

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ENZIMAS GLUTATIONA S-
TRANSFERASE (*Genes GSTT1, GSTM1 E GSTP1*) EM PACIENTES
COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*.**

BRENA DE LOURDES AGUIAR LIMA

MANAUS

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

BRENA DE LOURDES AGUIAR LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ENZIMAS GLUTATIONA S-
TRANSFERASE (*Genes GSTT1, GSTM1 E GSTP1*) EM PACIENTES
COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*.**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Amazonas,
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. PhD. José Pereira Moura Neto

MANAUS

2013

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ENZIMAS GLUTATIONA S-TRANSFERASE (*Genes GSTT1, GSTM1 E GSTP1*) EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*.

BRENA DE LOURDES AGUIAR LIMA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Biomarcadores de Diagnóstico de Doenças Prevalentes na Amazônia, Linha de pesquisa: Marcadores Moleculares de Doenças Prevalentes na Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Prof^ª. Dra Marne Carvalho de Vasconcelos

Coordenadora PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof^º. PhD. José Pereira de Moura Neto – Presidente e Orientador

Universidade Federal do Amazonas

Prof^ª. Dra. Marilda de Souza Gonçalves – Membro Externo

Fiocruz

Prof^ª. Dra. Jaila Dias Borges – Membro

Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 8 de abril de 2013.

Dedico este trabalho a:

Meus pais, Maria do Carmo Oliveira Aguiar e Glacimar Gomes Lima, que sempre me apoiaram durante a vida acadêmica com palavras de incentivo e amor incondicional.

As minhas irmãs, Vanine de Lourdes Aguiar Lima e Lana de Lourdes Aguiar Lima, e ao meu cunhado Silvio César Fragoso, pelo companheirismo, amizade e toda ajuda durante esta etapa.

Ao meu querido Iomar Rodrigues Jr, companheiro em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a minha família e a Deus, por serem meus alicerces em todos os momentos;

Ao meu orientador, José Pereira de Moura Neto, por toda dedicação, paciência e ensinamentos prestados durante os dois anos do desenvolvimento deste trabalho;

A Pritesh Lalwani, pela colaboração com a língua inglesa;

As minhas companheiras de laboratório Rita de Cássia Mascarenhas Netto, Jaqueline Silva de Jesus e Jéssica Lorena Mathias, pelo auxílio prestado durante a parte experimental deste estudo;

Ao programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, pela estrutura disponibilizada para a execução deste trabalho;

À Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, mas precisamente ao Dr. Marcus Lacerda, por ceder às amostras e todos os dados necessários para a pesquisa;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram com a execução deste trabalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas, com atividades realizadas também no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

RESUMO

Plasmodium vivax acomete aproximadamente 40% da população mundial, com um amplo espectro de manifestações clínicas, desde formas assintomáticas a infecções graves. Polimorfismos nos genes da Glutathione S-transferase (GST) influenciam a capacidade das isoenzimas de reduzir o estresse oxidativo. Usando métodos moleculares nós identificamos e comparamos polimorfismos nos genes da GST em 175 pacientes com malária vivax não-grave (n=118) e grave (n=57). Não houve diferenças estatísticas nas frequências alélicas das GSTs entre os pacientes com malária não grave e grave. No entanto, quando comparou-se os parâmetros bioquímicos e hematológicos no grupo com malária grave, observamos que pacientes com deleção no gene *GSTM1* apresentaram maior contagem plaquetária ($p=0.04$), sugerindo menor risco de trombocitopenia. Além disso, pacientes com deleção única e/ou dupla nos genes *GSTT1* e *GSTM1* demonstraram menor risco de desenvolverem trombocitopenia ($p=0.045$, $p=0.026$, respectivamente) em comparação com os pacientes portadores do genótipo selvagem. Em contraste, indivíduos com malária grave e portadores dos genótipos heterozigotos ou homozigotos para a mutação A313G no gene *GSTP1* apresentaram maior risco de desenvolverem icterícia ($p=0.034$, $p=0.022$, respectivamente) e anemia, como demonstrado pelos menores níveis de hemácias ($p=0.008$, $p=0.019$, respectivamente) e hematócrito ($p=0.008$). Nossos resultados não indicam apenas uma influência direta dos polimorfismos das GSTs nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, mas também o seu potencial de avaliar a progressão da doença.

