	0,047
rs8139532	G	-7,46	-13,48	-1,43	0,023
rs7285877	C	-7,44	-13,51	-1,37	0,023
rs11912889	G	-7,44	-13,52	-1,37	0,022
rs9622194	G	-7,17	-13,07	-1,26	0,028

RA, alelo representado na configuração do haplótipo HMOX1b. Os resultados referem-se à análise de QTL utilizando o modelo aditivo. Beta é o coeficiente de regressão. L95 e U95 representam os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança de 95% do coeficiente de regressão.

### Controlo da expressão génica de HMOX1 e dos níveis de heme livre nos doentes com malária cerebral

A Figura 23 ilustra o efeito genético de cada um dos três SNPs associados à malária cerebral na expressão do gene *HMOX1* e nos níveis plasmáticos de heme livre. Nestes gráficos é notório que os genótipos que promovem o aumento da média da expressão génica de *HMOX1* diminuem a média dos valores de heme livre no plasma dos doentes com malária cerebral. É necessário realçar que a expressão de *HMOX1* e os níveis de heme livre foram medidos em dois grupos distintos, não sobreponíveis, de doentes com malária cerebral, garantindo deste modo uma avaliação independente dos efeitos genéticos dos SNPs sobre os dois traços quantitativos.

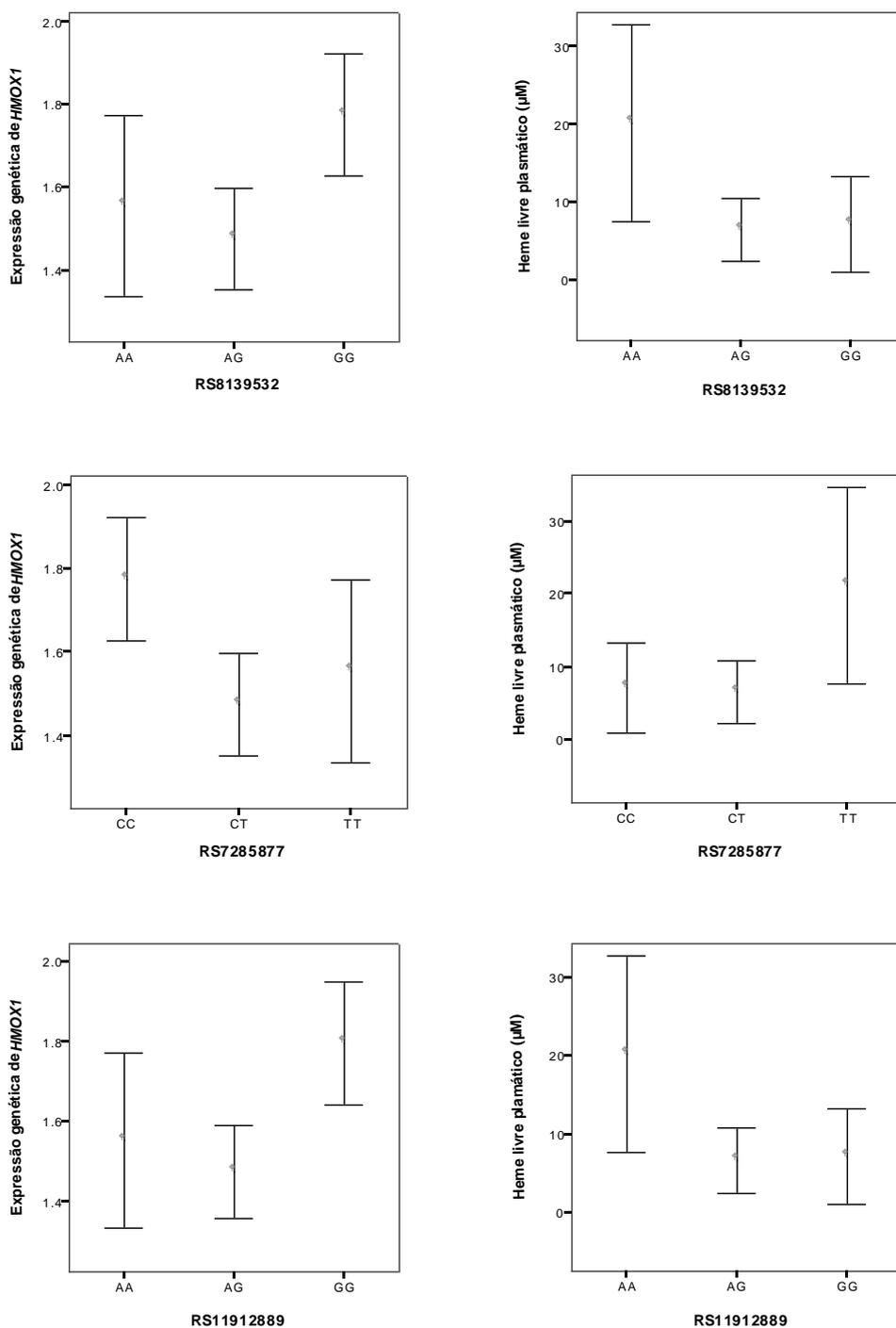


Figura 23. Controlo genético da expressão de *HMOX1* e dos níveis plasmáticos de heme livre pelos SNPs rs8139532, rs7285877 e rs11912889 nos doentes com malária cerebral.

O nível de expressão genética de *HMOX1* representa a transformação logarítmica de base 10 das unidades relativas e foi medido em 43 doentes. As concentrações plasmáticas de heme livre estão expressas em µM e foram medidas em 54 doentes. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% da média dos valores, de acordo com o genótipo.

Esta análise sugere que as variantes genéticas de *HMOX1* que nos doentes com malária cerebral contribuem para o aumento da expressão génica de *HMOX1* também estão associadas à consequente diminuição do heme livre, o substrato enzimático da HO-1. Observou-se também que a configuração alélica do haplótipo HMOX1b, que protege contra a malária severa, exerce o seu efeito genético diminuindo os níveis de heme livre (Tabela 14, coluna Beta) e aumentando a expressão de *HMOX1* (Tabela 13, coluna Beta). Estes resultados indicam que os alelos que integram o haplótipo HMOX1b medeiam a protecção contra a malária severa, através do aumento da degradação do heme livre promovida pela enzima HO-1. Curiosamente, o SNP rs2071748 não evidencia nenhum efeito sobre a expressão de *HMOX1* (Tabela 13).

Neste estudo, numa coorte de crianças angolanas, demonstrou-se que diferentes variantes genéticas do gene *HMOX1* (Heme oxygenase-1) contribuem para o risco de progressão da malária, condicionando diferentes formas de apresentação clínica.

Ao comparar casos MC com os controlos SnC verificou-se que três SNPs do gene *HMOX1* (rs8139532, rs7285877 e rs11912889) estavam especificamente associados à síndrome malária cerebral com OR de 1,8 (Tabela 10). Para reforçar que tais factores genéticos eram específicos da síndrome malária cerebral, os casos MC também foram comparados com os controlos MnC e NIF, não se tendo encontrado nenhuma associação.

Identificou-se ainda uma combinação haplotípica, o haplótipo HMOX1c, com uma frequência de 14,6% na população não infectada que aumentava inespecificamente o risco de malária cerebral. O facto da sua transmissão para as crianças com malária não complicada ter sido significativamente inferior à esperada, sugere que a ausência deste haplótipo favorece a apresentação clínica da doença sob a forma não complicada. Pelo contrário, o haplótipo HMOX1b revelou um efeito protector em relação às formas de malária severa. Este haplótipo foi transmitido numa taxa significativamente inferior à esperada aos

doentes que desenvolveram complicações da malária, sugerindo que a ausência do haplótipo *HMOX1b* favorece a evolução para a malária severa (Tabelas 11 e 12). Esta constatação motivou investigar se os alelos integrantes do haplótipo *HMOX1b* teriam algum papel na regulação da expressão do gene *HMOX1* ou na actividade da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) que é o produto do gene. De facto o estudo de traço quantitativo referente à expressão génica de *HMOX1* mostrou que tais alelos aumentavam a expressão de ARNm de *HMOX1* nas células do sangue periférico, o que faz inferir que o haplótipo *HMOX1b* pode interferir aumentando a transcrição do gene *HMOX1* e consequentemente aumentar a síntese da enzima HO-1.

Sendo o heme livre um substrato da enzima HO-1, uma forma indirecta de investigar a eventual influência dos alelos integrantes do haplótipo *HMOX1b* seria medir os níveis plasmáticos de heme livre em doentes com malária severa, explorando assim, também de forma indirecta, o grau de actividade da enzima. A análise dos níveis plasmáticos do heme livre nos doentes com malária cerebral e com malária severa não cerebral revelou que enquanto quase todos os doentes com malária severa não cerebral (SnC) tinham valores baixos de heme livre plasmático, cerca de um quarto dos doentes (24%) com malária cerebral tinha valores de heme livre elevados. Este facto faz ponderar sobre a hipótese de os níveis plasmáticos elevados de heme livre contribuírem para a fisiopatologia da malária cerebral. Constatou-se que os alelos do haplótipo protector contra a malária severa (*HMOX1b*) se associavam aos valores plasmáticos mais baixos do heme livre, apenas nos doentes com malária cerebral.

Os resultados obtidos com a análise de associação genética de casos-controlos encontram uma interpretação biológica nos resultados da análise de traços quantitativos, porquanto os alelos integrantes do haplótipo que protege contra as formas graves de malária não só medeiam o aumento da transcrição do gene *HMOX1*, mas também se associam a valores plasmáticos baixos de heme livre nos doentes com malária cerebral. A importância destes efeitos genéticos é reforçada pelo facto de não se ter encontrado, na população estudada, nenhuma correlação entre os genótipos dos SNPs do gene *HMOX1* que modificam o risco de malária severa e a parasitemia, nem entre os valores elevados de heme nos

doentes com malária cerebral e qualquer característica clínica, designadamente a presença de anemia severa, a gravidade do coma, o óbito, nem mesmo com o grau de parasitemia. Todavia, não foram investigados exaustivamente os genótipos da haptoglobina ou a ahaptoglobinémia e outros factores que podem influenciar os valores do heme livre nas populações de áreas endémicas de malária [316, 317]. Para o presente estudo foram genotipados três SNPs do gene que codifica para a haptoglobina (*HP*). O único SNP que se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (rs5471) não estava associado à malária cerebral, mas sim à malária severa não cerebral (Tabela 25).

Por outro lado, também se verificou que os efeitos genéticos das variantes do *HMOX1* descritos no presente estudo são independentes da mutação *HbS*.

A interpretação deste conjunto de resultados, levanta a hipótese de que o efeito protector do haplótipo *HMOX1b* contra a malária grave, concretiza-se através do aumento da degradação do heme livre pela enzima hemoxigenase-1 (*HO-1*). Este foi o mecanismo proposto em modelos murinos para explicar a protecção conferida pela enzima *HO-1* contra a malária grave [259]. Neste contexto, e de acordo com a complexidade poligénica da genética da malária, a contribuição da variação genética no *HMOX1* parece exercer-se ao nível do controlo da degradação do heme livre, contrariando assim as respostas inflamatórias que quebrariam a barreira hematoencefálica na evolução da patogénese da malária cerebral [318]. Nestas observações fundamenta-se a hipótese de que o haplótipo *HMOX1b* diminui o risco das formas severas de malária, promovendo o aumento da síntese de *HO-1* que reforça a resposta anti-inflamatória induzida pela *HO-1*, incluindo-se nesta resposta a degradação do heme livre. Embora na população em estudo o haplótipo *HMOX1b* proteja contra a malária severa em geral, o efeito dos alelos que o integram sobre a expressão génica e sobre os níveis de heme livre só se evidenciam nos doentes com malária cerebral. Esta observação parece reforçar a ideia que certas variantes genéticas do gene *HMOX1*, no contexto da malária severa, permitem distinguir os doentes com malária cerebral, porquanto os portadores dos alelos que configuram o haplótipo *HMOX1b* têm a capacidade de aumentar a síntese de *HO-1* que por sua vez promove uma maior degradação do heme. Em modelos animais de malária

com murinos demonstrou-se que a enzima HO-1 desencadeava uma resposta anti-inflamatória que suprimia a malária cerebral experimental [259]. Um estudo realizado em doentes de Myanmar (Tailândia) sugeriu que microssatélites de uma repetição GT do gene *HMOX1* constituem um factor de risco para a malária cerebral [264]. É importante realçar que esta repetição GT mapeia fora do bloco de LD, entre os SNPs rs2071746 e rs2971748, precisamente numa região em que a associação à malária cerebral está em franco declínio. Assim, tendo em conta o tipo de estrutura haplotípica identificada na população do presente estudo, provavelmente o microssatélite GT contribuiria muito pouco para o estudo da associação da estrutura haplotípica do gene *HMOX1* com as diferentes formas de apresentação da malária. A Figura Suplementar 2 (Apêndices) mostra o mapa de LD da população Nigeriana Youruba publicado pelo projecto HapMap, que tem uma estrutura que não difere muito da população do presente estudo.

A explicação do mecanismo através do qual o haplótipo *HMOX1c* confere susceptibilidade à malária cerebral é menos clara. É interessante realçar que a presença do alelo A na posição do rs2071748 distingue o haplótipo *HMOX1c* (AGCGG) que confere susceptibilidade à malária cerebral, do haplótipo *HMOX1b* (GGCGG) que protege contra a malária severa (Tabela 11). Se, por um lado, o alelo G na posição do rs2071748 contribui para diminuir os níveis plasmáticos do heme livre no contexto do haplótipo *HMOX1b*, por outro lado, este alelo não consegue exercer nenhum efeito na expressão génica do *HMOX1* (Tabelas 13 e 14). Esta constatação levanta a hipótese de que no contexto do haplótipo *HMOX1c*, o efeito genético representado pelo alelo A anula o controlo sobre a expressão génica de *HOMX1* e dos níveis de heme livre, aumentando possivelmente o risco de malária cerebral. A frequência relativa dos haplótipos de *HMOX1* fazem ponderar a possibilidade do haplótipo *HMOX1c* representar uma combinação genotípica de relativa baixa frequência na população em estudo que advém da recombinação entre o *HMOX1a* e o *HMOX1b* e dá origem a um haplótipo de susceptibilidade. Na verdade, a análise haplotípica sugere que as variantes do gene *HMOX1* que aumentam o risco de malária cerebral actuam em diferentes fases da evolução clínica da malária. Isto é particularmente relevante se os alelos dos SNPs forem avaliados individualmente, como é o caso do alelo A

do rs2071748 que tem diferentes contribuições na progressão da doença, de acordo com o contexto haplotípico. Deste modo, levanta-se a possibilidade de o gene *HMOX1* poder actuar em diferentes níveis da patogenia da malária humana.



#### **4.2.1.3 GENE *CD36* (*Thrombospondin receptor*)**

##### **Variantes do gene *CD36* influenciam inespecificamente o risco de malária cerebral**

##### **Análise individual dos polimorfismos mononucleotídicos (SNPs)**

Genotiparam-se quinze SNPs numa extensão que cobria 74,8 kb da região estrutural do gene *CD36*, tendo sido analisados onze SNPs (Tabelas Suplementares A e B - Apêndices).

Ao comparar as frequências alélicas e genotípicas dos casos MC com os controlos SnC verificou-se que dois dos onze SNPs analisados (rs11994182 e rs3211821) conferiam um aumento de risco de malária cerebral (OR = 2,2 e OR = 1,5, respectivamente) (Tabela 15). Contudo ao comparar os casos MC com os controlos NIF, o SNP rs1194182 mostrou uma associação ainda mais forte ( $P = 0,002$ ; OR = 2,7). Por outro lado, a associação do SNP rs3211821 à malária cerebral foi muito mais evidente ao comparar os casos MC com os controlos MnC ( $P = 0,006$ ). Um terceiro polimorfismo, o rs1358337, apenas revelou associação ao comparar os casos MC com os controlos MnC e NIF (Tabela 15). Nenhum dos SNPs genotipados mostrou sinais de associação à malária severa não cerebral (dados não apresentados).

Tabela 15. Polimorfismos mononucleotídicos (SNPs) analisados no gene *CD36*.

Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Testes de Associação <i>P</i> Odds-Ratio (IC 95%)		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/SnC <sup>a</sup>	MC/MnC <sup>a</sup>	MC/NIF <sup>b</sup>
rs1194182 (G)	40,2	29,9	32,3	31,4	0,016 2,2 (1,1-4,5)	0,070	0,002 2,7 (1,5-4,8)
rs1049654 (C)	45,3	39,7	39,8	39,3	0,200	0,203	0,118
rs3211810 (G)	14,6	15,0	15,0	14,5	0,886	0,887	0,652
rs3211811 (C)	12,2	10,6	11,3	12,8	0,540	0,760	0,193
rs3211820 (A)	22,1	28,4	28,3	26,2	0,106	0,136	0,430
rs3211821 (G)	41,5	31,9	29,9	33,7	0,024 1,5 (1,1-2,1)	0,006 1,6 (1,4-2,3)	0,033 <sup>a</sup> 1,4 (1,0-1,9)
rs3211849 (A)	37,3	36,1	36,6	36,6	0,770	0,875	0,990
rs1358337 (C)	46,3	41,1	36,8	39,9	0,239	0,038 1,4 (1,0-2,0)	0,025 1,8 (1,1-3,1)
rs3211909 (C)	29,7	30,9	32,3	28,6	0,777	0,535	0,615
rs3211958 (G)	11,1	11,8	11,7	12,3	0,075*	1,0	0,200
rs7755 (A)	15,1	17,3	16,7	17,9	0,488	0,618	0,400

A tabela apresenta as frequências alélicas referentes aos alelos que conferem susceptibilidade à malária cerebral ou aos alelos de menor frequência. Os valores de *P* e os Odds-Ratios referem-se à análise genotípica e foram obtidos por regressão logística sob os modelos a) aditivo ou b) recessivo.

\*Sem equilíbrio de Hardy-Weinberg. Abreviaturas: AR, alelo de referência; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

Estes resultados indicam que todos os polimorfismos associados aumentam o risco de progressão para a malária cerebral. Contudo, à luz dos critérios de interpretação dos diferentes testes de associação entre casos MC e os três grupos controlos, o efeito mais forte destas variantes não se verifica no contexto da doença severa.

### **Análise de *linkage disequilibrium***

Utilizou-se a análise de LD para avaliar o efeito da posição relativa dos SNPs associados a malária cerebral e constatou-se que nove SNPs mapeavam ao longo de uma distância que cobria 74,8 kb na região do gene *CD36*, definindo um bloco de LD que foi quebrado por dois SNPs (rs3211849 e rs7755) (Figura 23). Os dois SNPs que aumentavam o risco de malária cerebral no contexto da malária severa (rs1194182 e rs3211821) distavam um do outro em 45 kb na região do gene *CD36* e encontravam-se num contexto de LD fraco ( $r^2 = 0,4$ ).

A reconstrução haplotípica excluiu os dois SNPs que quebravam o bloco de LD. Utilizando os restantes sete SNPs identificaram-se cinco haplótipos que foram designados por ordem decrescente de frequência de *CD36a* até *CD36e* (Tabela 16). O haplótipo *CD36b* evidenciou associação à malária cerebral ao comparar os casos MC com os controlos MnC ( $P$  simulado = 0,043) e NIF ( $P$  simulado = 0,026). No contexto da malária severa o sinal de associação à malária cerebral revelou-se marginal ( $P$  simulado = 0,072) (Tabela 16). Todavia, o efeito isolado do haplótipo *CD36b* não se mostrou suficientemente forte para ser detectado na estatística global (alínea b da legenda da Tabela 16).