Palavras - chaves: Polimorfismos, Glutathione S-Transferase, suscetibilidade, malária vivax, gravidade.

ABSTRACT

Plasmodium vivax threatens ~40% of the world's population, with a wide spectrum of asymptomatic to severe clinical manifestations. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms have been shown to influence their ability to reduce oxidative stress. Using molecular tools we identified and compared *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* gene polymorphism in 175 uncomplicated (n=118) and severe (n=57) vivax patients. There were no differences in the frequency of GST alleles between uncomplicated and severe malaria. Nevertheless, a comparison of biochemical and hematological parameters in severe malaria, we observed patients with *GSTM1* double-deletion had more platelets ($p<0.04$) suggesting a decreased risk of thrombocytopenia. In addition, patients with single and/or double deletion of *GSTT1* and *GSTM1* also had a reduced risk for thrombocytopenia ($p<0.045$, $p<0.026$, respectively) compared to wild type allele. In contrast, individuals with *GSTP1* heterozygous or homozygous A313G mutation had an increased risk of jaundice ($p<0.034$, $p<0.022$) and anemia as observed with decreased RBCs ($p<0.008$), hemoglobin ($p<0.019$) and hematocrit ($p<0.008$) levels in serum. Our results, not only indicate a direct influence of GST polymorphism on biochemical parameters but also its diagnostic potential in assessing disease progression during clinical malaria.

Keywords: polymorphisms, Glutathione S-transferase, susceptibility, vivax malaria, severity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT- Alanina AminoTransferases

AST- Aspartato AminoTransferases

CAT - Catalase

CONEP - Comissão Nacional de Ética em pesquisa

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado

GST - Glutathione S-Transferase

GSTA - Glutathione S-Transferase – Gene alpha

GSTM1 - Glutathione S-Transferase – Gene mu 1

GSTP1 - Glutathione S-Transferase – Gene pi 1

GSTT1 - Glutathione S-Transferase – Gene theta 1

GSTK - Glutathione S-Transferase – Gene kappa

GSTO - Glutathione S-Transferase – Gene omega

GSTS - Glutathione S-Transferase – Gene sigma

GSTZ - Glutathione S-Transferase – Gene zeta

GR - Glutathione Redutase

G6PD – Desidrogenase da Glicose 6 fosfato

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Dissulfeto

Hb – Hemoglobina

Ht – Hematócrito

HIV- vírus da imunodeficiência humana

HBV- vírus da hepatite B

HCV- vírus da hepatite C

HDV- vírus da hepatite D

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

IFN - γ – Interferon gama

IL – Interleucina

Kb – Quilobases.

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

O₂⁻ - radical superóxido

O₂ - oxigênio

OH⁻ - radical hidroxila

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

PK – Piruvato Quinase

RDW- Do Inglês *Red Cell Distribution Width* (Índice de anisocitose)

RFLP – Do Inglês *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismos por tamanho de fragmentos de restrição)

ROS – Do Inglês *Reactive oxygen species* (Espécies reativas do oxigênio)

SIVEP – Sistema de vigilância epidemiológica

SNP – Do Inglês *Single nucleotide polymorphisms* (Polimorfismo de base única)

SOD – Superóxido dismutase

TLR- Do Inglês *Toll like receptors* (Receptores do tipo Toledo)

TNF- Fator de necrose tumoral

WBC- Do Inglês *White Blood Cells* (Células brancas sanguíneas)

WHO – Do Inglês *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Países e áreas de risco de transmissão da Malária.....	8
Figura 2: Número de casos de malária registrados entre os anos de 1960 a 2009 na Amazônia Brasileira.....	11
Figura 3: Casos de malária registrados pela FMT-HVD no ano de 2012.....	12
Figura 4: Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium vivax</i>	13