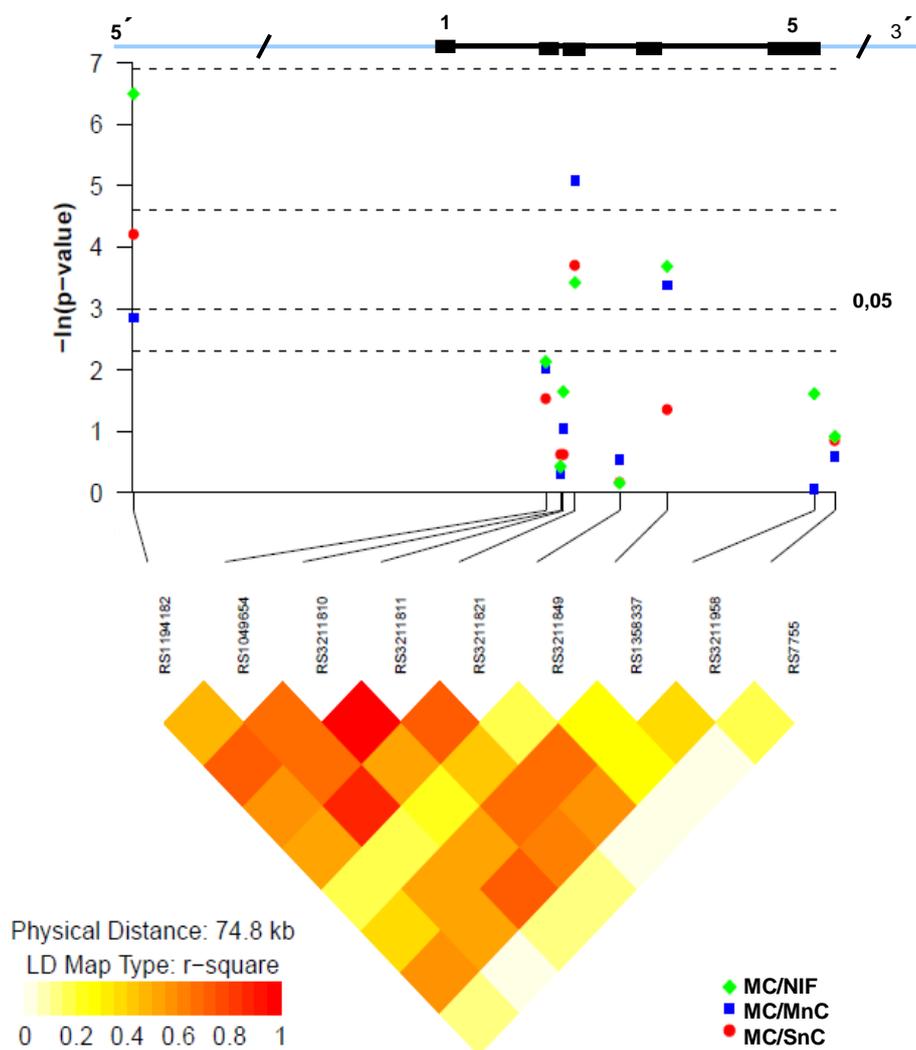


Figura 24. **Testes de associação e análise de LD dos dez SNPs genotipados no gene *CD36*.**

O diagrama representa, no eixo das ordenadas, o logaritmo neperiano do valor de P dos testes de associação dos SNPs enumerados no eixo das abcissas, obtido a partir de análise de regressão logística. Os pontos em vermelho, azul e verde representam os resultados da análise de associação com os SNPs entre os casos de malária cerebral (MC) e os controlos com malária severa não malária cerebral (SnC), malária não complicada (MnC) e não infectados (NIF), respectivamente. A parte superior do diagrama mostra uma representação em escala da estrutura do gene *CD36*: os exões estão representados por caixas e referenciados com o respectivo número. A parte inferior do diagrama representa o LD entre um par de SNPs medido pelo  $r^2$ . A imagem, em baixo e à esquerda, corresponde à escala de cores que representam os valores de LD, desde o amarelo ( $r^2 = 0$ ) até ao vermelho ( $r^2 = 1$ ). Este diagrama é uma adaptação da figura produzida pelo *snp. plotter R package*.

Tabela 16. Associação dos haplótipos do gene *CD36* com os fenótipos da malária.

Haplótipos	Frequência dos haplótipos (%)				Malária Cerebral Versus Controlos P-simulado (Hap-Score)		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	MC/SnC <sup>a</sup>	MC/MnC <sup>b</sup>	MC/NIF <sup>c</sup>
CD36a CATTATA	31,0	36,5	37,6	34,3	0,225	0,137	0,235
CD36b GCTTGCA	26,2	19,5	17,7	19,0	0,072	0,043 (2,04)	0,026 (2,28)
CD36c GATCATA	7,8	5,1	6,7	7,6	0,243	0,521	0,676
CD36d CCGTGCA	8,9	5,5	6,7	7,3	0,321	0,333	0,639
CD36e CATTACA	5,3	7,3	5,8	6,2	0,461	0,753	0,700

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados. Hap-Score, score do haplótipo que representa susceptibilidade (valores positivos) ou resistência (valores negativos). A reconstrução dos haplótipos foi realizada com os marcadores do bloco de LD: rs1194182, rs1049654, rs3211810, rs3211811, rs3211821, rs1358337 e rs3211958. Estão apenas representados os haplótipos com frequência superior a 5%.

a) GSS – *P* simulado = 0,215; MaxST – *P* simulado = 0,314

b) GSS – *P* simulado = 0,215; MaxST – *P* simulado = 0,188

c) GSS – *P* simulado = 0,214; MaxST – *P* simulado = 0,107

O TDT não demonstrou distorção da transmissão do haplótipo CD36b, quer para as crianças com malária cerebral, quer para as crianças com malária não complicada (Tabela 17). Este resultado parece reforçar a ideia da debilidade do efeito genético deste haplótipo na evolução da malária, de acordo com os dados da estatística global anteriormente referenciados.

Tabela 17. Testes de Desequilíbrio de Transmissão com o haplótipo CD36b.

Fenótipo	Número de pares	Observ.	Esper.	Var (O-E)	P
MC	100	50,6	47,4	10,8	0,296
SnC	105	20,8	20,1	5,3	0,750
MnC	100	11,3	14,5	4,2	0,292

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada. Observ, transmissões observadas; Esper, transmissões esperadas; Var (O-E), variância (observada-esperada).

Na população em estudo constatou-se que três SNPs do gene *CD36* aumentavam o risco de progressão para a malária cerebral. Todavia, nenhum destes polimorfismos revelou o efeito exclusivo de distinguir os doentes de malária cerebral dos doentes com outras formas de malária grave. A análise de LD mostrou que a probabilidade dos SNPs associados à malária cerebral serem herdados como um conjunto era baixa. Em consequência, os valores da estatística global da análise haplotípica levaram a concluir que o efeito de associação do haplótipo *CD36b* à malária cerebral era muito modesto. O estudo de transmissão haplotípica, ao não confirmar a distorção da transmissão daquele haplótipo em nenhum dos grupos, designadamente nos casos MC nem indirectamente nos controlos MnC, reforçou a asserção da fraqueza do efeito genético do haplótipo *CD36b*.

Existe bastante heterogeneidade e discordância em estudos realizados em diferentes populações que analisam a associação de variantes genéticas do *CD36* à malária severa, incluindo a malária cerebral [186, 187, 196]. A Figura Suplementar 3 (Apêndices) mostra o mapa de LD ( $r^2$ ) da população HapMap Yoruba da Nigéria, chamando a atenção algumas diferenças com a população do presente estudo.

Os polimorfismos do gene *CD36*, T1264G (rs3211938) e o do exão 10 G1439C+1444delA, foram associados a susceptibilidade à malária grave, incluindo a malária cerebral, na população da Gâmbia. No Quênia observou-se o mesmo tipo de associação, mas apenas em relação ao rs3211938 [186]. No presente estudo, tal como ocorreu em relação à mutação G1439C+1444delA em doentes quenianos, este polimorfismo não foi detectado. O SNP rs3211938 não foi genotipado por dificuldades técnicas. Contudo, o SNP rs3211958 que na população HapMap Yoruba se encontra em completo LD com o rs3211938, não evidenciou associação à malária cerebral no presente estudo.

Na Gâmbia foi realizado um estudo de casos-controlos com 1350 indivíduos com malária severa (malária cerebral e anemia severa), incluindo estudos familiares com 1288 trios (pais-criança), em que foram estudados setenta SNPs do gene *CD36*, incluindo o rs3211938 [189]. Neste estudo não foi encontrada qualquer associação com a malária severa. Nesta mesma publicação,

num estudo mais alargado a outras populações com sessenta e seis grupos étnicos do Quénia, do Malawi, do Gana e da Gâmbia em que foram genotipados 3420 indivíduos, descreve-se que algumas variantes genéticas do *CD36* podem ser expressão da pressão selectiva sobre o genoma humano.



## 4.2.2 Genes com Associação à Malária Severa

### 4.2.2.1 GENE *HBB* (Hemoglobin, beta)

#### A. Associação Genética à Malária

#### A frequência do alelo *HbS* é significativamente menor nos doentes com malária severa

O estudo das frequências alélicas revelou que o alelo *HbS* (alelo T) está muito menos representado nos casos de malária severa (MC=2,7% e SnC=4,6%) do que nos controlos com malária não complicada (MnC) (11,0%) e nos controlos não infectados (NIF) (15,1%) (Tabela 18). Estas diferenças alélicas representam, naturalmente, diferenças nas frequências genótípicas (Tabela 19).

Tabela 18. Frequência dos alelos do dbSNP rs334 nos diferentes grupos.

Alelo	Grupo			
	Frequência %			
	MC (n=121)	SnC (n=142)	MnC (n=141)	NIF (n=304)
T ( <i>HbS</i> )	2,7	4,6	11,0	15,1
A	97,3	95,4	89,0	84,9

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

Tabela 19. Frequência dos genótipos do dbSNP rs334 nos diferentes grupos.

Genótipo	Grupo			
	Frequência %			
	MC (n=121)	SnC (n=142)	MnC (n=141)	NIF (n=304)
AA	97,5	95,8	85,1	73,0
AT	1,7	1,4	8,5	23,7
TT	0,8	2,8	6,4	3,3

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

## **A heterozigotia AS protege contra a malária severa e contra a malária não complicada**

A análise de associação do alelo *HbS* à malária severa foi efectuada em duas etapas:

- a. Todos os doentes com malária cerebral (MC) e com formas de malária severa não cerebral (SnC) foram reunidos num grupo de casos cujo fenótipo era a malária severa e foram comparados com os controlos não infectados (NIF).
- b. Cada sub-fenótipo de malária severa (MC e SnC) foi avaliado de forma independente como grupo de casos e comparado com os controlos NIF. Com esta separação dos casos de malária severa pretendeu-se avaliar o efeito genético do alelo *HbS* em cada sub-fenótipo.

A tabela 20 mostra que o alelo *HbS* tem um forte efeito protector contra a malária severa (OR = 0,22; [0,13-0,30]), isto é, a sua ausência aumenta em 4,5 vezes (1/0,22) o risco de progressão para a malária severa. Comparando com o modelo alélico, a análise genotípica (modelo dominante) demonstra bem a robustez da protecção (OR = 0,15; [0,09-0,27]) conferida pela presença do alelo *HbS* (AT e TT), porquanto a sua ausência (1/0,15) aumenta o risco de progressão para a malária severa em 6,7 vezes. É de realçar que esta protecção se mantém consistente contra qualquer um dos sub-fenótipos de malária severa (MC e SnC), de forma independente.

Para explorar se o alelo *HbS* exercia algum efeito sobre o risco de contrair malária não complicada, os doentes com malária não complicada (MnC) foram comparados com os controlos não infectados (NIF). Constatou-se que com a análise genotípica, sob o modelo dominante, a presença do alelo *HbS* reduz em 50% o risco de contrair malária não complicada (OR=0,50; [0,30-0,84]) (Tabela 20); o mesmo será dizer que a sua ausência (1/0,50) duplica o risco de desenvolver malária não complicada.

Tabela 20. Testes de associação do alelo *HbS* com a malária.

Modelo genético	Casos versus controlos			
	$P$ OR (95% CI)			
	Sev/NIF	MC/NIF	SnC/NIF	MnC/NIF
Alélico	$6 \times 10^{-11}$ 0,22 (0,13-0,36)	0,0009 0,26 (0,11-0,61)	$3 \times 10^{-6}$ 0,31 (0,17-0,54)	0,09
Dominante AT-TT versus AA	$2 \times 10^{-13}$ 0,15 (0,09-0,27)	$1 \times 10^{-9}$ 0,11 (0,04-0,28)	$4 \times 10^{-8}$ 0,19 (0,10-0,38)	0,007 0,50 (0,30-0,84)

Abreviaturas: Sev, malária severa; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

### O alelo *HbS* é muito menos transmitido às crianças com malária severa

O Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) evidenciou uma redução significativa das transmissões do alelo *HbS* (alelo T) às crianças com malária severa ( $P = 0,002$ ) (Tabela 21). Este resultado mostra que a ausência do alelo *HbS* favorece a apresentação clínica da malária, sob a forma de malária severa e reforça o resultado da análise de casos-controlos. Deste modo, torna-se muito remota a possibilidade de se ter produzido um resultado falso positivo, devido a eventual estratificação étnica da população. A análise de TDT efectuada de forma independente para o grupo MC mostrou uma redução significativa das transmissões do alelo *HbS* ( $P = 0,04$ ) que para o grupo SnC foi apenas marginal ( $P = 0,08$ ) (dados não apresentados).

Tabela 21. Teste de Desequilíbrio de Transmissão dos alelos do dbSNP rs334 analisado em 226 pares (mãe-criança) de doentes com malária severa.

Alelo	Observ.	Esper.	Var (O-E)	$P$
T	20	30,4	9,9	0,002
A	432	421,6	9,9	0,002

Abreviaturas: Observ, transmissões observadas; Esper, transmissões esperadas; Var (O-E), variância (observada-esperada).

## B. Alelo *HbS* versus Parasitemia

Apesar de estar amplamente comprovado o efeito protector do alelo *HbS* na malária, permanece o desafio para esclarecer os mecanismos subjacentes a esta protecção. Considerando que, no presente estudo, a presença do *P. falciparum* é a única característica comum a todos os fenótipos de malária e que o papel protector do alelo *HbS* manifesta-se, quer na redução do risco de malária severa, quer na redução do risco de malária não complicada, investigou-se a correlação entre o alelo *HbS* e a parasitemia. Esta análise foi realizada integrando, num só grupo, todos os doentes com malária (MC, SnC e MnC).

### O alelo *HbS* reduz a parasitemia

A figura 25 mostra que os valores das medianas da parasitemia são mais baixos nos doentes com os genótipos do alelo *HbS*, independentemente da forma de apresentação clínica da malária.

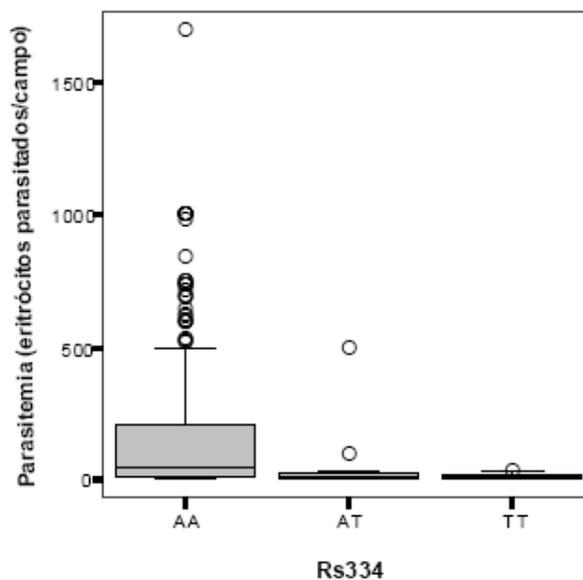


Figura 25. **Genótipos *HbS* (dbSNP rs334) versus parasitemia em todos os doentes com malária.** Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados em cada tipo de genótipo; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às medianas; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e o limite superior o quartil 75%; os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados, excluindo os outliers que são representados por círculos.

Dado que os valores de parasitemia não têm uma distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar se as diferenças observadas nos valores das medianas das parasitemias nos distintos genótipos AA, AT e TT se reflectiam nas médias e se tinham significado estatístico. Estudando 401 doentes com malária, o teste demonstrou que há diferenças entre as médias das parasitemias nos genótipos AA, AT e TT, com um elevado nível de significância ( $P = 7 \times 10^{-5}$ ), igualmente evidenciado com o teste da mediana para parasitemia  $> 38$  eritrócitos parasitados por campo microscópico (EPC) ou  $\leq 38$  EPC ( $P = 4 \times 10^{-5}$ ).

Com o intuito de aferir especificamente o efeito do alelo *HbS* sobre a parasitemia, a análise prosseguiu mantendo-se o fenótipo malária. Foram criadas tabelas de contingência com a variável binária presença ou não do alelo *HbS* e a variável de intervalos parasitemia  $> 38$  EPC ou  $\leq 38$  EPC, definida pelo teste da mediana com o método de Kruskal-Wallis. Com o teste do  $\chi^2$  obteve-se uma associação com um valor de  $P = 5 \times 10^{-6}$ . A presença do alelo *HbS* favorece os valores de parasitemia inferiores a 38 eritrócitos EPC (Tabela 22).

Tabela 22. Avaliação do odds-ratio dos valores de parasitemia nos doentes com malária que têm o alelo *HbS*.

	Odds-ratio	IC 95%
Parasitemia $> 38$ EPC	5.31	1.81-15.6
Parasitemia $\leq 38$ EPC	0.52	0.44-0.61

A figura 26 mostra que mesmo separando os doentes em dois grupos distintos, designadamente de malária não complicada e de malária severa (MC e SnC), é evidente a tendência para valores mais baixos de parasitemia nos doentes com os genótipos AT e TT.

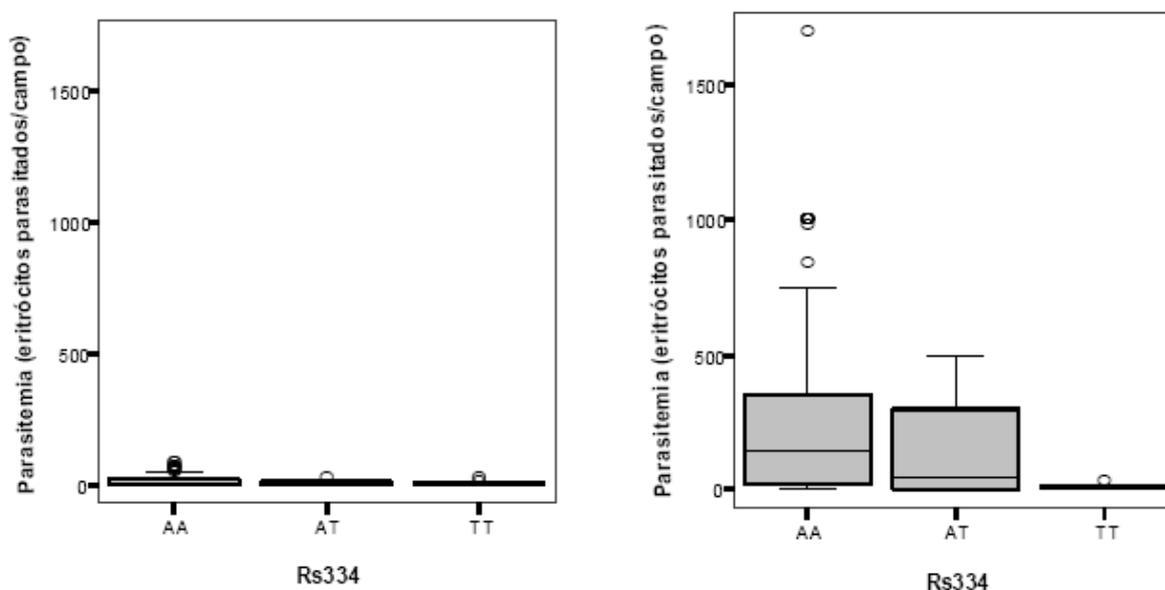


Figura 26. **Genótipos *HbS* (dbSNP rs334) versus parasitemia nos doentes com malária não complicada (esquerda) e com malária severa (direita).** Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados em cada tipo de genótipo; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às medianas; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e o limite superior o quartil 75%; os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados, excluindo os outliers que são representados por círculos.

No presente estudo demonstrou-se não só o forte efeito protector do alelo *HbS* contra as formas severas de malária, mas também o seu menor efeito protector contra a malária não complicada. Num estudo realizado em Luanda com crianças com vários fenótipos de malária, verificou-se uma tendência de associação entre a menor gravidade da malária e a homozigotia SS [319].

Num artigo de revisão do *British Medical Journal* publicado em 1954, Allison refere-se ao facto de que Beet em 1946 já tinha constatado uma ocorrência significativamente menor de malária entre os indivíduos portadores do alelo *HbS* (9,8%) comparativamente aos não portadores (15,3%) no Zimbabwe, à data no distrito de Balovale na Rodésia do Norte [94]. Estudos realizados no Quênia reportam-se ao efeito protector do alelo *HbS* nas diferentes formas de apresentação clínica da malária, conferindo uma protecção de 50% contra a malária não complicada e de quase 90% contra a malária severa [121, 128]. O

forte efeito protector do alelo *HbS* contra a malária severa não se diluiu, apesar da diversidade étnica da população da Gâmbia, num estudo de associação à escala genómica (GWAS) de malária severa, publicado em Junho de 2009. Este estudo incluiu 1500 controlos que eram recém-nascidos e 1060 casos com formas distintas de malária severa: malária cerebral, anemia severa e distress respiratório [158].

A eficácia do TDT para a confirmação do efeito protector do alelo *HbS* na malária severa, demonstrado no presente estudo de associação de casos-controlos, foi igualmente valorizada num estudo de casos-controlos com TDT efectuado na Gâmbia (315 casos de malária cerebral e de anemia severa da malária e 583 amostras controlo de sangue do cordão umbilical) [320].

A frequência do alelo *HbS* de 15,1% encontrada na população controlo de crianças não infectadas do presente estudo, é semelhante à da amostra HapMap Yoruba (Nigéria) em que a frequência é de 12,5%, apesar de se registarem frequências que ultrapassam os 20% em estudos realizados no Gabão [321, 322].

A evidência observada no presente estudo, que o alelo *HbS* reduz a parasitemia nos doentes com malária, corrobora a constatação a que Allison também se referiu por se ter observado uma menor densidade parasitária em crianças do Gana com o alelo *HbS*, num estudo de incidência de parasitemia de 290 crianças com idades entre os 5 meses e os 5 anos [94]. Este mesmo efeito de redução da parasitemia pelo alelo *HbS* foi igualmente descrito num estudo de casos-controlos de anemia severa na região ocidental do Quénia, sendo esta uma região de alta transmissão perene, como é o caso de Luanda [121].



### 4.2.3 Outros Genes com Associação à Malária Severa

O estudo de associação com os genes candidatos cujos resultados serão apresentados nesta subsecção focou-se especialmente nos polimorfismos com associações descritas à malária severa, incluindo a malária cerebral. O objectivo da análise destes genes é comparar os resultados obtidos na população do presente estudo, com os obtidos noutras populações de áreas endémicas de malária.

No caso do gene *NOS2* optou-se por um estudo mais extenso cobrindo-o densamente, tendo sido estudados trinta e um SNPs. Os genes estudados com o intuito de replicação de associações publicadas à malária severa foram os seguintes: *NOS2* (*Nitric oxide synthase 2, inducible*), *IFNAR1* [*Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1*], *IL10RB* (*Interleukin 10 receptor, beta*), *TLR4* (*Toll-like receptor 4*), *HP* (*Haptoglobin*), *MBL2* [*Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)*], *PECAM 1* (*Platelet-endothelial cell-adhesion molecule, CD31*), *ICAM 1* (*Intracellular adhesion molecule 1, CD54*), *ICAM 4* (*Intracellular adhesion molecule 4*), *ICAM 5* (*Intracellular adhesion molecule 5*), *TNF* (*Tumor necrosis factor*) e *CR1* (*Complement receptor 1*).

A análise de casos-controlos seguiu a mesma metodologia para os SNPs individuais, comparando os casos MC com os controlos SnC, MnC e NIF, pesquisando sinais de associação à malária cerebral. Contudo, ao estudar as diferenças nas frequências alélicas entre os diferentes grupos, foi constatado que para alguns SNPs as diferenças justificavam a análise de associação comparando os doentes com malária severa não cerebral (SnC) com os controlos MnC e/ou NIF. Verificou-se que alguns SNPs também mostravam sinais de associação à malária severa não cerebral. Deste modo, sempre que se verificasse adicionalmente associação à malária severa não cerebral ao comparar os doentes SnC com os controlos NIF, reuniam-se todos os doentes com malária severa (MC e SnC) num só grupo e efectuava-se a análise de casos-controlos comparando com os controlos NIF. Os sinais de associação que fossem detectados nesta análise de casos (malária severa) *versus* controlos (não infectados - NIF) seriam classificados como factores de malária severa.

Com esta metodologia pretendeu-se: i) assegurar a especificidade dos factores de susceptibilidade/resistência à malária cerebral anteriormente referidos e ii) identificar factores de susceptibilidade/resistência à malária severa.

No presente estudo constatou-se associação entre SNPs dos genes *NOS2*, *IFNAR1*, *HP* e *PECAM1* e a malária severa, reproduzindo-se assim algumas associações já conhecidas. Pelo contrário, os polimorfismos dos genes *CR1*, *TNF*, *TLR4*, *MBL2*, *ICAM 1*, *4* e *5* e *IL10RB* não evidenciaram associação à malária cerebral nem à malária severa.

#### **4.2.3.1 GENE *NOS2* (*Nitric oxide synthase 2, inducible*)**

Dos trinta e dois SNPs genotipados cobrindo 46 kb da região do gene *NOS2* (Tabelas Suplementares A e B), vinte e um observaram os critérios de qualidade de genotipagem.

Ao comparar as frequências alélicas e genotípicas dos casos MC com os controlos SnC constatou-se que o alelo T do SNP rs3730013 aumenta o risco específico de progressão para a malária cerebral ( $P = 0,037$ ) (Tabela 22). Em complemento, é de realçar que este SNP evidencia associação ao comparar os doentes SnC com os controlos NIF, diminuindo o risco de malária severa não cerebral ( $P = 0,004$ ; OR = 0,63 [0,45-0,87] - estes dados não constam da tabela). A constatação deste efeito de protecção contra a malária severa não cerebral reforça o efeito específico deste alelo na evolução clínica da doença severa, favorecendo a malária cerebral e protegendo de outras formas severas não cerebrais.

Os SNPs rs3729508, rs3730017, rs6505469 e rs16966563 evidenciaram sinais de associação ao comparar os casos MC com os controlos MnC diminuindo o risco de malária cerebral (Tabela 22). Todavia, é interessante sublinhar que sendo o SNP rs16966563 o que revelou o efeito genético mais forte de protecção contra a malária cerebral ( $P = 0,0005$ ; OR = 0,42 [0,25-0,69]), também revelou associação ao comparar os doentes SnC com os controlos MnC, conferindo protecção marginal contra a malária severa não cerebral ( $P = 0,04$ ; OR = 0,62 [0,39-0,99] – dados que não constam da tabela). Estes resultados sugerem que,

contrariamente aos polimorfismos rs3729508, rs3730017 e rs6505469 que no contexto da malária protegem apenas contra a malária cerebral, o SNP rs16966563 poderá ser um factor de resistência à malária severa. Ao comparar os casos MC com os controlos NIF, os SNPs rs11653716, rs9282799 e rs16966563 evidenciaram associação à malária cerebral diminuindo o risco desta complicação (Tabela 23). Os dois primeiros SNPs não revelaram qualquer outro tipo de associação, contrariamente ao rs16966563 conforme já fora referenciado acima.

Tabela 23. Polimorfismos mononucleotídicos (SNPs) analisados no gene *NOS2*.

Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Testes de Associação		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	P Odds-ratio (IC 95%)		
					MC/SnC <sup>a</sup>	MC/MnC <sup>c</sup>	MC/NIF <sup>c</sup>
rs11653716 (G)	29,1	34,3	35,8	36,1	0,200	0,074	0,011 0,58 (0,39-0,89)
rs3794756 (T)	9,5	10,6	7,3	9,6	0,694	0,806	0,667
rs3729727 (A)	21,7	18,1	21,1	22,3	0,295	0,915	0,859
rs3729507 (C)	10,1	10,2	7,7	10,8	0,965	0,610	0,479
rs8068149 (G)	41,1	42,6	50,0	46,6	0,897	0,148	0,767
rs2297513 (T)	22,4	19,5	21,3	21,7	0,414	0,786	0,626
rs2872753 (G)	39,9	41,7	47,2	39,5	0,851	0,124	0,760
rs9282801 (T)	29,1	26,0	25,0	30,1	0,393	0,213	0,848
rs3729720 (T)	7,1	7,3	4,2	6,8	*	0,089	0,756
rs4239250 (G)	19,3	19,9	15,5	22,0	0,633	0,306	0,434
rs16966545 (A)	19,4	21,9	15,6	22,0	0,476	0,302	0,460
rs4795067 (G)	17,9	19,1	13,5	19,1	0,547	0,211	0,257

(continua)

Tabela 23. (Continuação)

Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Testes de Associação		
	MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)	P Odds-ratio (IC 95%)		
					MC/SnC <sup>a</sup>	MC/MnC <sup>c</sup>	MC/NIF <sup>c</sup>
rs3729508 (A)	15,7	18,7	21,6	15,2	0,363	0,050 0,60 (0,36-1,0)	0,800
rs3730017 (T)	20,5	22,7	27,1	23,6	0,544	0,015 0,55 (0,33-0,89)	0,212
rs6505469 (T)	13,7	15,3	19,4	14,0	0,595	0,036 0,57 (0,34-0,97)	0,849
rs16966563 (C)	18,5	23,5	28,2	24,0	0,176	0,0005 0,42 (0,25-0,69)	0,026 0,62 (0,39-0,99)
rs3794766 (T)	18,4	20,3	13,1	19,0	0,587	0,118	0,681
rs3730013 (T)	26,9	19,7	25,0	28,6	0,037 1,54 (1,02-2,33)	0,672	0,987
rs6505483 (A)	21,9	25,8	18,6	22,6	0,261	0,571	0,983
rs9282799 (T)	2,0	3,3	4,6	5,7	*	*	0,014 0,34 (0,13-0,89)
rs11080358 (A)	22,4	23,7	23,0	20,7	0,743	0,499	0,616

A tabela apresenta as frequências alélicas referentes aos alelos que conferem susceptibilidade à malária cerebral ou aos alelos de menor frequência. Os valores de *P* e os Odds-Ratios referem-se à análise genotípica e foram obtidos por regressão logística sob os modelos a) aditivo ou c) dominante. \*Sem equilíbrio de Hardy-Weinberg. Abreviaturas: AR, alelo de referência; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

Os resultados do TDT evidenciam o efeito protector dos SNPs rs11653716, rs3730017 e rs1696653 contra a malária cerebral pela demonstração de uma significativa redução da transmissão dos alelos protectores a 102 doentes com malária cerebral (Tabela 24). O efeito do alelo T do SNP rs3730013, que aumenta o risco de progressão para a malária cerebral e que protege contra a malária severa não cerebral, só foi possível demonstrar através da significativa redução da transmissão esperada para os doentes com malária severa não cerebral ( $P = 0,044$ ), porquanto nas crianças com malária cerebral não se observou o esperado aumento de transmissões ( $P = 0,158$ ). O alelo T do SNP rs9282799, que protege

contra a malária cerebral, é de muito baixa frequência (3%) nos pares mãe-criança afectada, não surpreendendo portanto o baixo número de transmissões observadas e a ausência de associação. O efeito protector dos SNPs rs372950 e rs6505469 contra a malária cerebral não se confirmou, estudando a transmissão alélica para as crianças com malária cerebral, nem indirectamente para as crianças com malária não complicada (Tabela 24).

Tabela 24. Testes de Desequilíbrio de Transmissão dos alelos de SNPs do gene *NOS2* associados à malária cerebral.

SNP/Alelo	Fenótipo	Número de pares	Observ.	Esper.	Var (O-E)	P
rs3729508 (A)	MC	102	31	30,1	7,7	0,713
	MnC	106	46	44,7	10,9	0,702
rs11653716 (G)	MC	102	59	68,5	13,7	0,017
rs3730017 (T)	MC	102	40	47,3	10,8	0,043
rs6505469 (T)	MC	102	27	25,3	6,3	0,513
	MnC	106	40	40,4	9,9	0,899
rs16966563 (C)	MC	102	36	43,8	10,9	0,022
	SnC	111	52	52,0	12,5	0,982
rs3730013 (T)	MC	102	56	51,3	10,0	0,158
	SnC	111	45	52,2	10,5	0,044
rs9282799 (T)	MC	102	5	5,5	1,73	0,724

Abreviaturas: MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada. Observ., transmissões observadas; Esper., transmissões esperadas; Var (O-E), variância (observada-esperada).

A análise do *linkage disequilibrium* do gene *NOS2* na população em estudo revelou valores de LD muito baixos ( $r^2 < 0,5$ ), excepto para os SNPs rs3730017 e rs16966563 que se encontram em forte LD ( $r^2 > 0,9$ ). O estudo haplotípico foi inviabilizado pelo fraco nível de LD verificado, que sugeria a inexistência de uma estrutura haplotípica (Figura 27).

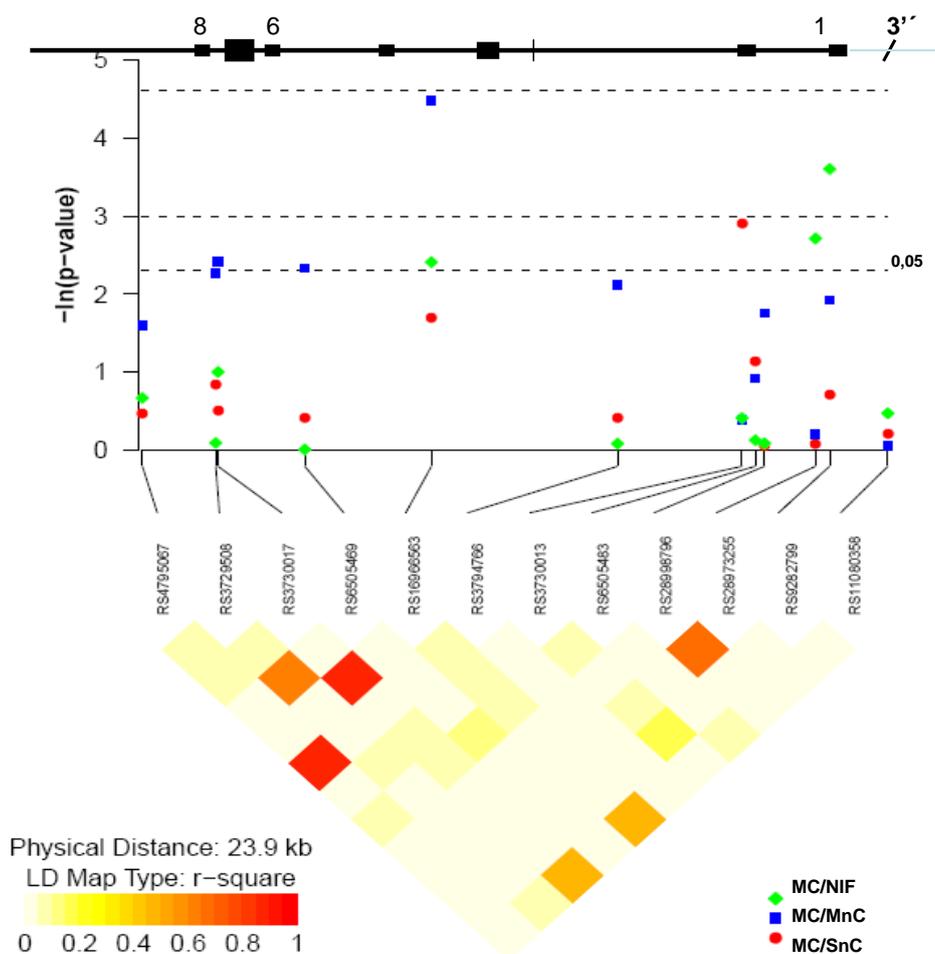


Figura 27. **Testes de associação e análise de LD de doze SNPs genotipados no gene NOS2.** O diagrama representa, no eixo das ordenadas, o logaritmo neperiano do valor de P dos testes de associação dos SNPs enumerados no eixo das abcissas, obtido a partir de análise de regressão logística. Os pontos em vermelho, azul e verde representam os resultados da análise de associação com os SNPs entre os casos de malária cerebral (MC) e os controlos com malária severa não malária cerebral (SnC), malária não complicada (MnC) e não infectados (NIF), respectivamente. A parte superior do diagrama mostra uma representação em escala da estrutura do gene: os exões estão representados por caixas e referenciados com o respectivo número. A parte inferior do diagrama representa o LD entre um par de SNPs medido pelo  $r^2$ . A imagem, em baixo e à esquerda, corresponde à escala de cores que representam os valores de LD, desde o amarelo ( $r^2 = 0$ ) até ao vermelho ( $r^2 = 1$ ). Este diagrama é uma adaptação da figura produzida pelo *snp. plotter R package*.

Ficou demonstrado que na população em estudo, sete dos vinte e um polimorfismos analisados no gene *NOS2* exercem efeitos individuais, controlando a evolução clínica da malária severa. Todavia, a análise de LD mostrou que a posição relativa dos SNPs no gene torna altamente improvável a co-herança dos marcadores em estudo. Esta constatação levanta a possibilidade de que os SNPs que demonstraram associação tenham constituído o papel crítico deste gene na resposta à infecção por *Plasmodium* e que representem efeitos individuais e independentes de variantes do gene *NOS2* na evolução clínica da malária. O mapa de LD na mesma região do gene *NOS2* na população Yoruba da Nigéria estudada pelo projecto HapMap é semelhante ao da população do presente estudo, contrariamente ao que se verifica comparando com a população Luhya do Quênia do projecto HapMap (Figura Suplementar 4 - Apêndices).

Os estudos realizados para esclarecer o papel do óxido nítrico na malária cerebral têm revelado resultados muito diferentes e frequentemente contraditórios. Estas contradições vão desde a descrição de efeitos parasiticidas dos metabolitos plasmáticos do óxido nítrico na malária severa, correlacionados negativamente com a idade [323], até aos estudos de associação genética com diferentes variantes do gene *NOS2* [210, 324, 325].

Os estudos de associação genética que envolvem variantes do *NOS2* têm tido em vista correlacionar a enzima iNOS2 com a produção do óxido nítrico [326] que tem acção vasodilatadora, mas cujo efeito parasiticida contra o *P. falciparum* não foi ainda completamente reconhecido [327, 328].

O SNP rs1800482 (*NOS2A-954C*) que no Gabão foi descrito como um factor protector contra a malária severa [209], que não se confirmou num estudo realizado na Tanzânia [211], revelou-se monomórfico para o alelo G na população do presente estudo. O papel protector contra a malária cerebral do SNP rs9282799 (*NOS2C-1173T*), da região promotora do gene *NOS2A*, observado no presente estudo, já fora anteriormente descrito na Tanzânia [211]. Apesar de, na população em estudo, não ter sido possível confirmar a distorção da transmissão alélica deste SNP, o seu efeito funcional foi demonstrado em crianças tanzanianas, uma vez que em condições de jejum prolongado aquele

polimorfismo mediava o aumento das concentrações plasmáticas e urinárias de metabolitos do óxido nítrico [211].

Apesar desta controvérsia, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a necessidade de um conhecimento mais aprofundado do quadro completo da variação genética no *locus* do *NOS2*, para uma avaliação mais precisa da importância, quer do óxido nítrico, quer das variantes genéticas do *NOS2* na malária severa.

#### **4.2.3.2 GENE *IFNAR1* [Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1]**

Analisaram-se cinco SNPs do gene *IFNAR1* que tinham sido associados a um maior risco de malária severa, incluindo a malária cerebral, num estudo que incluía população da Gâmbia, do Quênia e do Vietname [252] (Tabelas Suplementares A e B - Apêndices). O polimorfismo rs2243594 foi o único excluído da análise, por ter tido uma baixa taxa de genotipagem.

Ao efectuar a análise de casos-controlos MC/SnC e MC/NIF nenhum dos quatro SNPs analisados no gene *IFNAR1* mostrou sinais de associação (dados não mostrados). Contudo, ao comparar os casos MC com os controlos MnC, os SNPs 268710 (*g-a*), rs2843710 e o 279923 (*c-t*) evidenciaram associação, diminuindo o risco de malária cerebral (Tabela 25). É de realçar que estes SNPs mostraram o mesmo tipo de associação ao comparar os doentes SnC com os controlos MnC, o que sugere que estes polimorfismos são factores de risco de malária severa. Contudo, nenhum destes polimorfismos mostrou distorção da transmissão alélica (dados não apresentados).

Importa salientar que no presente estudo, os alelos de menor frequência dos três SNPs que diminuem o risco de malária severa têm uma frequência que varia entre 27 e 31% na população controlo não infectada (NIF). Na base de dados dbSNP126 não há registo da frequência destes SNPs na população da África subsaariana.

Tabela 25. Polimorfismos mononucleotídicos (SNPs) dos genes *IFNAR1*, *HP* e *PECAM1* associados à malária severa.

Gene	Referência dbSNP (AR)	Casos versus Controlos							
		Frequência do alelo de referência (%)				Sev/ NIF	P Odds-ratio IC 95%	MC/ MnC	SnC/ MnC
		MC (n=130)	SnC (n=158)	MnC (n=142)	NIF (n=319)				
IFNAR1	268710(g-a) (G)	29,0	30,0	37,0	27,9	0,533 <sup>a</sup>	0,047 <sup>a</sup> 0,68 (0,47-1,0)	0,020 <sup>c</sup> 0,58 (0,36-0,92)	
	rs2843710 (G)	28,1	28,6	36,6	27,0	0,604 <sup>a</sup>	0,032 <sup>a</sup> 0,59 (0,37-0,96)	0,012 <sup>c</sup> 0,55 (0,35-0,88)	
	279923(c-t) (T)	28,8	29,9	38,0	28,5	0,735 <sup>a</sup>	0,027 <sup>a</sup> 0,67 (0,46-0,96)	0,025 <sup>c</sup> 0,59 (0,37-0,94)	
HP	rs5471 (C)	9,7	11,3	8,9	7,3	0,038 <sup>c</sup> 1,57 (1,02-2,42)	0,852 <sup>c</sup>	*	
PECAM 1	rs668 (G)	33,9	31,2	42,9	34,9	0,391 <sup>a</sup>	0,038 <sup>a</sup> 0,70 (0,50-0,98)	0,004 <sup>a</sup> 0,62 (0,44-0,86)	

A tabela apresenta as frequências alélicas referentes aos alelos de menor frequência. Os valores de *P* e os Odds-Ratios referem-se à análise genotípica e foram obtidos por regressão logística sob os modelos a) aditivo ou c) dominante. \*Sem equilíbrio de Hardy-Weinberg. Abreviaturas: AR, alelo de referência; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados; Sev, malária severa.