LISTA DE TABELAS/QUADROS

Tabela 1: Indicadores da malária grave e pior prognóstico.....	17
Quadro 1: Primers para amplificação dos genes GSTM1 e GSTT1.....	36
Quadro 2: Reagentes para preparo do Mix da PCR Multiplex.....	37
Quadro 3: Condições de amplificação PCR Multiplex.....	38
Quadro 4: Primers para amplificação do gene GSTP1.....	39
Quadro 5 : Reagentes para preparo do Mix da PCR.....	40
Quadro 6: Condições de amplificação PCR-RFLP.....	41
Tabela 2: Associações entre os genótipos das GSTs e manifestações clínicas em pacientes com malária vivax.....	81

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS/QUADROS

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
2.1	Aspectos Epidemiológicos da Malária.....	6
2.1.1	A Malária no Mundo.....	6
2.1.2	A Malária no Brasil.....	9
2.2	Ciclo Biológico do <i>Plasmodium sp.</i>.....	13
2.3	Doença Malárica.....	15
2.3.1	Malária Não Grave.....	15
2.3.2	Malária Grave.....	16
2.3.3	Malária Grave por <i>Plasmodium vivax</i>.....	18
2.4	Fatores Genéticos do Hospedeiro Humano e a Doença Malárica.....	20
2.5	Estresse Oxidativo na Malária.....	22
2.6	Glutationa S-Transferases.....	26
2.7	Polimorfismos nos genes GSTT1, GSTM1 e GSTP1 e Malária.....	28
3	OBJETIVOS.....	30

3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Tipo de Estudo.....	33
4.2 Local do Estudo.....	33
4.3 Aspectos Éticos.....	33
4.4 Amostras do Estudo.....	34
4.5 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	34
4.6 Análise Molecular.....	34
4.6.1 Extração do DNA.....	34
4.6.2 PCR Multiplex.....	35
4.6.3 PCR-RFLP.....	39
4.7 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS	43
6 CONCLUSÃO.....	76
7 PERSPECTIVAS.....	78
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	98
Documento de Aprovação do Projeto em Comitê de Ética (CONEP).....	99
Protocolo de Extração do DNA.....	102
Gel de agarose para análise dos produtos da PCR.....	103

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, a malária se destaca como importante problema de saúde pública em vários países da Ásia, África, América Central e América do Sul. No Brasil, 99,8% dos casos da malária são oriundos da região Amazônica, considerada área endêmica, sendo o *Plasmodium vivax* a espécie de maior prevalência, e responsável por aproximadamente 84% dos casos registrados em 2009 (OLIVEIRA - FERREIRA et al., 2010).

Embora a malária *vivax* cause menor mortalidade em comparação com a malária *falciparum*, as freqüentes recaídas produzidas pelos hipnozóitos da espécie *P. vivax* podem ser responsáveis pela grande morbidade da doença, comprometendo o desenvolvimento sócio-econômico e intelectual dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2010).

As manifestações clínicas e resultados laboratoriais observados nos pacientes durante a infecção permitem a classificação da doença em malária grave e malária não grave.

A malária grave é definida como a infecção com manifestações e complicações potencialmente fatais no homem. Nos últimos anos, tem sido observado um aumento na freqüência dos casos da malária grave por *P. vivax* em áreas endêmicas do Brasil (ALEXANDRE et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2010; LACERDA et al., 2012), Indonésia (TRIIJA et al., 2008; POESPRODJO et al., 2009) e Índia (KOCHAR et al., 2005; 2009).

As manifestações graves da malária *vivax* já relatadas na literatura são: malária cerebral, anemia grave, pancitopenia e trombocitopenia, icterícia, ruptura do baço, insuficiência renal aguda, síndrome da angústia respiratória aguda, edema pulmonar, convulsões, choque e insuficiência hepática (KOCHAR et al., 2005, 2009; PRICE et al., 2007; ALEXANDRE et al., 2010; GEORGE & ALEXANDER, 2010; COSTA et al., 2011).

Ainda não estão claros quais são os mecanismos fisiopatogênicos relacionados à malária *vivax* grave. O grande desafio para o entendimento da clínica da doença é estabelecer sob quais circunstâncias a infecção se torna grave ou mesmo fatal.

A malária exerceu grande impacto na seleção natural. Hoje sabemos que uma combinação de fatores ambientais, do patógeno e do hospedeiro participa na suscetibilidade aos agentes infecciosos como na gravidade da doença (ANSTEY et al., 2009).

Estima-se que aproximadamente 25% do risco de progressão para formas graves da malária sejam determinadas por variações no genótipo do hospedeiro, porém, pouco se conhece sobre quais variantes genéticas podem interferir na suscetibilidade ao desenvolvimento das manifestações clínicas da malária *vivax* (MANJURANO et al., 2012).

O desenvolvimento e melhoramento das técnicas moleculares como da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e o seqüenciamento automático de DNA permitiram importantes avanços na detecção de variações genéticas em diferentes populações.

Polimorfismos genéticos em enzimas antioxidantes e a relação com a fisiopatologia de diversas doenças têm sido descritos de forma constante na literatura científica (MINELLI & GOGELE, 2011).

Vários genes que codificam as isoformas da Glutathione S-Transferase (GST) foram caracterizados como polimórficos, com variações na frequência dos genótipos entre diferentes grupos étnicos e geográficos (HIRAGI, 2010).

Alguns trabalhos têm demonstrado associações entre alelos polimórficos da GST, particularmente os que conferem perda ou comprometimento da atividade catalítica, com a suscetibilidade ao desenvolvimento das complicações clínicas durante a malária por *P. falciparum* (KAVISHE et al., 2006;2009).

Não há descrições na literatura a respeito dos polimorfismos nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* e uma possível associação com a gravidade da infecção por *P. vivax*.

Estudos sobre a influência dos polimorfismos em enzimas da defesa antioxidante do hospedeiro na suscetibilidade ao desenvolvimento das manifestações clínicas da malária *vivax* podem definir um padrão de risco individual, além de possibilitar a descoberta de possíveis marcadores moleculares de risco ou proteção para formas clínicas graves da doença.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos Epidemiológicos da Malária

2.1.1 A Malária no Mundo

Considerada a doença parasitária mais importante em todo o mundo, a malária é um problema de saúde pública em muitos países de climas tropicais e subtropicais, ocorrendo em mais de 106 países da África, Ásia, América Central e América do Sul (WHO, 2011) (Figura 1). De acordo com World Health Organization (WHO) Malaria Report 2011, mais de 200 milhões de casos da doença e 655.000 mortes são registrados anualmente.

A malária é uma doença infecciosa transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles sp.*, cujos agentes etiológicos são protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium sp.* Apesar de quatro espécies serem responsáveis pela doença humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*, a maior parte da carga global da doença deve-se às espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (QUINTERO et al., 2011).

As maiores taxas de mortalidade causadas pela malária ocorrem na África Subsaariana, Sudeste Asiático e áreas do Mediterrâneo Oriental (WHO, 2011). Na grande maioria dos casos, é atribuída a espécie *P. falciparum* a responsabilidade pela mortalidade associada à malária (GUERRA et al., 2008).

Estima-se que a malária por *P. falciparum* seja responsável pela morte de mais de um milhão de crianças com idade inferior a cinco anos na África todos os anos (KREUELS et al., 2010).

A espécie *P. vivax* é responsável por 25 a 40% dos casos de malária no mundo (DHARIA et al., 2010). Estudos estimaram que no ano de 2009, aproximadamente 2,85

bilhões de pessoas encontravam-se expostas ao risco de transmissão da malária por *P. vivax* (GUERRA et al., 2010).

Negligenciada por muitos anos, a malária *vivax* foi considerada uma doença benigna e auto-limitada, na qual os casos graves e fatais eram associados à infecção por *P. falciparum* (PICOT, 2006). No entanto, recentes trabalhos demonstraram que a espécie *P. vivax* causa grande morbidade em áreas endêmicas, sendo mais difícil de ser controlada e eliminada do que a malária por *P. falciparum* devido à capacidade de causarem recaídas tardias da doença (WHITE, 2011).