Neste trabalho, o estudo dos efeitos individuais de polimorfismos do gene *IFNAR1* na susceptibilidade/resistência à malária severa evidenciou que o alelo mutante de três SNPs protege contra a progressão para a malária severa, exclusivamente ao comparar os casos de malária severa (MC e SnC) com os controlos com malária não complicada (MnC). No estudo de casos-controlos realizado com populações do Quênia e da Gâmbia, em que os controlos eram indivíduos sem malária, concluiu-se que, no modelo dominante, o alelo mutante destes SNPs conferia susceptibilidade à malária severa [252]. O facto de se ter obtido na população do presente estudo sinais de associação à malária severa opostos aos descritos no Quênia e na Gâmbia, deve merecer uma interpretação cuidada. Por um lado, a mera observação das frequências dos alelos de menor

frequência destes SNPs nos grupos controlos MnC e NIF faz ressaltar a sua maior representatividade nos controlos MnC (Tabela 25). Por outro lado, é de realçar que o efeito genético de redução do risco de malária severa detectado no presente estudo, foi constatado já no contexto da malária, isto é, ao comparar os casos MC com os controlos MnC; a comparação com os controlos não infectados não registou nenhuma associação. Da interpretação dos resultados, no seu todo, pode-se inferir que, na população em estudo, que reside numa área de endemicidade estável, estes polimorfismos parecem exercer um efeito genético duplo sobre a malária e poderão exercer um efeito no modo de progressão da doença. Por um lado, a diferença nas frequências alélicas destes SNPs entre os doentes do grupo MnC e os controlos NIF parece sugerir que estes SNPs podem aumentar o risco de contrair malária não complicada e, por outro lado, já no contexto da malária, protegem contra a progressão para a malária severa. Todavia, a não confirmação de distorção da transmissão alélica para estes polimorfismos limita esta argumentação.

Embora não exista uma relação comprovada entre a patogénese da malária e os interferões do tipo 1, estudos realizados com modelos murinos de malária sugeriram que o interferão alfa pode inibir a fase eritrocítica da malária provocada pelo *P. yoelii*, através da inibição da produção de reticulócitos [254]. Os estudos funcionais destes polimorfismos do gene *IFNAR1* associados à malária severa poderão contribuir para o esclarecimento do papel dos interferões de tipo 1 na malária.

#### **4.2.3.3 GENE *HP* (*Haptoglobin*)**

Os SNPs rs5471 e rs5470, localizados na região promotora do gene *HP*, foram genotipados na população em estudo (Tabelas Suplementares A e B - Apêndices). Comparando todos os doentes com malária severa com os controlos NIF, o SNP rs5470 (C-101G) estava fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto que o SNP rs5471 (A-61C) evidenciou associação à malária severa, aumentando o risco desta complicação (Tabela 25).

#### **4.2.3.4 GENE *PECAM 1* (*Platelet-endothelial cell-adhesion molecule, CD31*)**

O único polimorfismo genotipado neste gene, o rs668 (Tabela Suplementar A - Apêndices), revelou associação à malária cerebral, ao comparar os casos MC com os controlos MnC, demonstrando um efeito protector (Tabela 25). Este efeito também foi observado ao comparar as frequências genotípicas dos doentes SnC com os controlos MnC (SnC/MnC  $P = 0,004$ ; OR = 0,62 [0,44-0,86]) (Tabela 25). Conclui-se assim que, no contexto da malária, este SNP protege contra a doença severa. Curiosamente, o efeito protector do rs668 detectado no presente estudo contra a malária severa, é sobreponível ao observado numa área não endémica da Índia. Neste estudo, a associação era dependente da endemicidade, sendo o alelo G um factor de risco aumentado de malária na área endémica e protector na área não endémica [196].

#### **4.2.3.5 Outros genes que não revelaram associação**

Nenhum dos polimorfismos estudados nos restantes genes evidenciou associação à malária severa, designadamente *CR1*, *TNF*, *TLR4*, complexo *ICAM* (1,4 e 5) e *IL10RB* (Tabela 26 e Tabela Suplementar A - Apêndices).

Tabela 26. Polimorfismos mononucleotídicos (SNPs) dos genes *CR1*, *TNF*, *TLR4*, *MBL2*, *ICAM 1, 4 e 5* e *IL10RB* não associados à malária severa.

GENE	Referência dbSNP (AR)	Frequência do alelo de referência (%)				Casos <i>versus</i> controlos <i>P</i>		
		MC	SnC	MnC	NIF	MC/SnC	MC/MnC	MC/NIF
		(n=130)	(n=158)	(n=142)	(n=319)			
CR1	rs17047660	28,1	28,3	32,6	26,3	0,600	0,245	0,803
	rs17047661	26,6	29,5	23,2	27,5	0,838	0,496	0,803
TNF	rs1800629	10,9	10,7	13,4	13,1	0,666	0,140	0,182
	rs3093662	7,8	11,8	9,9	11,3	0,152	0,644	0,163
TLR4	rs4986790	7,1	7,1	7,6	5,6	0,700	0,554	0,606
MBL2	rs1800451	17,3	19,0	19,9	18,8	0,658	0,419	0,473
ICAM1	rs5030351	23,8	23,2	29,2	25,3	0,510	0,247	0,756
	rs5491	25,0	24,2	30,0	26,0	0,397	0,346	0,987
	rs281432	23,0	27,0	22,8	25,0	0,157	0,53	0,746
ICAM4	rs5498	16,0	19,9	11,4	15,8	0,938	0,320	0,646
	rs3093030	7,8	6,3	2,5	5,4	0,490	*	*
ICAM5	rs5496	10,3	13,2	11,5	11,3	0,372	0,741	*
	rs281438	39,9	42,4	38,3	37,7	0,572	0,742	0,400
	rs11575074	7,6	7,7	6,9	8,3	0,779	0,616	0,861
IL10RB	rs3171425	28,1	29,1	34,2	26,7	*	0,126	0,593
	rs1058867	28,1	29,5	34,2	26,9	*	0,126	0,622

A tabela apresenta as frequências alélicas referentes aos alelos de menor frequência. Os valores de *P* e os Odds-Ratios referem-se à análise genotípica e foram obtidos por regressão logística sob o modelo dominante. \*Sem equilíbrio de Hardy-Weinberg. Abreviaturas: AR, alelo de referência; MC, malária cerebral; SnC, malária severa não cerebral; MnC, malária não complicada; NIF, não infectados.

### 4.3 Interacção Génica

A detecção de sinais de associação entre a malária cerebral e SNPs de alguns genes, motivou a investigação de eventual interacção entre polimorfismos de genes diferentes. A demonstração de um efeito significativo de interacção entre dois SNPs associados à malária cerebral terá consequências no risco epidemiológico de progressão desta complicação grave da malária; a presença de interacção significa que o efeito combinado dos genótipos de risco dos dois SNPs é maior do que a soma dos seus efeitos individuais.

Atendendo a que o objectivo principal deste trabalho foi discernir factores genéticos que especificam formas cerebrais de formas não cerebrais de malária severa, a análise de interacção centrou-se unicamente nos SNPs associados nos testes efectuados comparando os casos de malária cerebral com os controlos de malária severa não cerebral.

A Tabela 27 mostra os resultados estatisticamente significativos do estudo de interacção *génica*, entre genes diferentes, obtidos com a análise de regressão logística, efectuada para cada par de SNPs associados à malária cerebral.

No presente estudo não se verificou qualquer interacção entre o rs334 (alelo *HbS*) e os SNPs associados à malária cerebral (dados não mostrados).

Verifica-se que a presença simultânea dos genótipos de risco de malária cerebral do SNP rs8139532 do gene *HMOX1* e de um dos quatro SNPs assinalados do gene *TGFB2*, igualmente associados a um maior risco de malária cerebral, aumenta significativamente o risco de progressão para a malária cerebral. É interessante realçar, por um lado, que o SNP do gene *HMOX1* que interage com os SNPs do gene *TGFB2* é um dos polimorfismos que integra o bloco de LD do *HMOX1* com um valor de  $r^2 > 0,9$ . Por outro lado, o rs9622194, que também integra o bloco de LD do gene *HMOX1*, embora com um valor inferior de  $r^2$  e que no estudo de casos-controlos revelou uma associação marginal à malária cerebral ( $P = 0,063$ ), também revelou sinais de interacção com SNPs do gene *NOS2*, designadamente o rs16966563 e o rs3730017, factores de resistência à malária cerebral.

Tabela 27. **Interacção entre SNPs dos genes *HMOX1*, *TGFB2* e *NOS2A* associados à malária cerebral.**

GENE	GENE	HMOX1	
	Referência dbSNP	rs8139532	rs9622194
TGFB2	rs1418553	0,038	NS
	rs4846478	0,013	NS
	rs6657275	0,033	NS
	rs6684205	0,039	NS
NOS2	rs16966563	NS	0,004
	rs3730017	NS	0,029

A tabela apresenta os resultados da interacção dos SNPs de genes associados à malária cerebral, exclusivamente ao comparar os casos de malária cerebral com os controlos SnC. NS, não significativo.

No presente estudo, ao investigar a interacção entre SNPs individuais associados à malária cerebral nos testes que comparam os casos de MC com os controlos SnC, detectaram-se sinais que evidenciam interacção entre pares de loci associados à malária cerebral, designadamente entre os genes *HMOX1* e *TGFB2* e entre os genes *HMOX1* e *NOS2*. Estas relações, entre SNPs com sinais de associação à malária cerebral, parecem reflectir apenas uma pequena parte da complexa arquitectura genética da malária cerebral, como fenótipo complexo. Todavia, a extrapolação biológica destes resultados seria meramente especulativa, sobretudo atendendo ao facto de se desconhecer se tais polimorfismos exercem algum efeito funcional que interfira com a actividade dos genes. As evidências de que o rs9622194 e os dois SNPs do gene *NOS2* exercem efeitos contrários no risco de progressão para a malária cerebral e que os SNPs do gene *NOS2* estão associados à malária cerebral apenas ao comparar os casos de MC com os controlos com malária não complicada (MnC) cria

limitações à interpretação dos sinais de interacção encontrados entre estes polimorfismos.

Tanto quanto se sabe, estes resultados não foram ainda descritos em estudos de associação à malária cerebral e podem contribuir para desvendar a íntima relação de vários factores genéticos no potencial desenvolvimento da fisiopatologia da malária cerebral, atestando assim a teoria poligénica da base de susceptibilidade/resistência nas doenças comuns. De qualquer modo, em face da dimensão da amostra do presente estudo, é essencial a realização de futuros estudos de replicação em amostras independentes de maior dimensão, bem como de estudos funcionais que levem à compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes não só à associação das variantes genéticas individuais à malária cerebral, mas também das interacções entre os diferentes *loci*.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

---

A concepção deste estudo fundamentou-se na variação fenotípica da infecção por *P. falciparum*, focando-se essencialmente no extremo fenotípico de maior gravidade, a malária severa. A multiplicidade de síndromas de malária severa mostrou-se adequada à sua dissecação, permitindo assim seleccionar e centrar o estudo na síndrome de malária cerebral. Contudo, não raramente, os estudos de malária severa consideram as suas diferentes síndromas no seu conjunto, tornando difícil a distinção dos vários grupos de doentes em função da coexistência das complicações clínicas. Este estudo procurou utilizar critérios quantitativos, tais como os valores de hemoglobina, a quantificação da parasitemia, a graduação do coma com o uso de escalas padronizadas, que contribuíram para a objectividade dos critérios clínicos e para a definição dos diferentes fenótipos de malária severa. Todavia, a imprevisível evolução clínica de cada doente não se harmoniza com a rigidez dos critérios clínicos de inclusão. O coma, com incapacidade de localização de estímulos dolorosos intensos, não atribuível ao período pós-convulsivo, constitui um critério importante para uma boa delimitação das fronteiras de severidade da malária e da definição da malária cerebral, uma vez excluídas as outras causas mais comuns de encefalopatia.

As diferenças significativas encontradas nas frequências alélicas e genotípicas, em certos polimorfismos de alguns genes estudados, ao comparar os casos de malária cerebral com os controlos com malária grave não cerebral, constituem o resultado mais eloquente da pertinência deste estudo e em parte contribuem para explicar a diversidade fenotípica da apresentação clínica da malária severa. A importância de se terem incluído no desenho do estudo dois grupos controlos adicionais, doentes com malária não complicada e crianças assintomáticas não infectadas, viria a revelar-se na sua necessidade para a definição da especificidade dos factores de risco da malária cerebral. Deste modo, os resultados obtidos nesta tese sublinham o valor da utilização de um estudo centrado numa forma clínica de malária, como é o caso da malária cerebral, comparando-a com uma variedade de outros fenótipos clínicos de malária, como

forma de identificar factores genéticos que intervêm em patamares específicos da evolução fisiopatológica da malária (Figura 28).

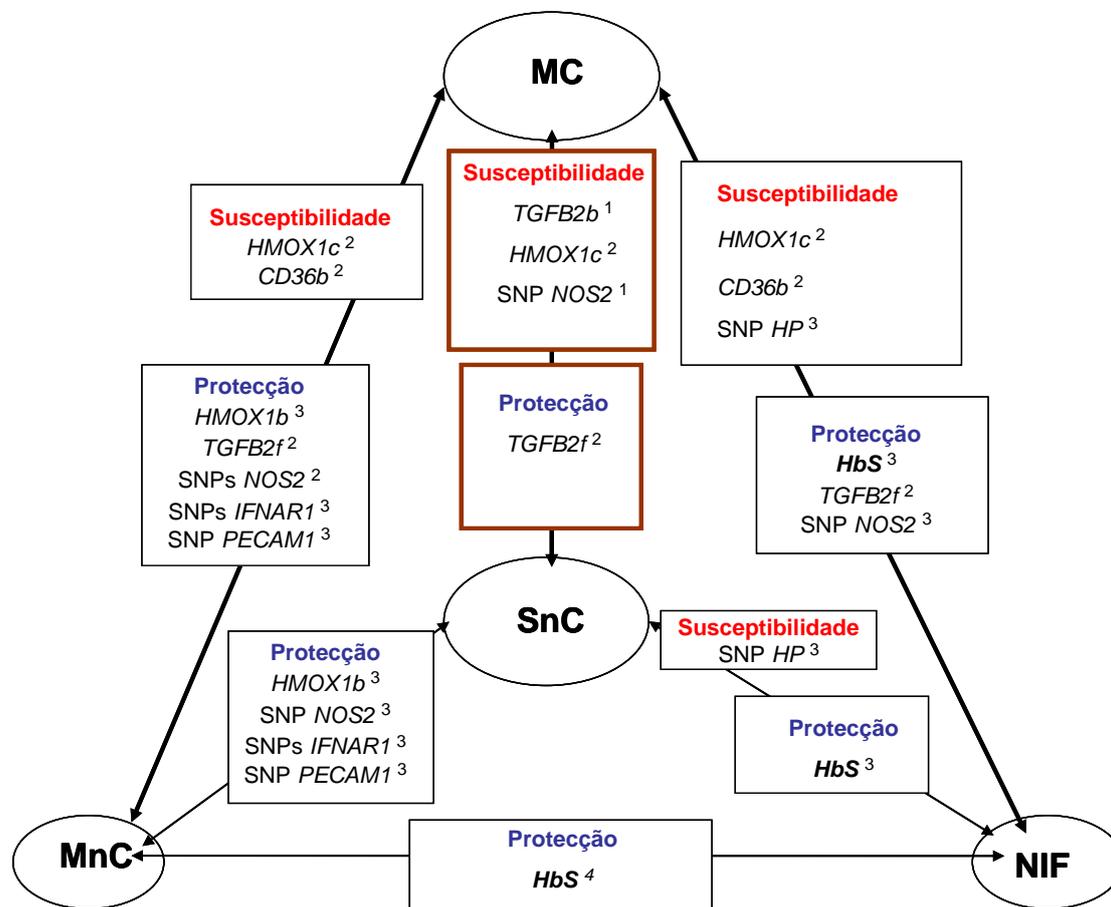


Figura 18. Efeitos das variantes dos genes candidatos estudados em diferentes níveis do espectro clínico da malária.

1) Factor genético específico de malária cerebral; 2) Factor genético não específico de malária cerebral; 3) Factor de severidade da malária; 4) Factor de malária não complicada.

O desenho de estudo utilizado nesta tese permitiu identificar um novo gene associado à malária cerebral, o *Transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)*, que não seria revelado em estudos de casos-controlos tradicionais. O haplótipo *TGFB2c* identificado neste estudo, correspondeu ao arquétipo do factor genético que se pretendia detectar, uma variante genética de um gene candidato que confere susceptibilidade específica à malária cerebral e que não evidenciou sinais de associação a outras formas de malária. Foi igualmente possível demonstrar a contribuição pleiotrópica do gene *Heme oxygenase 1 (HMOX1)* na discriminação

fenotípica da malária severa, quer através dos efeitos individuais de alguns polimorfismos, permitindo discernir os doentes com malária cerebral dos doentes com malária severa não cerebral, quer pelo efeito conjunto de combinações genotípicas estruturadas em haplótipos, que identificaram variantes haplotípicas aumentando o risco de malária cerebral (HMOX1c) ou protegendo contra a malária severa (HMOX1b). Constatou-se assim a importância de estudar o efeito genético único de múltiplos marcadores em forte *linkage disequilibrium* através do estudo de haplótipos, em contraposição ao efeito individual dos SNPs.

Salienta-se também que qualquer dos efeitos das variantes dos genes *TGFB2* e *HMOX1* observados neste estudo se verificou independentemente do efeito genético duplo do alelo *HbS*. A acção deste alelo revelou-se em todo o espectro fenotípico da malária por *P. falciparum*, começando por diminuir o risco de contrair a malária não complicada, até ao extremo oposto em que exerce um forte efeito de resistência contra a malária severa, incluindo a malária cerebral. Na população do presente estudo foi possível replicar algumas associações descritas à malária severa, designadamente com polimorfismos dos genes *NOS2* (*Nitric oxide synthase 2, inducible*), *IFNAR* [*Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1*], *HP* (*Haptoglobin*) e *PECAM1* (*Platelet-endothelial cell-adhesion molecule, CD31*). Deste modo, produziram-se resultados que permitem corroborar a concepção da base poligénica da susceptibilidade/resistência nas doenças complexas, como é o caso da malária. Encontraram-se vários sinais de associação à malária cerebral gerados por genes diferentes, sendo estes efeitos habitualmente pequenos (OR raramente > 2,0), excepto para o caso do alelo *HbS*. Contribuiu também para esta asserção da poligenia da componente genética da malária, a constatação de interacção entre polimorfismos dos genes *TGFB2* e *HMOX1* que é sugestiva de um possível efeito potenciador da fisiopatologia da malária cerebral mediada por combinações genotípicas deste dois genes. Esta observação evidenciou-se nos sinais de interacção entre um dos SNPs associados à malária cerebral que integra o bloco de LD do gene *HMOX1* e alguns SNPs do gene *TGFB2* especificamente associados à malária cerebral.

Este estudo não se alheou da possibilidade de se produzirem associações espúrias. O estudo da transmissão alélica em pares mãe-criança permitiu reforçar a genuinidade dos efeitos genéticos das variantes detectadas como factores de risco que determinaram a evolução para a malária cerebral, salvaguardando em certa medida potenciais factores de estratificação da amostra. A dimensão da amostra e o poder estatístico do estudo podem justificar a impossibilidade de replicação de outras associações já descritas, mas as possíveis diferenças genéticas entre a população deste estudo e outras populações de áreas geográficas distintas também podem ter limitado a reprodução dos resultados. Quando se analisa a falta de replicação de associações publicadas de SNPs a manifestações clínicas da malária, para além de considerações estatísticas sobre a obtenção de resultados falsos positivos ou mesmo falsos negativos, devem ser considerados os efeitos expectáveis do pleiotropismo das diferentes variantes dos genes estudados, a heterogeneidade da estrutura genética das populações em estudo e as diferenças na distribuição geográfica da endemicidade da malária [255, 329, 330].

A abordagem de estratificação clínica da malária que se utilizou neste estudo, poderá revelar-se um instrumento útil para complementar os estudos de associação à escala genómica que decorrem actualmente, já que poderá permitir uma resolução mais fina da análise de associação de genes candidatos, tendo em conta o contexto haplotípico e a variabilidade genética nas populações africanas [158, 331, 332].

Até à descoberta das variações do número de cópias (*copy number variations* - CNVs) no genoma humano, julgava-se que os SNPs eram as formas predominantes de variação genética, às quais se atribuía a vasta e normal variabilidade fenotípica [333, 334]. Actualmente aceita-se que as CNVs constituem a maior fonte de diversidade do genoma humano, podendo estar associadas não só a doenças genómicas raras, mas também a doenças comuns e a traços complexos. Não obstante esta evidência, a opção pelos SNPs como variantes genéticas a estudar para esta tese, fundamentou-se no facto de, até ao momento, a caracterização das CNVs nas diferentes populações ainda se encontrar em estado incipiente e não permitir que sejam utilizados operativamente

como marcadores genéticos [335]. Realça-se que as CNVs têm sido alvo de investigação por vários grupos de referência, incluindo os estudos efectuados no âmbito do Consórcio Internacional HapMap (<http://projects.tcag.ca/variation>). No futuro, as CNVs poderão constituir uma importante fonte de aquisição de conhecimentos na genética da malária, pelo que não podemos excluir que alguns dos efeitos identificados nesta tese possam constituir manifestações indirectas de efeitos genéticos mais fortes, conferidos por CNVs associados em *linkage disequilibrium* aos SNPs que foram estudados.

Este trabalho representa o primeiro estudo sobre a genética da malária cerebral na população angolana, tendo contribuído com novos elementos que reforçam a importância da genética na clínica das doenças infecciosas e particularmente da malária. A demonstração que variantes do gene *TGFB2* influenciam de um modo específico o risco de progressão para a malária cerebral e que existe uma correlação entre a expressão génica do gene *HMOX1* e a susceptibilidade à malária, proporcionará perspectivas e motivação, quer para futuros estudos de associação noutras populações, quer para estudos funcionais da fisiopatologia malária, permitindo assim contribuir para uma melhor compreensão da patogénese molecular da malária severa.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Najera, J.A., *Malaria control: achievements, problems and strategies*. Parassitologia, 2001. **43**(1-2): p. 1-89.
2. Snow, R.W. and K. Marsh, *New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control*. Br Med Bull, 1998. **54**(2): p. 293-309.
3. Mendis, K., et al., *From malaria control to eradication: The WHO perspective*. Trop Med Int Health, 2009. **26**: p. 26.
4. Greenwood, B., *Can malaria be eliminated?* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009. **103 Suppl 1**(1): p. S2-5.
5. Trigg, P.I. and A.V. Kondrachine, *Commentary: malaria control in the 1990s*. Bull World Health Organ, 1998. **76**(1): p. 11-6.
6. WHO(org.). *World Malaria Report 2008. "Estimated burden of malaria in 2006"*.  
[http://www.who.int/pmnch/topics/add\\_publications/2008\\_worldmalariarep/en/2009.03.16](http://www.who.int/pmnch/topics/add_publications/2008_worldmalariarep/en/2009.03.16).
7. Manson-Bahr, P., *The malaria story*. Proc R Soc Med, 1961. **54**: p. 91-100.
8. Laveran, A., *Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustres*. Bull Acad Med., 1880. **9**: p. 1235-6.
9. Snow, R.W., et al., *The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 214-7.
10. Schellenberg, D., et al., *African children with malaria in an area of intense Plasmodium falciparum transmission: features on admission to the hospital and risk factors for death*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(3): p. 431-8.
11. Issifou, S., et al., *Differences in presentation of severe malaria in urban and rural Gabon*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6): p. 1015-9.
12. Dondorp, A.M., et al., *The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(2): p. 151-7.
13. Gachot, B., F. Bruneel, and C. Behr, *[Severe malaria]*. Rev Prat, 2001. **51**(6): p. 638-43.
14. Genton, B. and V. D'Acromont, *Clinical features of malaria in returning travelers and migrants*. Travelers' Malaria. , 2001: p. 371-392.
15. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 673-9.

16. Greenwood, B., K. Marsh, and R. Snow, *Why do some African children develop severe malaria?* Parasitol Today, 1991. **7**(10): p. 277-81.
17. Mishra, S.K. and C.R. Newton, *Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria.* Nat Rev Neurol, 2009. **5**(4): p. 189-98.
18. Taylor, T., et al., *Standardized data collection for multi-center clinical studies of severe malaria in African children: establishing the SMAC network.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006. **100**(7): p. 615-22.
19. Mung'Ala-Odera, V., R.W. Snow, and C.R. Newton, *The burden of the neurocognitive impairment associated with Plasmodium falciparum malaria in sub-saharan Africa.* Am J Trop Med Hyg, 2004. **71**(2 Suppl): p. 64-70.
20. Idro, R., N.E. Jenkins, and C.R. Newton, *Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria.* Lancet Neurol, 2005. **4**(12): p. 827-40.
21. WHO, R.O.f.A.-. *Clinical, behavioural and socioeconomic factors related to severe malaria: a multicentre study in the African region.* 2002.
22. Ross, R., *On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood.* . BMJ, 1897. **18**: p. 1786-8.
23. Alano, P., *Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life.* Mol Microbiol, 2007. **66**(2): p. 291-302.
24. Prudencio, M., A. Rodriguez, and M.M. Mota, *The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage.* Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(11): p. 849-56.
25. Mandell, G., J. Bennett, and R. Dolin, *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Vol.2.5th ed. Churchill Livingstone. 2000; 2817-2820
26. Wirth, D.F., *Biological revelations.* Nature, 2002. **419**(6906): p. 495-6.
27. Trampuz, A., et al., *Clinical review: Severe malaria.* Crit Care, 2003. **7**(4): p. 315-23.
28. Koram, K.A. and M.E. Molyneux, *When is "malaria" malaria? The different burdens of malaria infection, malaria disease, and malaria-like illnesses.* Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6 Suppl): p. 1-5.
29. Jain, V., et al., *Burden of cerebral malaria in central India (2004-2007).* Am J Trop Med Hyg, 2008. **79**(4): p. 636-42.
30. Kochar, D.K., et al., *Plasmodium vivax malaria.* Emerg Infect Dis., 2005. **11**(1): p. 132-4.

31. Kochar, D.K., et al., *Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(2): p. 194-8.
32. van der Heyde, H.C., et al., *A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction*. Trends Parasitol, 2006. **22**(11): p. 503-8.
33. Mackintosh, C.L., J.G. Beeson, and K. Marsh, *Clinical features and pathogenesis of severe malaria*. Trends Parasitol, 2004. **20**(12): p. 597-603.
34. Hunt, N.H. and G.E. Grau, *Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria*. Trends Immunol, 2003. **24**(9): p. 491-9.
35. Gimenez, F., et al., *Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria*. Cell Mol Life Sci., 2003. **60**(8): p. 1623-35.
36. Awandare, G.A., et al., *Increased levels of inflammatory mediators in children with severe Plasmodium falciparum malaria with respiratory distress*. J Infect Dis, 2006. **194**(10): p. 1438-46.
37. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
38. Venturini, G., et al., *Nitric oxide inhibits falcipain, the Plasmodium falciparum trophozoite cysteine protease*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(1): p. 190-3.
39. Toda, N., K. Ayajiki, and T. Okamura, *Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances*. Pharmacol Rev, 2009. **61**(1): p. 62-97.
40. Ostera, G., et al., *Plasmodium falciparum: food vacuole localization of nitric oxide-derived species in intraerythrocytic stages of the malaria parasite*. Exp Parasitol, 2008. **120**(1): p. 29-38.
41. Clark, I.A., K.A. Rockett, and W.B. Cowden, *Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria*. Lancet, 1992. **340**(8824): p. 894-6.
42. *Severe and complicated malaria*. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990. **84 Suppl 2**: p. 1-65.
43. *Severe falciparum malaria*. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94 Suppl 1**(1): p. S1-90.
44. Imbert, P., et al., *Severe falciparum malaria in children: a comparative study of 1990 and 2000 WHO criteria for clinical presentation, prognosis and*

- intensive care in Dakar, Senegal*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96**(3): p. 278-81.
45. Imbert, P., et al., [*Pertinence of the 2000 WHO criteria in non-immune children with severe malaria in Dakar, Senegal*]. Bull Soc Pathol Exot, 2003. **96**(3): p. 156-60.
  46. Mishra, S.K., et al., *Management of severe and complicated malaria*. J Postgrad Med, 2006. **52**(4): p. 281-7.
  47. Tripathy, R., et al., *Clinical manifestations and predictors of severe malaria in Indian children*. Pediatrics, 2007. **120**(3): p. e454-60.
  48. Bhattacharyya, P.C. and M. Nayak, *Emergency in malaria*. J Indian Med Assoc, 2006. **104**(5): p. 238, 240-2.
  49. Phiri, K.S., et al., *Long term outcome of severe anaemia in Malawian children*. PLoS ONE, 2008. **3**(8): p. e2903.
  50. Stoute, J.A., et al., *Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia*. J Infect Dis, 2003. **187**(3): p. 522-5.
  51. Kurtzhals, J.A., et al., *Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in Plasmodium falciparum malaria*. Br J Haematol, 1997. **97**(1): p. 169-74.
  52. el Hassan, A.M., et al., *Decreased erythropoietin response in Plasmodium falciparum malaria-associated anaemia*. Eur J Haematol, 1997. **59**(5): p. 299-304.
  53. Lyke, K.E., et al., *Association of intraleukocytic Plasmodium falciparum malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **69**(3): p. 253-9.
  54. Marsh, K., et al., *Indicators of life-threatening malaria in African children*. N Engl J Med, 1995. **332**(21): p. 1399-404.
  55. Lagerberg, R.E., *Malaria in pregnancy: a literature review*. J Midwifery Womens Health, 2008. **53**(3): p. 209-15.
  56. White, N.J., et al., *Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria*. N Engl J Med, 1983. **309**(2): p. 61-6.
  57. Thien, H.V., P.A. Kager, and H.P. Sauerwein, *Hypoglycemia in falciparum malaria: is fasting an unrecognized and insufficiently emphasized risk factor?* Trends Parasitol, 2006. **22**(9): p. 410-5.
  58. Taylor, T.E., A. Borgstein, and M.E. Molyneux, *Acid-base status in paediatric Plasmodium falciparum malaria*. Q J Med, 1993. **86**(2): p. 99-109.

59. Sasi, P., et al., *Metabolic acidosis and other determinants of hemoglobin-oxygen dissociation in severe childhood Plasmodium falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(2): p. 256-60.
60. Taylor, W.R., V. Canon, and N.J. White, *Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management*. Treat Respir Med, 2006. **5**(6): p. 419-28.
61. Mohan, A., S.K. Sharma, and S. Bollineni, *Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria*. J Vector Borne Dis, 2008. **45**(3): p. 179-93.
62. Bhalla, A., V. Suri, and V. Singh, *Malarial hepatopathy*. J Postgrad Med, 2006. **52**(4): p. 315-20.
63. Anand, A.C. and P. Puri, *Jaundice in malaria*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(9): p. 1322-32.
64. Mishra, S.K. and B.S. Das, *Malaria and acute kidney injury*. Semin Nephrol, 2008. **28**(4): p. 395-408.
65. Francischetti, I.M., K.B. Seydel, and R.Q. Monteiro, *Blood coagulation, inflammation, and malaria*. Microcirculation, 2008. **15**(2): p. 81-107.
66. Pukrittayakamee, S., et al., *Activation of the coagulation cascade in falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83**(6): p. 762-6.
67. Taylor, T.E., et al., *Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts*. Nat Med, 2004. **10**(2): p. 143-5.
68. Molyneux, M.E., et al., *Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children*. Q J Med, 1989. **71**(265): p. 441-59.
69. Shaywitz, B.A., *Management of acute neurologic syndromes in infants and children*. Yale J Biol Med, 1984. **57**(1): p. 83-95.
70. Swaminathan, A., P. Levy, and E. Legome, *Evaluation and management of moderate to severe pediatric head trauma*. J Emerg Med, 2009. **19**: p. 19.
71. Berkley, J.A., et al., *Cerebral malaria versus bacterial meningitis in children with impaired consciousness*. Qjm, 1999. **92**(3): p. 151-7.
72. Ghosh, K., *Evolution and selection of human leukocyte antigen alleles by Plasmodium falciparum infection*. Hum Immunol, 2008. **69**(12): p. 856-60.
73. Maude, R.J., et al., *The eye in cerebral malaria: what can it teach us?* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008. **17**: p. 17.

74. Beare, N.A., et al., *Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy*. J Infect Dis, 2009. **199**(2): p. 263-71.
75. Lewallen, S., et al., *Clinical-histopathological correlation of the abnormal retinal vessels in cerebral malaria*. Arch Ophthalmol, 2000. **118**(7): p. 924-8.
76. Akpede, G.O., R.M. Sykes, and P.O. Abiodun, *Convulsions with malaria: febrile or indicative of cerebral involvement?* J Trop Pediatr, 1993. **39**(6): p. 350-5.
77. Crawley, J., et al., *Electroencephalographic and clinical features of cerebral malaria*. Arch Dis Child, 2001. **84**(3): p. 247-53.
78. Thumasupapong, S., et al., *Electroencephalography in cerebral malaria*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1995. **26**(1): p. 34-7.
79. Sambo, M., R., A. Borges, and F. Borges, *Malária cerebral e síndrome neurológica pós-malária*. Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, 2000. **7**(3): p. 170-175.
80. Idro, R., et al., *Decorticate, decerebrate and opisthotonic posturing and seizures in Kenyan children with cerebral malaria*. Malar J, 2005. **4**(57): p. 57.
81. Newton, C.R., et al., *Intracranial pressure in African children with cerebral malaria*. Lancet, 1991. **337**(8741): p. 573-6.
82. Waller, D., et al., *Intracranial pressure in childhood cerebral malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991. **85**(3): p. 362-4.
83. Crawley, J., et al., *Abnormal respiratory patterns in childhood cerebral malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998. **92**(3): p. 305-8.
84. Idro, R., C. Karamagi, and J. Tumwine, *Immediate outcome and prognostic factors for cerebral malaria among children admitted to Mulago Hospital, Uganda*. Ann Trop Paediatr, 2004. **24**(1): p. 17-24.
85. Jaffar, S., et al., *Predictors of a fatal outcome following childhood cerebral malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **57**(1): p. 20-4.
86. Genton, B., et al., *Indicators of fatal outcome in paediatric cerebral malaria: a study of 134 comatose Papua New Guinean children*. Int J Epidemiol, 1997. **26**(3): p. 670-6.
87. John, C.C., et al., *Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment*. Pediatrics, 2008. **122**(1): p. e92-9.
88. Bondi, F.S., *The incidence and outcome of neurological abnormalities in childhood cerebral malaria: a long-term follow-up of 62 survivors*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(1): p. 17-9.

89. Brewster, D.R., D. Kwiatkowski, and N.J. White, *Neurological sequelae of cerebral malaria in children*. *Lancet*, 1990. **336**(8722): p. 1039-43.
90. Falchook, G.S., et al., *Postmalaria neurological syndrome after treatment of Plasmodium falciparum malaria in the United States*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(2): p. e22-4.
91. Ngoungou, E.B., et al., *Cerebral malaria and sequela epilepsy: first matched case-control study in Gabon*. *Epilepsia*, 2006. **47**(12): p. 2147-53.
92. Carter, J.A., et al., *Increased prevalence of epilepsy associated with severe falciparum malaria in children*. *Epilepsia*, 2004. **45**(8): p. 978-81.
93. Ngoungou, E.B., et al., *Epilepsy as a consequence of cerebral malaria in area in which malaria is endemic in Mali, West Africa*. *Epilepsia*, 2006. **47**(5): p. 873-9.
94. Allison, A.C., *Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection*. *Br Med J*, 1954. **1**(4857): p. 290-4.
95. Hoffman, S.L., et al., *Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria*. *Nature*, 2002. **415**(6872): p. 702-9.
96. Vaughan, K., et al., *Meta-analysis of immune epitope data for all Plasmodia: overview and applications for malarial immunobiology and vaccine-related issues*. *Parasite Immunol*, 2009. **31**(2): p. 78-97.
97. Neafsey, D.E., et al., *Genome-wide SNP genotyping highlights the role of natural selection in Plasmodium falciparum population divergence*. *Genome Biol*, 2008. **9**(12): p. R171.
98. Lehmann, T., et al., *Molecular evolution of immune genes in the malaria mosquito Anopheles gambiae*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4549.
99. Charlesworth, D., *Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions*. *PLoS Genet*, 2006. **2**(4): p. e64.
100. Gangwar, D., et al., *A systematic classification of Plasmodium falciparum P-loop NTPases: structural and functional correlation*. *Malar J*, 2009. **8**(69): p. 69.
101. Lafferty, K.D., *The ecology of climate change and infectious diseases*. *Ecology*, 2009. **90**(4): p. 888-900.
102. Archie, E.A., G. Luikart, and V.O. Ezenwa, *Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology*. *Trends Ecol Evol*, 2009. **24**(1): p. 21-30.
103. Frazer, K.A., et al., *Human genetic variation and its contribution to complex traits*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(4): p. 241-51.

104. Hill, A.V., *Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases*. *Annu Rev Genet*, 2006. **40**: p. 469-86.
105. Bellamy, R. and A.V. Hill, *Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans*. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(4): p. 483-7.
106. Frodsham, A.J. and A.V. Hill, *Genetics of infectious diseases*. *Hum Mol Genet.*, 2004. **13**(Spec No 2): p. R187-94.
107. Khoury, M.J., et al., *Genome-Wide Association Studies, Field Synopses, and the Development of the Knowledge Base on Genetic Variation and Human Diseases*. *Am J Epidemiol*, 2009. **4**: p. 4.
108. Orr, N. and S. Chanock, *Common genetic variation and human disease*. *Adv Genet*, 2008. **62**: p. 1-32.
109. Khoury, M.J., et al., *On the synthesis and interpretation of consistent but weak gene-disease associations in the era of genome-wide association studies*. *Int J Epidemiol*, 2007. **36**(2): p. 439-45.
110. Jakobsdottir, J., et al., *Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(2): p. e1000337.
111. Davey Smith, G., et al., *Genetic epidemiology and public health: hope, hype, and future prospects*. *Lancet*, 2005. **366**(9495): p. 1484-98.
112. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria*. *Am J Hum Genet.*, 2005. **77**(2): p. 171-92. .
113. Kwiatkowski, D., *Genetic susceptibility to malaria getting complex*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(3): p. 320-4.
114. Mackinnon, M.J., et al., *Heritability of malaria in Africa*. *PLoS Med*, 2005. **2**(12): p. e340.
115. Harris, E.E. and D. Meyer, *The molecular signature of selection underlying human adaptations*. *Am J Phys Anthropol*, 2006. **Suppl 43**: p. 89-130.
116. Tishkoff, S.A. and S.M. Williams, *Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(8): p. 611-21.
117. Flint, J., et al., *The population genetics of the haemoglobinopathies*. *Baillieres Clin Haematol*, 1998. **11**(1): p. 1-51.
118. Nagel, R.L. and A.F. Fleming, *Genetic epidemiology of the beta s gene*. *Baillieres Clin Haematol*, 1992. **5**(2): p. 331-65.

119. Leborgne-Samuel, Y., et al., [*Sickle cell disease and pregnancy*]. Rev Prat, 2004. **54**(14): p. 1578-82.
120. Tsaras, G., et al., *Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review*. Am J Med, 2009. **122**(6): p. 507-12.
121. Aidoo, M., et al., *Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality*. Lancet, 2002. **359**(9314): p. 1311-2.
122. Feng, Z., et al., *Coupling ecology and evolution: malaria and the S-gene across time scales*. Math Biosci, 2004. **189**(1): p. 1-19.
123. Joy, D.A., et al., *Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum*. Science, 2003. **300**(5617): p. 318-21.
124. Scherf, A., J.J. Lopez-Rubio, and L. Riviere, *Antigenic variation in Plasmodium falciparum*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 445-70.
125. Kraemer, S.M. and J.D. Smith, *A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 374-80.
126. Deitsch, K.W. and L. Hviid, *Variant surface antigens, virulence genes and the pathogenesis of malaria*. Trends Parasitol, 2004. **20**(12): p. 562-6.
127. Allison, A.C., *Genetic control of resistance to human malaria*. Curr Opin Immunol, 2009. **11**: p. 11.
128. Williams, T.N., et al., *Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases*. J Infect Dis, 2005. **192**(1): p. 178-86.
129. Williams, T.N., et al., *An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait*. PLoS Med, 2005. **2**(5): p. e128.
130. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria*. Jama, 2007. **297**(20): p. 2220-6.
131. Ruwende, C., et al., *Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 246-9.
132. Verra, F., et al., *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria*. PLoS ONE, 2007. **2**(10): p. e978.
133. Williams, T.N., et al., *Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassaemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya*. Blood, 2005. **106**(1): p. 368-71.
134. Fowkes, F.J., et al., *Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia*. PLoS Med, 2008. **5**(3): p. e56.