Malaria, countries or areas at risk of transmission, 2010

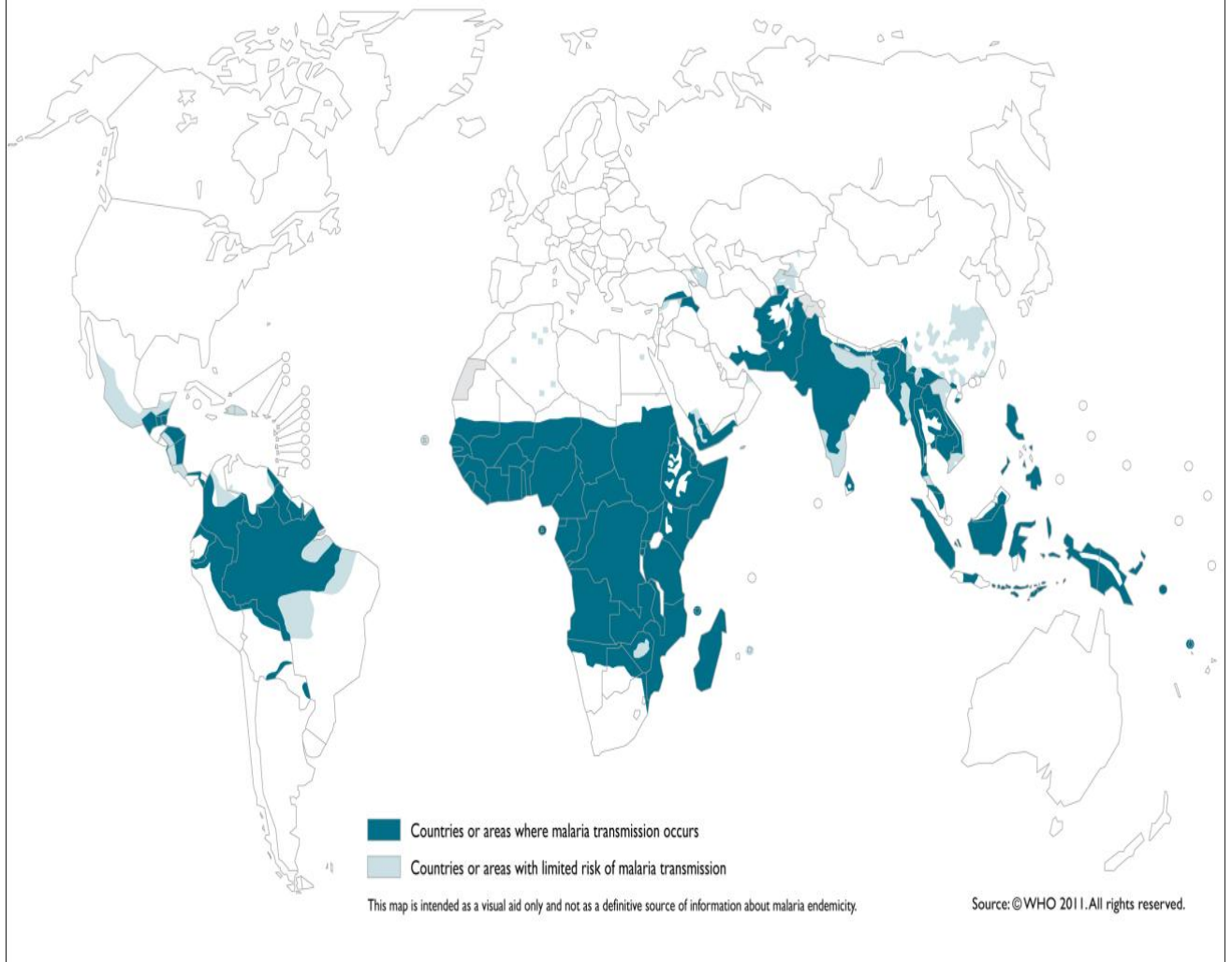


Figura 1: Países e áreas de risco de transmissão da Malária.

Fonte: WHO, 2011.

2.1.2 A Malária no Brasil

O Brasil é o principal responsável pela grande morbidade atribuída à malária no continente Americano (WHO, 2011). No país, três espécies de *Plasmodium sp.* podem ser encontradas infectando o homem, com o *P. vivax* acometendo 84% dos casos registrados, *P. falciparum* 16% e o *P. malariae* raramente diagnosticado. (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Aproximadamente 99% dos casos de malária no Brasil ocorrem na região Amazônica, considerada área endêmica. No ano de 2010, 333.424 casos da doença foram registrados no país. Destes, 332.310 (99,7%) provenientes dos estados da Amazônia Brasileira (TAUIL, 2011).