135. Mockenhaupt, F.P., et al., *Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2003-6.
136. Williams, T.N., et al., *Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1253-7.
137. Ruwende, C. and A. Hill, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria*. J Mol Med., 1998. **76**(8): p. 581-8.
138. Miller, L.H., et al., *The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy*. N Engl J Med, 1976. **295**(6): p. 302-4.
139. Modiano, D., et al., *Different response to Plasmodium falciparum malaria in west African sympatric ethnic groups*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13206-11.
140. Dolo, A., et al., *Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(3): p. 243-8.
141. Modiano, D., et al., *The lower susceptibility to Plasmodium falciparum malaria of Fulani of Burkina Faso (west Africa) is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95**(2): p. 149-52.
142. Tosta, C.E., *Coadaptation and malaria control*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007. **102**(3): p. 385-404.
143. Hemingway, J., et al., *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(7): p. 653-65.
144. Abel, L., *[Genetic epidemiology in the study of susceptibility/resistance to malaria in the human population]*. Bull Soc Pathol Exot, 1999. **92**(4): p. 256-60.
145. Daly, A.K. and C.P. Day, *Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(5): p. 489-99.
146. Davila, S. and M.L. Hibberd, *Genome-wide association studies are coming for human infectious diseases*. Genome Med, 2009. **1**(2): p. 19.
147. Smeeth, L., P.T. Donnan, and D.G. Cook, *The use of primary care databases: case-control and case-only designs*. Fam Pract, 2006. **23**(5): p. 597-604.
148. Ewens, W.J. and R.S. Spielman, *The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture*. Am J Hum Genet, 1995. **57**(2): p. 455-64.

149. Laird, N.M. and C. Lange, *Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 385-94.
150. Spielman, R.S. and W.J. Ewens, *The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association*. Am J Hum Genet, 1996. **59**(5): p. 983-9.
151. Gordon, D. and S.J. Finch, *Factors affecting statistical power in the detection of genetic association*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1408-18.
152. Mueller, J.C., *Linkage disequilibrium for different scales and applications*. Brief Bioinform, 2004. **5**(4): p. 355-64.
153. Griffiths, M., J., et al., *An Introduction to Genetic Analysis.*, 2004(Eighth Edition.): p. 628.
154. Jorde, L.B., *Linkage disequilibrium as a gene-mapping tool*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 11-4.
155. Ardlie, K.G., L. Kruglyak, and M. Seielstad, *Patterns of linkage disequilibrium in the human genome*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(4): p. 299-309.
156. Morton, N.E., *Linkage disequilibrium maps and association mapping*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1425-30.
157. Stram, D.O., *Tag SNP selection for association studies*. Genet Epidemiol, 2004. **27**(4): p. 365-74.
158. Jallow, M., et al., *Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa*. Nat Genet, 2009. **24**: p. 24.
159. *A global network for investigating the genomic epidemiology of malaria*. Nature, 2008. **456**(7223): p. 732-7.
160. Pettersson, F.H., et al., *Marker selection for genetic case-control association studies*. Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 743-52.
161. Crawford, D.C. and D.A. Nickerson, *Definition and clinical importance of haplotypes*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 303-20.
162. Phillips, P.C., *Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(11): p. 855-67.
163. Nagel, R.L., *Epistasis and the genetics of human diseases*. C R Biol, 2005. **328**(7): p. 606-15.

164. Musani, S.K., et al., *Detection of gene x gene interactions in genome-wide association studies of human population data*. Hum Hered, 2007. **63**(2): p. 67-84.
165. Houlston, R.S. and J. Peto, *The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6471-6.
166. Mackay, T.F., *Q&A: Genetic analysis of quantitative traits*. J Biol, 2009. **8**(3): p. 23.
167. Mackay, T.F., *The genetic architecture of quantitative traits*. Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 303-39.
168. Airey, D.C., L. Lu, and R.W. Williams, *Genetic control of the mouse cerebellum: identification of quantitative trait loci modulating size and architecture*. J Neurosci, 2001. **21**(14): p. 5099-109.
169. Gavins, F., G. Yilmaz, and D.N. Granger, *The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation*. Microcirculation, 2007. **14**(7): p. 667-81.
170. Seydel, K.B., et al., *The distribution and intensity of parasite sequestration in comatose Malawian children*. J Infect Dis, 2006. **194**(2): p. 208-5.
171. Rogerson, S.J., G.E. Grau, and N.H. Hunt, *The microcirculation in severe malaria*. Microcirculation, 2004. **11**(7): p. 559-76.
172. Anstey, N.M., et al., *The pathophysiology of vivax malaria*. Trends Parasitol, 2009. **4**: p. 4.
173. Chakravorty, S.J., K.R. Hughes, and A.G. Craig, *Host response to cytoadherence in Plasmodium falciparum*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 2): p. 221-8.
174. Pouvelle, B., et al., *Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes capable of aggregation*. Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3516-22.
175. Mercereau-Puijalon, O., M. Guillotte, and I. Vigan-Womas, *Rosetting in Plasmodium falciparum: a cytoadherence phenotype with multiple actors*. Transfus Clin Biol, 2008. **15**(1-2): p. 62-71.
176. Baruch, D.I., S.J. Rogerson, and B.M. Cooke, *Asexual blood stages of malaria antigens: cytoadherence*. Chem Immunol, 2002. **80**: p. 144-62.
177. Biggs, B.A., et al., *Adherence of infected erythrocytes to venular endothelium selects for antigenic variants of Plasmodium falciparum*. J Immunol, 1992. **149**(6): p. 2047-54.
178. Newbold, C., et al., *Receptor-specific adhesion and clinical disease in Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **57**(4): p. 389-98.

179. Rogerson, S.J., et al., *Cytoadherence characteristics of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(3): p. 467-72.
180. Roberts, D.J., et al., *Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 689-92.
181. Turner, G.D., et al., *An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1057-69.
182. Chilongola, J., et al., *CD36 deficiency protects against malarial anaemia in children by reducing Plasmodium falciparum-infected red blood cell adherence to vascular endothelium*. Trop Med Int Health, 2009. **14**(7): p. 810-6.
183. Rac, M.E., K. Safranow, and W. Poncyljusz, *Molecular basis of human CD36 gene mutations*. Mol Med, 2007. **13**(5-6): p. 288-96.
184. Oquendo, P., et al., *CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes*. Cell, 1989. **58**(1): p. 95-101.
185. Todryk, S.M. and B.C. Urban, *Dendritic cells in Plasmodium infection*. Future Microbiol, 2008. **3**: p. 279-86.
186. Aitman, T.J., et al., *Malaria susceptibility and CD36 mutation*. Nature, 2000. **405**(6790): p. 1015-6.
187. Pain, A., et al., *A non-sense mutation in Cd36 gene is associated with protection from severe malaria*. Lancet., 2001. **357**(9267): p. 1502-3.
188. Omi, K., et al., *CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria*. Am J Hum Genet., 2003. **72**(2): p. 364-74. .
189. Fry, A.E., et al., *Positive selection of a CD36 nonsense variant in sub-Saharan Africa, but no association with severe malaria phenotypes*. Hum Mol Genet, 2009. **29**: p. 29.
190. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3383?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3383?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.), 16/03/2009.
191. Fernandez-Reyes, D., et al., *A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya*. Hum Mol Genet., 1997. **6**(8): p. 1357-60.
192. Kun, J.F., et al., *Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(5): p. 776-9.

193. Bellamy, R., D. Kwiatkowski, and A.V. Hill, *Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998. **92**(3): p. 312-6.
194. Fry, A.E., et al., *Variation in the ICAM1 gene is not associated with severe malaria phenotypes*. *Genes Immun*, 2008. **9**(5): p. 462-9.
195. Ndiaye, R., et al., *Genetic study of ICAM1 in clinical malaria in Senegal*. *Tissue Antigens*, 2005. **65**(5): p. 474-80.
196. Sinha, S., et al., *Variations in host genes encoding adhesion molecules and susceptibility to falciparum malaria in India*. *Malar J*, 2008. **7**(250): p. 250.
197. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum), 2009.03.16.
198. Casals-Pascual, C., et al., *Short report: codon 125 polymorphism of CD31 and susceptibility to malaria*. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. **65**(6): p. 736-7.
199. Kikuchi, M., et al., *Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais*. *Parasitol Int*, 2001. **50**(4): p. 235-9.
200. Riley, E.M., et al., *Regulating immunity to malaria*. *Parasite Immunol*, 2006. **28**(1-2): p. 35-49.
201. Urban, B.C., R. Ing, and M.M. Stevenson, *Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **297**: p. 25-70.
202. Artavanis-Tsakonas, K. and E.M. Riley, *Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *J Immunol*, 2002. **169**(6): p. 2956-63.
203. Chartrain, N.A., et al., *Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6765-72.
204. Aktan, F., *iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation*. *Life Sci*, 2004. **75**(6): p. 639-53.
205. Mellouk, S., et al., *Nitric oxide-mediated antiplasmodial activity in human and murine hepatocytes induced by gamma interferon and the parasite itself: enhancement by exogenous tetrahydrobiopterin*. *Infect Immun*, 1994. **62**(9): p. 4043-6.

206. Chiwakata, C.B., C.J. Hemmer, and M. Dietrich, *High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 394-9.
207. Serirom, S., et al., *Anti-adhesive effect of nitric oxide on Plasmodium falciparum cytoadherence under flow*. Am J Pathol, 2003. **162**(5): p. 1651-60.
208. Kun, J.F., et al., *Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria*. J Infect Dis., 2001. **184**(3): p. 330-6. Epub 2001 Jun 26.
209. Kun, J.F., et al., *Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria*. Lancet., 1998. **351**(9098): p. 265-6.
210. Levesque, M.C., et al., *Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria*. J Infect Dis., 1999. **180**(6): p. 1994-2002.
211. Hobbs, M.R., et al., *A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children*. Lancet., 2002. **360**(9344): p. 1468-75.
212. Burgner, D., et al., *Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria*. Lancet, 1998. **352**(9135): p. 1193-4.
213. Burgner, D., et al., *Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria*. Hum Genet., 2003. **112**(4): p. 379-86. .
214. Dhangadamajhi, G., et al., *The CCTTT pentanucleotide microsatellite in iNOS promoter influences the clinical outcome in P. falciparum infection*. Parasitol Res, 2009. **20**: p. 20.
215. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7099?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7099?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum), 2009.03.16.
216. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
217. Gowda, D.C., *TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs*. Trends Parasitol, 2007. **23**(12): p. 596-604.
218. Schofield, L., et al., *Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 785-9.

219. Togbe, D., et al., *Murine cerebral malaria development is independent of toll-like receptor signaling*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1640-8.
220. Mockenhaupt, F.P., et al., *Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2006. **103**(1): p. 177-82. Epub 2005 Dec 21.
221. Campino, S., et al., *TLR9 polymorphisms in African populations: no association with severe malaria, but evidence of cis-variants acting on gene expression*. Malar J, 2009. **8**(44): p. 44.
222. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4153?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4153?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum), 2009.03.16.
223. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. Immunobiology, 2009. **2**: p. 2.
224. Boldt, A.B., et al., *Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children*. Genes Immun, 2006. **7**(5): p. 393-400.
225. Holmberg, V., et al., *Mannose-binding lectin variant associated with severe malaria in young African children*. Microbes Infect, 2008. **10**(4): p. 342-8.
226. Luty, A.J., J.F. Kun, and P.G. Kremsner, *Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 1998. **178**(4): p. 1221-4.
227. Bellamy, R., et al., *Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans*. Qjm, 1998. **91**(1): p. 13-8.
228. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1378?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1378?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum), 2009.03.16.
229. Carlson, J., et al., *Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies*. Lancet, 1990. **336**(8729): p. 1457-60.
230. Treutiger, C.J., et al., *Rosette formation in Plasmodium falciparum isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1992. **46**(5): p. 503-10.
231. Cockburn, I.A., et al., *A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 272-7.

232. Zimmerman, P.A., et al., *CR1 Knops blood group alleles are not associated with severe malaria in the Gambia*. *Genes Immun*, 2003. **4**(5): p. 368-73.
233. Thathy, V., et al., *Complement receptor 1 polymorphisms associated with resistance to severe malaria in Kenya*. *Malar J.*, 2005. **4**: p. 54.
234. Teeranaipong, P., et al., *A functional single-nucleotide polymorphism in the CR1 promoter region contributes to protection against cerebral malaria*. *J Infect Dis*, 2008. **198**(12): p. 1880-91.
235. Sinha, S., et al., *CR1 levels and gene polymorphisms exhibit differential association with falciparum malaria in regions of varying disease endemicity*. *Human Immunology*, 2009. **70**(4): p. 244-250.
236. Clark, I.A., et al., *Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release*. *Malar J*, 2006. **5**(85): p. 85.
237. Chen, L. and F. Sendo, *Cytokine and chemokine mRNA expression in neutrophils from CBA/NSIc mice infected with Plasmodium berghei ANKA that induces experimental cerebral malaria*. *Parasitol Int*, 2001. **50**(2): p. 139-43.
238. Akanmori, B.D., et al., *Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of Plasmodium falciparum malaria*. *Eur Cytokine Netw*, 2000. **11**(1): p. 113-8.
239. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum), 2009.03.16.
240. Kwiatkowski, D., et al., *TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. *Lancet*, 1990. **336**(8725): p. 1201-4.
241. Grau, G.E., et al., *Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(24): p. 1586-91.
242. Clark, I.A., et al., *Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions*. *Clin Microbiol Rev*, 2004. **17**(3): p. 509-39, table of contents.
243. McGuire, W., et al., *Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria*. *Nature.*, 1994. **371**(6497): p. 508-10.
244. McGuire, W., et al., *Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles*. *J Infect Dis.*, 1999. **179**(1): p. 287-90.
245. Knight, J.C., et al., *A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria*. *Nat Genet.*, 1999. **22**(2): p. 145-50.

246. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.), 200.03.16.
247. Kossodo, S., et al., *Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria*. Immunology, 1997. **91**(4): p. 536-40.
248. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
249. Day, N.P., et al., *The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1288-97.
250. Ohashi, J., et al., *Lack of association between interleukin-10 gene promoter polymorphism, -1082G/A, and severe malaria in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2002. **33 Suppl 3**: p. 5-7.
251. Wilson, J.N., et al., *Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria*. Genes Immun, 2005. **6**(6): p. 462-6.
252. Khor, C.C., et al., *Positive replication and linkage disequilibrium mapping of the chromosome 21q22.1 malaria susceptibility locus*. Genes Immun, 2007. **8**(7): p. 570-6.
253. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3454?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3454?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.), 2009.03.16.
254. Vigario, A.M., et al., *Inhibition of Plasmodium yoelii blood-stage malaria by interferon alpha through the inhibition of the production of its target cell, the reticulocyte*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3966-71.
255. Aucan, C., et al., *Interferon-alpha receptor-1 (IFNAR1) variants are associated with protection against cerebral malaria in the Gambia*. Genes Immun., 2003. **4**(4): p. 275-82.
256. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3162?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3162?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.), 2009.03.16.
257. Francis, S.E., D.J. Sullivan, Jr., and D.E. Goldberg, *Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Annu Rev Microbiol, 1997. **51**: p. 97-123.

258. Shibahara, S., *The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism*. *Tohoku J Exp Med*, 2003. **200**(4): p. 167-86.
259. Pamplona, A., et al., *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria*. *Nat Med*, 2007. **13**(6): p. 703-10.
260. Schluesener, H.J., P.G. Kremsner, and R. Meyermann, *Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria*. *Acta Neuropathol*, 2001. **101**(1): p. 65-8.
261. Walker, O., et al., *Prognostic risk factors and post mortem findings in cerebral malaria in children*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992. **86**(5): p. 491-3.
262. Hunt, N.H., et al., *Immunopathogenesis of cerebral malaria*. *Int J Parasitol*, 2006. **36**(5): p. 569-82.
263. Medana, I.M., et al., *Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology?* *Immunol Cell Biol*, 2001. **79**(2): p. 101-20.
264. Takeda, M., et al., *Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar*. *Jpn J Infect Dis.*, 2005. **58**(5): p. 268-71.
265. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3240?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3240?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum), 2009.03.16.
266. Teye, K., et al., *A-61C and C-101G Hp gene promoter polymorphisms are, respectively, associated with ahaptoglobinaemia and hypohaptoglobinaemia in Ghana*. *Clin Genet*, 2003. **64**(5): p. 439-43.
267. Aucan, C., et al., *Haptoglobin genotypes are not associated with resistance to severe malaria in The Gambia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002. **96**(3): p. 327-8.
268. Elagib, A.A., et al., *Association of the haptoglobin phenotype (1-1) with falciparum malaria in Sudan*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998. **92**(3): p. 309-11.
269. Quaye, I.K., et al., *Haptoglobin 1-1 is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 2000. **94**(2): p. 216-9.
270. Shear, H.L., et al., *Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria*. *Blood*, 1993. **81**(1): p. 222-6.

271. Bagot, S., et al., *Identification of two cerebral malaria resistance loci using an inbred wild-derived mouse strain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 9919-23.
272. Miranda, A.J., *Estudo de hemoglobinopatias na população assistida no Hospital Militar principal de Luanda*. . Acta Médica Angolana, 1998. **12**: p. 11-22.
273. Eggert, W., et al., [*Sickle cell disease in the People's Republic of Angola. 1. Epidemiology and clinical aspects*]. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 1987. **114**(6): p. 857-65.
274. e Pinto, E.A. and J.G. Alves, *The causes of death of hospitalized children in Angola*. Trop Doct, 2008. **38**(1): p. 66-7.
275. UNICEF(org.);, *Situação Mundial da Infância 2008".Classificação por mortalidade de menores de 5 anos*. Dezembro de 2007. <http://www.unicef.pt/artigo.php?mid=181014&m=&sid=181014&cid=1338>, consultado em 05.02.09.
276. Craig, M.H., R.W. Snow, and D. le Sueur, *A climate-based distribution model of malaria transmission in sub-Saharan Africa*. Parasitol Today, 1999. **15**(3): p. 105-11.
277. *Declaration of Helsinki*. Law Med Health Care, 1991. **19**(3-4): p. 264-5.
278. Greenwood, B.M. and J.R. Armstrong, *Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991. **85**(2): p. 186-8.
279. Snounou, G., *Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification*. Methods Mol Biol, 1996. **50**: p. 263-91.
280. Ross, P., et al., *High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(13): p. 1347-51.
281. Gonzalez, J.R., et al., *SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies*. Bioinformatics., 2007. **23**(5): p. 644-5.
282. The R Project for Statistical Computing 2003 [<http://www.rproject.org/>].
283. Luna, A. and K.K. Nicodemus, *snp.plotter: an R-based SNP/haplotype association and linkage disequilibrium plotting package*. Bioinformatics, 2007. **23**(6): p. 774-6.
284. Zhao, J.H., et al., *GENECOUNTING: haplotype analysis with missing genotypes*. Bioinformatics 2002. **18**: p. 1694-1695.

285. Zhao, J.H., *gap: Genetic Analysis Package*. Journal of Statistical Software 2007. **23**: p. 1-18.
286. Schaid, D.J., et al., *Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(2): p. 425-34.
287. Clayton, D., *A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(4): p. 1170-7.
288. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
289. Snow, R.W., et al., *Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy*. J Infect Dis, 1998. **177**(3): p. 819-22.
290. Gupta, S., et al., *Acquired immunity and postnatal clinical protection in childhood cerebral malaria*. Proc Biol Sci, 1999. **266**(1414): p. 33-8.
291. Snow, R.W., et al., *Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa*. Lancet, 1997. **349**(9066): p. 1650-4.
292. Wattanagoon, Y., et al., *Convulsions in childhood malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(4): p. 426-8.
293. Bagot, S., et al., *Identification of two cerebral malaria resistance loci using an inbred wild-derived mouse strain*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002. **99**(15): p. 9919-23.
294. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
295. Horwitz, D.A., et al., *Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg*. Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 912-5.
296. Omer, F.M., J.B. de Souza, and E.M. Riley, *Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5430-6.
297. Omer, F.M. and E.M. Riley, *Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 39-48.

298. Omer, F.M., J.A. Kurtzhals, and E.M. Riley, *Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta?* Parasitol Today, 2000. **16**(1): p. 18-23.
299. Walther, M., et al., *Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection.* Immunity., 2005. **23**(3): p. 287-96.
300. Deininger, M.H., et al., *Differential cellular accumulation of transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3 in brains of patients who died with cerebral malaria.* J Infect Dis., 2000. **181**(6): p. 2111-5.
301. Perkins, D.J., J.B. Weinberg, and P.G. Kremsner, *Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity.* J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 988-92.
302. Chaiyaroj, S.C., et al., *Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria.* Acta Trop., 2004. **89**(3): p. 319-27.
303. Walther, M., et al., *Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria.* PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000364.
304. Bottner, M., K. Kriegstein, and K. Unsicker, *The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions.* J Neurochem, 2000. **75**(6): p. 2227-40.
305. Rifkin, D.B., et al., *TGF-beta: structure, function, and formation.* Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 177-9.
306. Polazzi, E., et al., *Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2.* J Neurochem, 2009. **27**: p. 27.
307. Bruno, V., et al., *Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor-beta.* J Neurosci, 1998. **18**(23): p. 9594-600.
308. McLennan, I.S., et al., *Transport of transforming growth factor-beta 2 across the blood-brain barrier.* Neuropharmacology, 2005. **48**(2): p. 274-82.
309. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.* Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 41-53.
310. Tran, N.D., et al., *Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors.* Stroke, 1999. **30**(8): p. 1671-8.

311. Medana, I.M., R. Idro, and C.R. Newton, *Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria*. J Neurol Sci, 2007. **258**(1-2): p. 93-8.
312. Haldar, K., et al., *Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease*. Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 217-49.
313. Susomboon, P., et al., *Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Parasitol Int, 2006. **55**(2): p. 107-12.
314. Dietmann, A., et al., *Opposed circulating plasma levels of endothelin-1 and C-type natriuretic peptide in children with Plasmodium falciparum malaria*. Malar J, 2008. **7**(253): p. 253.
315. Moxon, C.A., R.S. Heyderman, and S.C. Wassmer, *Dysregulation of coagulation in cerebral malaria*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **166**(2): p. 99-108.
316. Mohapatra, M.K., et al., *Hypohaptoglobinaemia as a biochemical and epidemiological marker of falciparum malaria*. J Assoc Physicians India, 1999. **47**(9): p. 874-7.
317. Rougemont, A., et al., *Hypohaptoglobinaemia as an epidemiological and clinical indicator for malaria. Results of two studies in a hyperendemic region in West Africa*. Lancet, 1988. **2**(8613): p. 709-12.
318. Medana, I.M. and G.D. Turner, *Human cerebral malaria and the blood-brain barrier*. Int J Parasitol, 2006. **36**(5): p. 555-68.
319. Miranda, J., et al., *Sickle-Cell Trait and Red Cell G6PD Status and Malaria Morbidity in Angola*. 5th European Congress on Tropical Medicine and International - . "International Proceedings Division". Health.; Amsterdam, The Netherlands . Boeree M.J. , 2007. **May 24-28**.: p.
320. Ackerman, H., et al., *A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria*. Ann Hum Genet., 2005. **69**(Pt 5): p. 559-65.
321. Migot-Nabias, F., et al., *Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon*. Genes Immun, 2000. **1**(7): p. 435-41.
322. Cabrera, G., et al., *The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens*. J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1631-8.

323. Cramer, J.P., et al., *Age-dependent effect of plasma nitric oxide on parasite density in Ghanaian children with severe malaria*. Trop Med Int Health., 2005. **10**(7): p. 672-80.
324. Clark, I.A., K.A. Rockett, and D. Burgner, *Genes, nitric oxide and malaria in African children*. Trends Parasitol, 2003. **19**(8): p. 335-7.
325. Cramer, J.P., et al., *iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children*. Trop Med Int Health., 2004. **9**(10): p. 1074-80.
326. Weinberg, J.B., et al., *Arginine, nitric oxide, carbon monoxide, and endothelial function in severe malaria*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(5): p. 468-75.
327. Boutlis, C.S., et al., *Nitric oxide production and nitric oxide synthase activity in malaria-exposed Papua New Guinean children and adults show longitudinal stability and no association with parasitemia*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6932-8.
328. Anstey, N.M., et al., *Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression*. J Exp Med., 1996. **184**(2): p. 557-67.
329. Ohashi, J., et al., *Absence of association between the allele coding methionine at position 29 in the N-terminal domain of ICAM-1 (ICAM-1(Kilifi)) and severe malaria in the northwest of Thailand*. Jpn J Infect Dis., 2001. **54**(3): p. 114-6.
330. Bienzle, U., et al., *Limited influence of haptoglobin genotypes on severe malaria in Ghanaian children*. Trop Med Int Health, 2005. **10**(7): p. 668-71.
331. Chanock, S.J., et al., *Replicating genotype-phenotype associations*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 655-60.
332. Liu, Y.J., et al., *Is replication the gold standard for validating genome-wide association findings?* PLoS ONE, 2008. **3**(12): p. e4037.
333. Freeman, J.L., et al., *Copy number variation: new insights in genome diversity*. Genome Res, 2006. **16**(8): p. 949-61.
334. Iafrate, A.J., et al., *Detection of large-scale variation in the human genome*. Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 949-51.
335. McElroy, J.P., et al., *Copy number variation in African Americans*. BMC Genet, 2009. **10**(1): p. 15.

## **ANEXOS**

---





## HOSPITAL PEDIÁTRICO DE LUANDA

### ACTA DA REUNIÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO HOSPITAL PEDIÁTRICO DE LUANDA (CEHPL)

Às 18 10 horas de 6 de Agosto de 2004, na Sala de Reuniões da Direcção do HPL, realizou-se a 1ª reunião da CEHPL.

Estiveram presentes Dra. Elizabeth Matos, Dra. Eufrasina Maiato, Dr. Francisco Domingos, Dr. Luis Bernardino e Dra. Vitória Espírito Santo

A Dra. Júlia Grave faltou justificadamente, por estar ausente em trabalho na província de Benguela..

No primeiro ponto da ordem de trabalhos, prestaram-se as informações requeridas sobre as finalidades da CEHPL e o c.c. dos seus membros..

Relativamente ao ponto 2 da OT, discutiu-se a proposta de Regulamento. Chegou-se finalmente a um consenso, com aprovação duma versão definitiva que fica anexa a esta acta.

Seguidamente, em cumprimento do Regulamento ora aprovado, procedeu-se à eleição do Presidente e do Secretário da Comissão. Foram eleitos a Dra. Eufrasina Maiato, como Presidente, e o Dr. Luis Bernardino, como Secretário.

O 3º e último ponto da OT era a emissão dum parecer sobre um projecto de investigação da Dra. Rosário Bragança, a ser realizado em doentes do HPL, com o tema, "Susceptibilidade genética à malária cerebral em crianças Angolanas", cujo protocolo e modelos de consentimento informado tinham sido previamente distribuídos aos membros com a convocatória da reunião. A Comissão atendeu ao facto de que as amostras de sangue das crianças para este trabalho podem ser feitas a partir de sangue recolhido para as finalidades inevitáveis de diagnóstico e tratamento, pelo que a criança não será submetida a nenhum procedimento adicional devido ao estudo. Apenas os Pais, se consentirem, fornecerão uma amostra de sangue expressamente para a investigação.

A comissão concluiu, em consequência, que o o projecto de investigação, para além do seu potencial valor científico, não atenta contra os direitos, segurança e bem estar das crianças que nele participarão, pelo que aprova a sua realização em doentes do HPL.

Sugere-se contudo, para esclarecimento e tranquilização dos familiares, as seguintes modificações nos modelos de consentimento informado :

Parágrafo 3, linha 3 :

Em vez de "... será necessário recolher uma amostra de sangue..."

Deve estar "... será necessário aproveitar uma pequena porção do sangue recolhido..."

Parágrafo 4, linha 1 :

Em vez de "... A recusa de participação da criança não causará nenhum problema e ela terá cuidados de assistência ...."

Deverá estar " ....Independemente da sua participação, todas as crianças terão os mesmos cuidados de assistência médica e medicamentosa ..."

A reunião terminou cerca das 21 15 horas.

O Secretário, Luis Bernardino



Rua Amílcar Cabral (Maianga)  
Caixa Postal 3067 ◊ LUANDA-ANGOLA  
Telefones: 33 46 62 – 39 15 45 / 5467 592 ◊ Fax 39 18 36





Conselho Científico

CC - 170  
5 de Julho de 2004

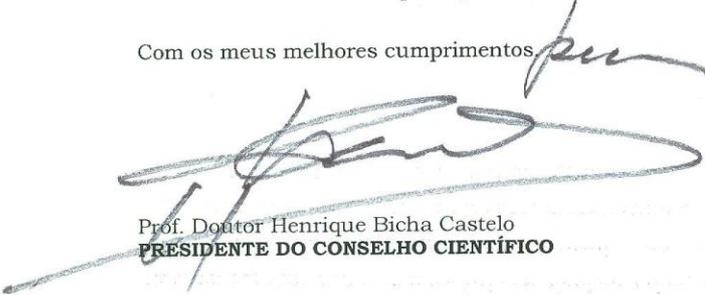
Exm<sup>a</sup>. Senhora  
Dr<sup>a</sup>. Maria do Rosário Bragança Sambo

Comunicou-me o Senhor Prof. Doutor J. Ribeiro da Silva que a Comissão de Ética da FML na sua Reunião de 25 de Junho de 2004, analisou o projecto de trabalho científico proposto pela Exma.Colega subordinado ao tema "Susceptibilidade genética à malária cerebral em crianças angolanas".

Foi então considerado necessário incluir no texto do trabalho, o **consentimento informado** a apresentar oralmente e por escrito aos pais das crianças intervenientes na investigação científica.

Será igualmente necessário incluir no texto, informação relativamente ao DNA quer das crianças quer de seus pais, o qual só pode ser utilizado para a finalidade da investigação proposta, aspecto que também deverá ser transmitido e consentido pelos pais das crianças que fazem parte do estudo.

Com os meus melhores cumprimentos,



Prof. Doutor Henrique Bicha Castelo  
**PRÉSIDENTE DO CONSELHO CIENTÍFICO**



## APÊNDICES

---



## SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À MALÁRIA CEREBRAL EM CRIANÇAS ANGOLANAS

### Termo de consentimento livre pós-informação

A malária cerebral (ou paludismo cerebral) é a forma mais grave de malária (paludismo) que afecta sobretudo crianças com menos do que cinco anos de idade.

Até ao momento, ainda não foi possível encontrar uma explicação para justificar porque razão somente alguns doentes desenvolvem esta complicação responsável por um grande número de mortes e de sequelas graves (atraso mental e motor e epilepsia).

Pretendemos investigar se em crianças angolanas existe alguma razão que as torna sensíveis à malária cerebral. Para tal, realizaremos um estudo em que será necessário aproveitar uma pequena porção do sangue recolhido para investigar alguns genes que poderão explicar esta situação. Este estudo não provocará nenhum tipo de problema à criança. O sangue e os dados colhidos, incluindo a informação relativa ao ADN, serão usados apenas para este estudo. Serão tomadas medidas rígidas para preservar o anonimato dos participantes neste estudo.

A participação neste estudo é voluntária. Independentemente da sua participação, todas as crianças terão os mesmos cuidados de assistência médica e medicamentosa

Tendo sido esclarecido sobre este estudo e convencido de que não acarretará nenhum transtorno para a criança, eu abaixo-assinado, (pai, mãe ou representante legal da criança) responsável pela criança com o nome de

\_\_\_\_\_ dou consentimento para a sua participação.

O responsável da criança \_\_\_\_\_

O médico \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

## SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À MALÁRIA CEREBRAL EM CRIANÇAS ANGOLANAS

### Termo de consentimento livre pós-informação

A malária cerebral (paludismo cerebral) é a forma mais grave de malária (paludismo) que afecta sobretudo crianças com menos do que cinco anos de idade.

Até ao momento, ainda não foi possível encontrar uma explicação para justificar porque razão somente alguns doentes desenvolvem esta complicação responsável por um grande número de mortes e de sequelas graves (atraso mental e motor e epilepsia).

Pretendemos investigar se em crianças angolanas existe alguma razão que as torna sensíveis à malária cerebral. Para tal, realizaremos um estudo em que será necessário aproveitar uma porção do sangue recolhido à criança doente, ao pai e à mãe para investigar alguns genes que poderão explicar esta situação. Este estudo não provocará nenhum tipo de problema à criança. O sangue e os dados colhidos, incluindo a informação relativa ao ADN, serão usados apenas para este estudo. Serão tomadas medidas rígidas para preservar o anonimato dos participantes neste estudo.

A participação neste estudo é voluntária. Independentemente da sua participação, todas as crianças terão os mesmos cuidados de assistência médica e medicamentosa

Tendo sido esclarecido sobre este estudo e convencido de que não acarretará nenhum transtorno para a criança nem para mim, eu abaixo-assinado pai ou mãe da criança com o nome de

\_\_\_\_\_

aceito participar neste estudo.

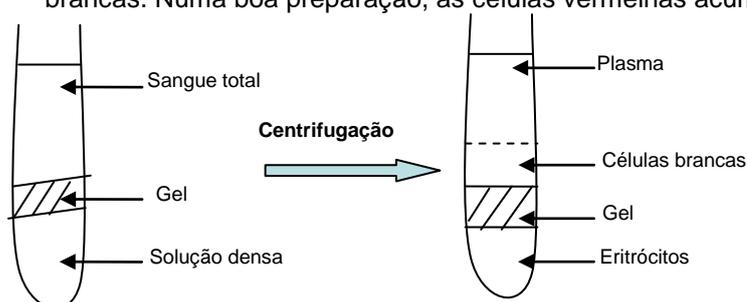
Nome \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

Obs.: fazer um círculo em pai ou mãe, conforme o caso.

### Isolamento e congelamento de células

1. Colher 7.5 ml de sangue venoso para o tubo CPT (*vacutainer*).
2. Manter o tubo entre 18-25 °C até processamento no laboratório (em regra menos de 48 horas).
3. Inverter o tubo 8-10 vezes até o sangue ter aspecto homogêneo.
4. Centrifugar a 1600 rpm durante 18 minutos a 10 °C, com travagem baixa.
5. Retirar os tubos da centrífuga com cuidado para não perturbar a interface.
6. Após a centrifugação são reconhecíveis duas camadas acima do gel: a camada transparente correspondente ao plasma e a camada translúcida correspondente às células brancas. Numa boa preparação, as células vermelhas acumulam-se no fundo do tubo.



7. Em câmara de fluxo laminar, retirar o plasma até chegar a fase translúcida (mas sem a perturbar) e guardar em tubos de congelação (idealmente, tubos *ependorf* de 2 ml). Estes tubos devem ser identificados e conservados a -70 °C.
8. Pipetar para cima e para baixo delicadamente a fase translúcida de modo a ressuspender as células brancas que estão em contacto com o gel.
9. Distribuir a suspensão celular à razão de 1 ml por tubo de congelação previamente etiquetado e arrefecido (mantido em gelo de preferência). Juntar ao tubo de congelação 1 ml de meio de congelamento frio. Inverter o tubo de congelação várias vezes para homogeneizar e colocar imediatamente a -20 °C até à congelação. O tempo entre o final da centrifugação e a congelação deve ser minimizado para garantir uma boa viabilidade celular. Meio de Congelamento – 1 ml FCS (soro de feto bovino) + 10% DMSO (dimetil sulfóxido).
10. Depois de congelados, os tubos com as células são transferidos para -70 °C.
11. O sedimento de glóbulos vermelhos pode ser recolhido para determinação de parasitas no sangue. A colheita de 400-500 µL de sedimento pode ser feita por pipetagem após perfuração do gel (por exemplo com pipeta de vidro). Esta amostra pode ser conservada a 4°C. A utilização desta amostra não deve impedir que a determinação da parasitémia se possa fazer pelo habitual método de gota espessa.



**Sequência de *primers* para a reacção em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de *Plasmodium spp.***

Especificidade	Designação do <i>primer</i> (frw/ver)	Tamanho do produto	Sequência do <i>primer</i>
<b>1ª Reacção <i>Plasmodium</i> (género)</b>	rPLU6/ rPLU5	1,2 kb	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG/ CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC
<b>2ª Reacção <i>Plasmodium</i> (espécies)</b>			
<i>P.falciparum</i>	rFAL1/ rFAL2	205 bp	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT/ ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC
<i>P.vivax</i>	rVIV1/ rVIV2	120 bp	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC/ ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA
<i>P.malariae</i>	rMAL1/ rMAL2	144 bp	ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC/ AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA
<i>P.ovale</i>	rOVA1/ rOVA2	~800 bp	ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA/ GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG

**Ciclos utilizados na reacção de PCR**

**1ª Reacção**

Passo 1	95°C	5 min	Desnaturação inicial
Passo 2	58°C	2 min	Hibridação dos <i>primers</i> ("annealing")
Passo 3	72°C	2 mi1	Extensão
Passo 4	94°C	1 min	Desnaturação
Passo 5	Repetir passos 2-4, 25 vezes		
Passo 6	58°C	2 min	Hibridação final
Passo 7	72°C	5 min	Extensão
Passo 8	20°C		

O programa do termociclador da 1ª reacção é idêntico ao da 2ª reacção, excepto o passo 5 em que os passos 2-4 são repetidos 30 vezes.



Tabela Suplementar A. Polimorfismos genotipados em todos os genes estudados.

GENE	Cromossoma	SNP	Posição (pb)	Alelos	Taxa genotipagem	HWE
CR1	1	RS17047660	205849479	A/G	0,97	0,60
CR1	1	RS17047661	205849512	G/A	0,98	0,82
TGFB2	1	RS11118090	216616326	A/T	1,00	0,00
TGFB2	1	RS12097734	216607090	C/T	0,98	0,63
TGFB2	1	RS12405805	216658738	G/A	0,98	0,01
TGFB2	1	RS1317681	216641825	C/T	0,98	0,56
TGFB2	1	RS1342586	216664482	C/T	0,98	0,55
TGFB2	1	RS1417488	216590353	G/A	0,97	0,68
TGFB2	1	RS1418553	216676877	C/T	0,98	0,07
TGFB2	1	RS1418554	216589886	G/A	0,94	0,44
TGFB2	1	RS1418555	216590273	A/G	0,98	0,72
TGFB2	1	RS1473527	216688942	A/G	0,97	0,45
TGFB2	1	RS1891467	216646608	G/A	0,95	0,60
TGFB2	1	RS1934852	216661543	C/A	0,97	0,25
TGFB2	1	RS2796821	216652444	C/T	0,97	0,82
TGFB2	1	RS2799086	216622825	T/C	0,96	0,21
TGFB2	1	RS2799090	216635452	G/A	0,95	0,96
TGFB2	1	RS3892225	216619920	A/G	0,98	0,46
TGFB2	1	RS4625350	216609934	G/T	0,97	0,90
TGFB2	1	RS4846476	216592851	G/C	0,98	0,32
TGFB2	1	RS4846478	216664951	C/G	0,97	0,11
TGFB2	1	RS6604607	216618910	C/T	0,98	0,92
TGFB2	1	RS6657275	216663084	A/G	0,97	0,18
TGFB2	1	RS6671370	216663667	G/A	0,97	0,20
TGFB2	1	RS6684205	216676325	A/G	0,98	0,15
TGFB2	1	RS6691619	216615038	G/A	0,95	0,81
TGFB2	1	RS6703224	216641412	C/T	0,98	0,72
TGFB2	1	RS900	216681528	A/T	0,99	0,02
TGFB2	1	RS947712	216631504	A/G	0,98	0,25
TNF	6	RS1799724	31650461	C/T	0,98	0,80
TNF	6	RS1800629	31651010	G/A	0,99	0,41
TNF	6	RS1800750	31650942	G/A	0,98	0,83
TNF	6	RS3093544	31649758	A/G	0,98	0,97
TNF	6	RS3093662	31652168	A/G	0,98	0,82
TNF	6	RS3093664	31652621	A/G	0,98	0,40
TNF	6	RS361525	31651080	G/A	0,97	0,63

(Continua)

Tabela Suplementar A (Continuação).