No Brasil, até o final da década de 1980, houve relativa equivalência entre os casos de malária devido às espécies *P. vivax* e *P. falciparum*. A partir de então, notou-se um aumento no número dos casos da malária *vivax* em detrimento aos da malária *falciparum* (Figura 2) (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2010).

Simultaneamente ao aumento da proporção dos casos de malária *vivax*, um aumento na frequência das complicações clínicas incomuns em pacientes infectados por *P. vivax* foram observados na Amazônia Brasileira (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2010).

Durante um período de dez anos (1998 a 2008), infecções por *P. vivax* foram responsáveis por 234 mortes nos estados da região Amazônica. Os casos de hospitalizações devido à malária *falciparum* diminuíram de 29% em 2003 para 25% em 2008, enquanto para *P. vivax* ocorreu aumento de 38% para 49% nas hospitalizações (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2010).

A cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, é considerada a cidade brasileira líder relacionada a casos de malária *vivax* e uma das maiores na América Latina (ALEXANDRE et al., 2010).

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) é um centro de atendimento terciário para o tratamento de doenças infecciosas, atendendo cerca de 30% dos casos de malária da cidade de Manaus (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2010). No ano de 2012, foram registrados pela FMT-HVD, 3.182 casos de malária, dos quais 95,91% causados por *P. vivax* (SIVEP, 2012) (Figura 3).