GENE	Cromossoma	SNP	Posição (pb)	Alelos	Taxa genotipagem	HWE
CD36	7	RS1049654	80113391	C/A	0,97	0,25
CD36	7	RS1194182	80069440	G/C	0,97	0,51
CD36	7	RS1358337	80126321	T/C	0,96	0,23
CD36	7	RS1527463	80114267	A/G	0,95	0,98
CD36	7	RS3211808	80114427	T/C	0,95	0,00
CD36	7	RS3211810	80114953	T/G	0,98	0,25
CD36	7	RS3211811	80115254	T/C	0,98	0,48
CD36	7	RS3211820	80116401	C/A	0,87	0,28
CD36	7	RS3211821	80116499	A/G	0,97	0,35
CD36	7	RS3211849	80121259	G/A	0,98	0,36
CD36	7	RS3211909	80132051	C/T	0,37	0,00
CD36	7	RS3211958	80142008	G/A	0,98	0,27
CD36	7	RS7755	80144207	A/G	0,98	0,21
CD36	7	<b>-144delA/-</b>	-	A	-	
CD36	7	<b>G1439C</b>	-	G	-	
TLR4	9	RS4986790	119515123	G/A	0,97	0,66
TLR4	9	RS4986791	119515423	C/T	0,98	0,90
MBL2	10	RS1800450	54201241	G/A	0,98	0,00
MBL2	10	RS1800451	54201232	G/A	0,97	0,36
HBB	11	RS334	5204808	A/T	0,97	0,00
HP	16	RS5469	70645919	A/T	0,70	0,00
HP	16	RS5470	70645922	C/G	0,90	0,02
HP	16	RS5471	70645962	A/C	0,95	0,00
NOS2A	17	RS11080358	23154723	G/A	0,98	0,20
NOS2A	17	RS11653716	23108659	C/G	0,98	0,50
NOS2A	17	RS16966545	23128749	T/A	0,98	0,57
NOS2A	17	RS16966563	23140076	T/C	0,98	0,75
NOS2A	17	RS1800482	23152636	G	0,98	1,00
NOS2A	17	RS2072324	23141023	C/A	0,98	0,04
NOS2A	17	RS2297513	23117111	C/T	0,97	0,16
NOS2A	17	RS2779248	23151959	T/C	0,98	0,26
NOS2A	17	RS2779249	23152708	C/A	0,98	0,32
NOS2A	17	RS2872753	23119689	G/A	0,98	0,14
NOS2A	17	RS28973255	23152400	C/A	0,51	0,02
NOS2A	17	RS28998790	23153141	G/A	0,98	0,30
NOS2A	17	RS28998796	23150763	C/T	0,41	0,00
NOS2A	17	RS28998799	23150264	G	0,97	1,00
NOS2A	17	RS3729507	23112559	G/C	0,99	0,19
NOS2A	17	RS3729508	23133157	G/A	0,98	0,93
NOS2A	17	RS3729720	23123451	C/T	0,98	0,68
NOS2A	17	RS3729727	23111443	G/A	0,98	0,17
NOS2A	17	RS3730013	23150045	T/C	0,99	0,04
NOS2A	17	RS3730017	23133229	C/T	0,98	0,48
NOS2A	17	RS3794756	23110756	C/T	0,98	0,07
NOS2A	17	RS3794766	23146048	C/T	0,99	0,00
NOS2A	17	RS4239250	23127214	A/G	0,98	0,34
NOS2A	17	RS4795067	23130802	A/G	0,98	0,68

(Continua)

Tabela Suplementar A. (Continuação)

GENE	Cromossoma	SNP	Posição (pb)	Alelos	Taxa genotipagem	HWE
NOS2A	17	RS6505469	23136013	T/A	0,98	0,56
NOS2A	17	RS6505483	23150472	G/A	0,98	0,85
NOS2A	17	RS7208775	23109235	G/C	0,29	0,00
NOS2A	17	RS8068149	23112982	A/G	0,97	0,75
NOS2A	17	RS8078340	23153339	G/A	0,97	0,12
NOS2A	17	RS9282799	23152855	C/T	0,98	1,00
NOS2A	17	RS9282801	23120600	G/T	0,98	0,12
NOS2A	17	RS9895831	23113392	C/T	0,98	0,00
PECAM1	17	RS668	59804699	G/C	0,98	0,95
ICAM5	19	RS11575074	10262120	G/A	0,98	0,90
ICAM5	19	RS2075741	10262098	G/C	0,98	0,19
ICAM1	19	RS281432	10251658	G/C	0,98	0,15
ICAM5	19	RS281438	10260375	G/T	0,98	0,63
ICAM4	19	RS3093030	10258403	C/T	0,99	0,59
ICAM1	19	RS5030351	10246417	C/T	0,98	0,55
ICAM1	19	RS5490	10242827	C/A	0,44	0,04
ICAM1	19	RS5491	10246540	A/T	0,98	0,41
ICAM5	19	RS5496	10256447	G/A	0,98	0,89
ICAM1	19	RS5497	10256468	G/A	0,98	0,36
ICAM4	19	RS5498	10256683	A/G	0,96	0,66
TGFB1	19	RS11466316	46551176	C/T	0,97	0,35
TGFB1	19	RS11466345	46535301	G/A	0,84	0,00
TGFB1	19	RS2241715	46548726	G/T	0,97	0,04
TGFB1	19	RS2241716	46545926	G/A	0,97	0,00
TGFB1	19	RS4803455	46543349	C/A	0,98	0,83
IL10RB	21	RS1058867	33591251	A/G	0,98	0,56
IL10RB	21	RS3171425	33590617	A/G	0,98	0,64
IFNAR1	21	RS2243594	33629931	A/G	0,71	0,00
IFNAR1	21	RS2257167	33637569	G/C	0,97	0,89
IFNAR1	21	RS2843710	33618577	C/G	0,97	0,68
IFNAR1	21	268710 (g-a)	33626147	A/G	-	-
IFNAR1	21	279923 (c-t)	33614933	C/T	-	-
HMOX1	22	RS11912889	34113617	G/A	0,97	0,36
HMOX1	22	RS17878600	34104876	C/T	0,97	0,15
HMOX1	22	RS17880288	34120323	A/T	0,98	0,26
HMOX1	22	RS17883419	34121971	C/T	0,98	0,23
HMOX1	22	RS2071746	34106672	T/A	0,98	0,22
HMOX1	22	RS2071748	34107618	A/G	0,99	0,11
HMOX1	22	RS2285112	34119263	G/A	0,98	0,32
HMOX1	22	RS5999817	34121108	T/C	0,98	0,21
HMOX1	22	RS7285877	34111214	C/T	0,97	0,28
HMOX1	22	RS8139532	34109568	G/A	0,98	0,34
HMOX1	22	RS9622194	34116963	G/A	0,98	0,35



Tabela Suplementar B. **Localização dos polimorfismos associados à malária cerebral e/ou à malária severa nos respectivos genes.**

Gene	Cromossoma	dbSNP	Localização no gene
TGFB2	1	rs1317681	Intrão
		rs1934852	Intrão
		rs6657275	Intrão
		rs1342586	Intrão
		rs4846478	Intrão
		rs6684205	Intrão
		rs1418553	Intrão
		rs900	3'-UTR
		rs1473527	Intergénica
CD36	7	rs1194182	5' near gene
		rs3211821	Intrão
		rs1358337	Intrão
HBB	11	rs334	Exão
HP	16	rs5471	5' near gene
PECAM1	17	rs668	Exão
NOS2A	17	rs11653716	Intrão
		rs3729508	Intrão 7
		rs3730017	Exão 7
		rs6505469	Intrão 5
		rs16966563	Intrão 4
		rs3730013	Intrão 1
		rs9282799	3' near gene
IFNAR1	21	268710 (g-a)	5'UTR
		rs2843710	5' near gene
		279923 (c-t)	Intrão
HMOX1	22	rs2071748	Intrão
		rs8139532	Intrão 2
		rs7285877	Intrão 2
		rs11912889	Intrão 3
		rs9622194	Intrão 4



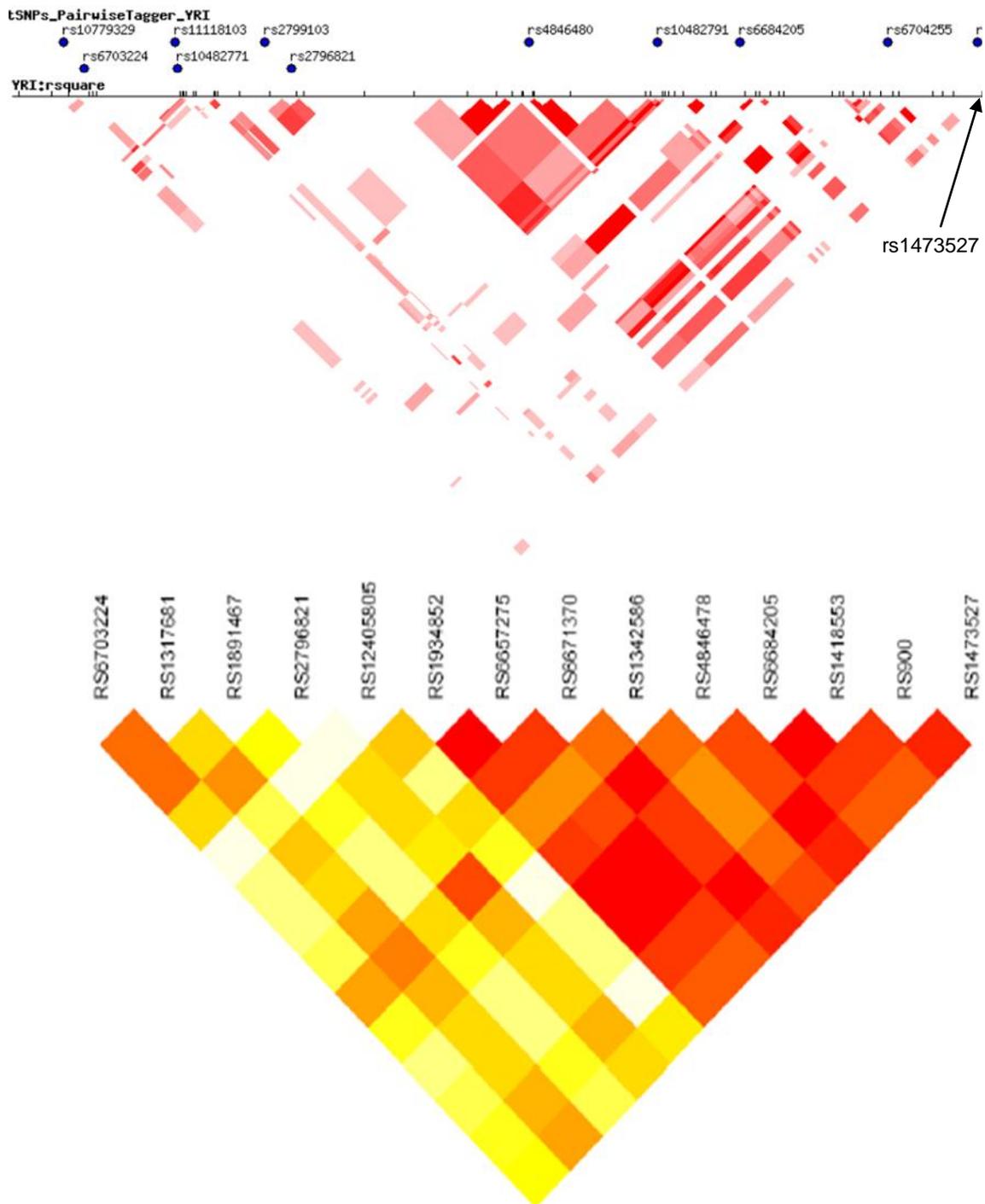


Figura Suplementar 1. **Comparação entre os mapas de LD do gene *TGF2* da população nigeriana yoruba (YRI) do projecto HapMap (mapa superior) e o da população angolana do presente estudo (mapa inferior).**

Os mapas de LD cobrem uma extensão de 47,5 kb da região estrutural do gene *TGF2*. O mapa de LD da população nigeriana foi adaptado de *HapMap Data Rel 27 PhaseII+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126*.



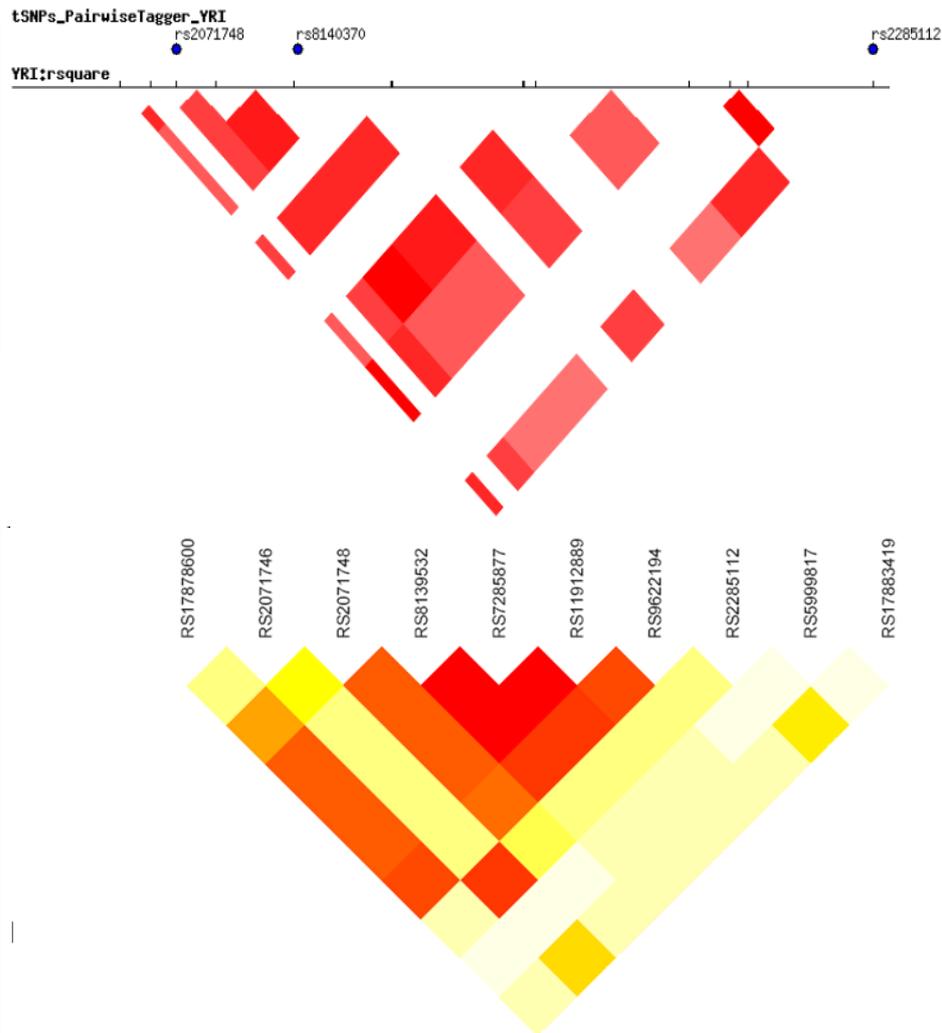


Figura Suplementar 2. **Comparação entre os mapas de LD do gene *HMOX1* da população nigeriana yoruba (YRI) do projecto HapMap (mapa superior) e o da população angolana do presente estudo (mapa inferior).**

Os mapas de LD cobrem uma extensão de 17,1 kb que inclui a região estrutural do gene. O mapa de LD da população nigeriana foi adaptado de *HapMap Data Rel 27 PhaseII+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126*.



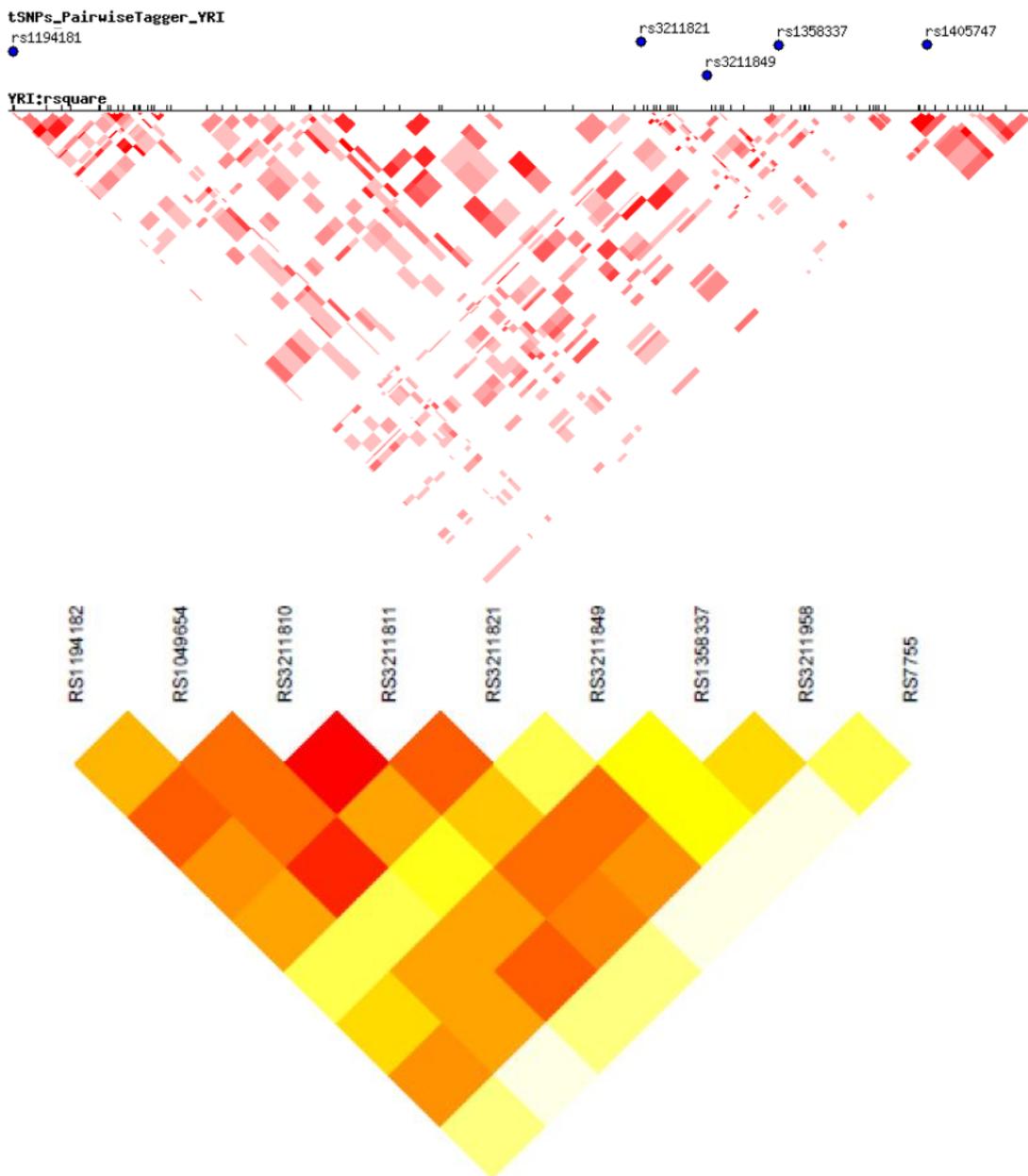


Figura Suplementar 3. **Comparação entre os mapas de LD do gene *CD36* da população nigeriana yoruba (YRI) do projecto HapMap (mapa superior) e o da população angolana do presente estudo (mapa inferior).**

Os mapas de LD cobrem uma extensão de 74,7 kb que inclui a parte da região estrutural do gene. O mapa de LD da população nigeriana foi adaptado de *HapMap Data Rel 27 PhaseII+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126*.



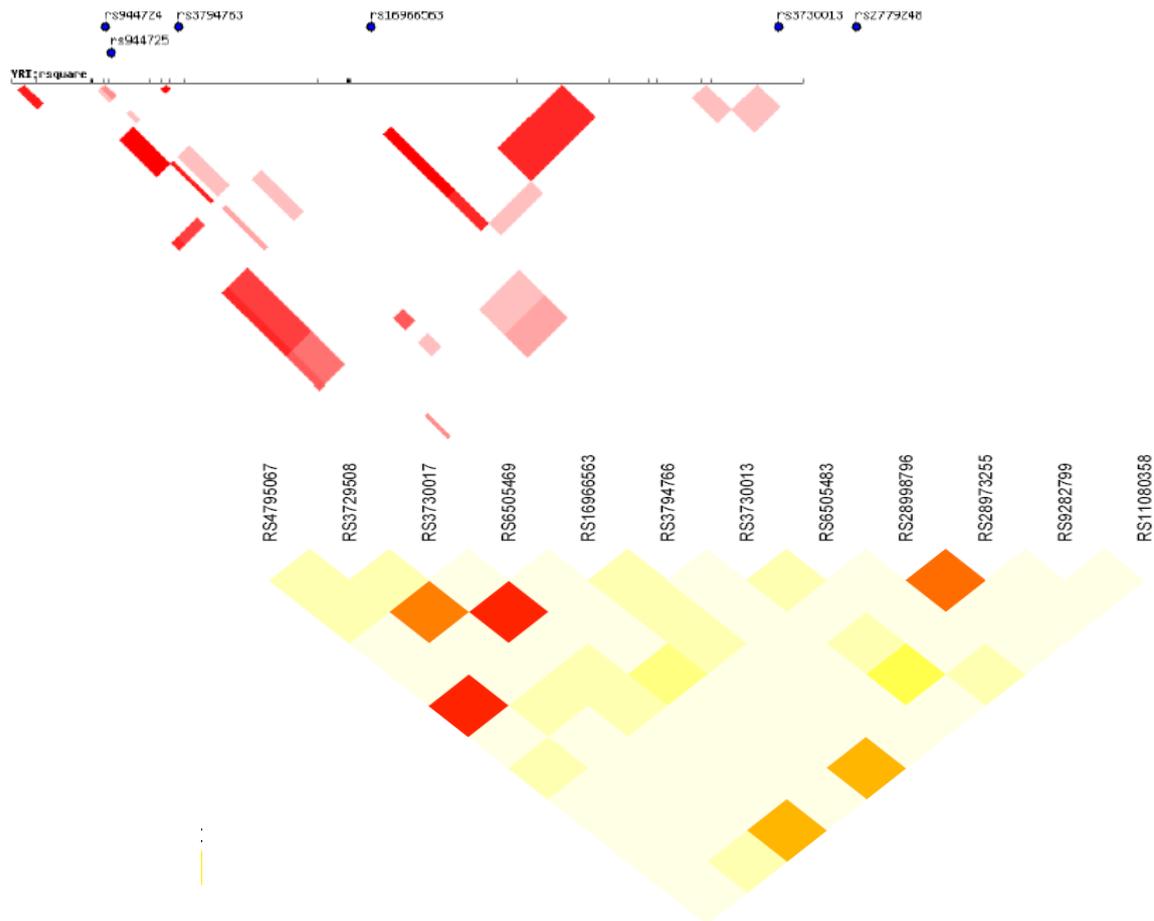


Figura Suplementar 4. 23Comparação entre os mapas de LD do gene *NOS2* da população nigeriana yoruba (YRI) do projecto HapMap (imagem superior) e o da população angolana do presente estudo (imagem inferior).

O mapa de LD da imagem superior cobre uma extensão de 23,9 kb na região estrutural do gene. O mapa de LD da população nigeriana foi adaptado de *HapMap Data Rel 27 PhaseII+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126*.