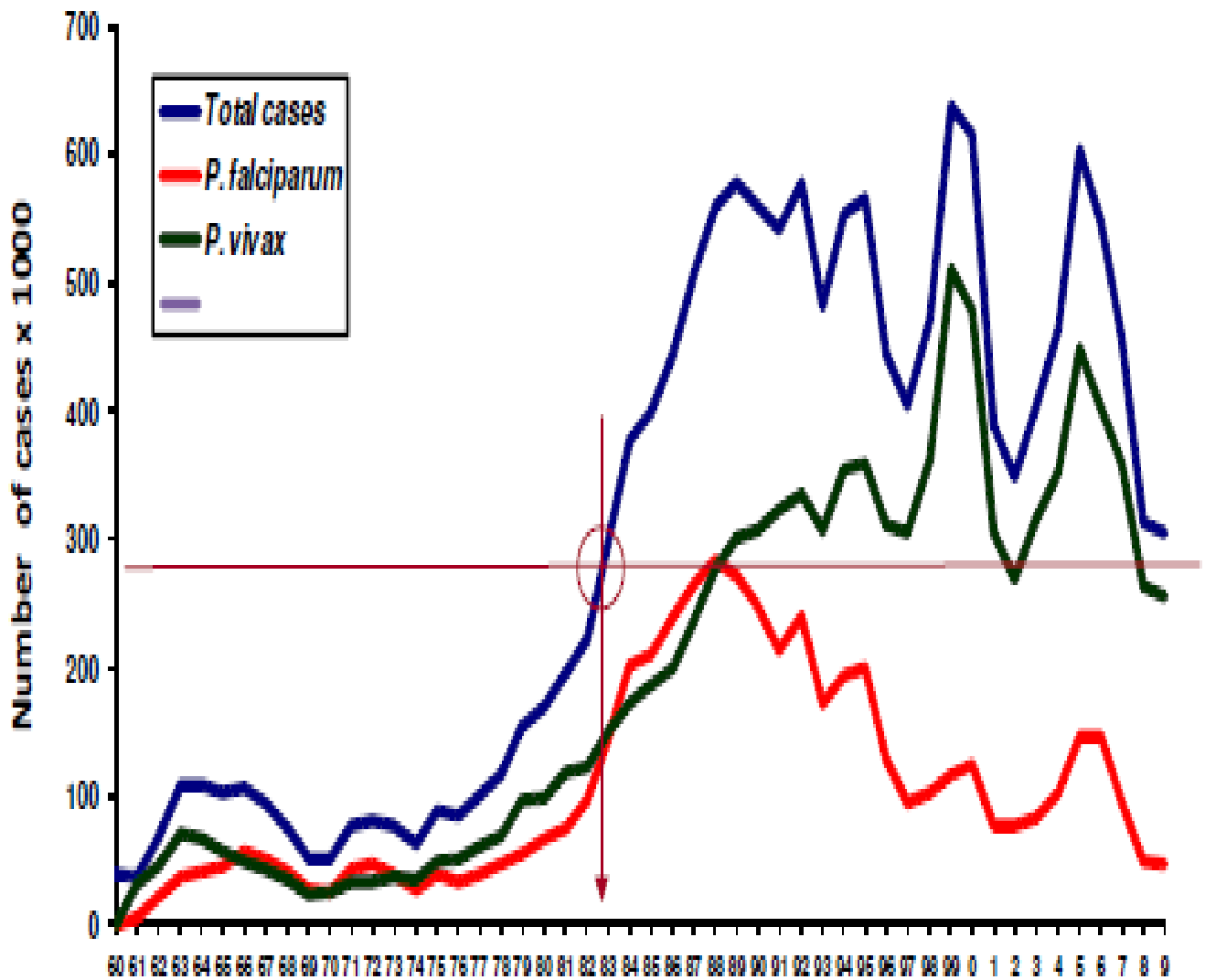


Figura 2: Número de casos de malária registrados entre os anos de 1960 a 2009 na Amazônia Brasileira.

Fonte: OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010.

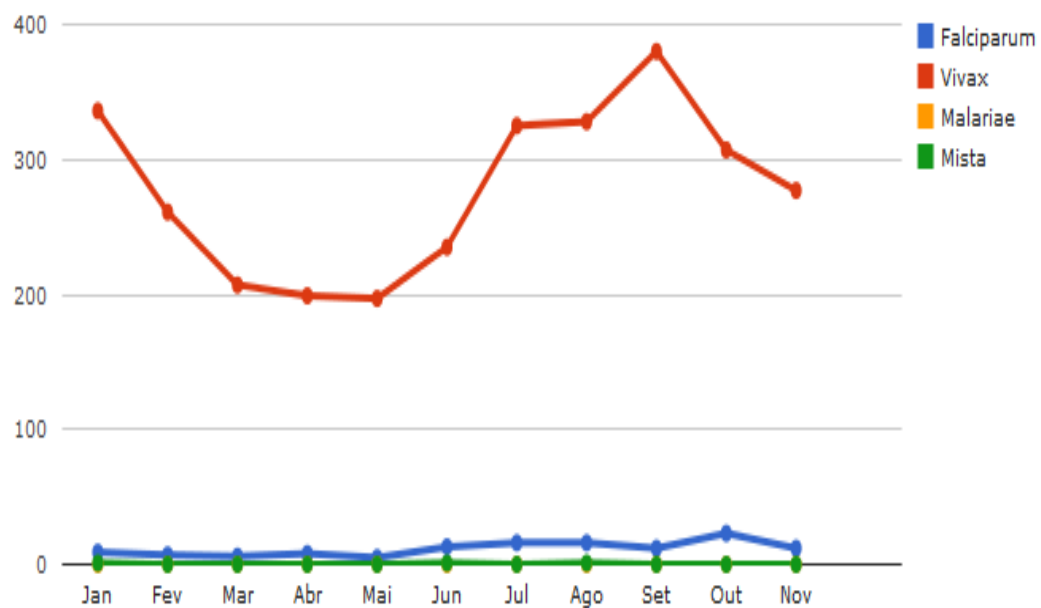


Figura 3: Casos de malária registrados pela FMT-HVD no ano de 2012.
Fonte: SIVEP_MALÁRIA/ESTATÍSTICA DE RESULTADO/DESP/FMT-HVD.

2.2 Ciclo Biológico do *Plasmodium sp.*

O ciclo biológico do *Plasmodium sp.* é heteroxeno, incluindo um ciclo de vida no hospedeiro vertebrado (homem) e outro no hospedeiro invertebrado (gênero *Anopheles sp.*) (Figura 4) (NEVES, 2009).

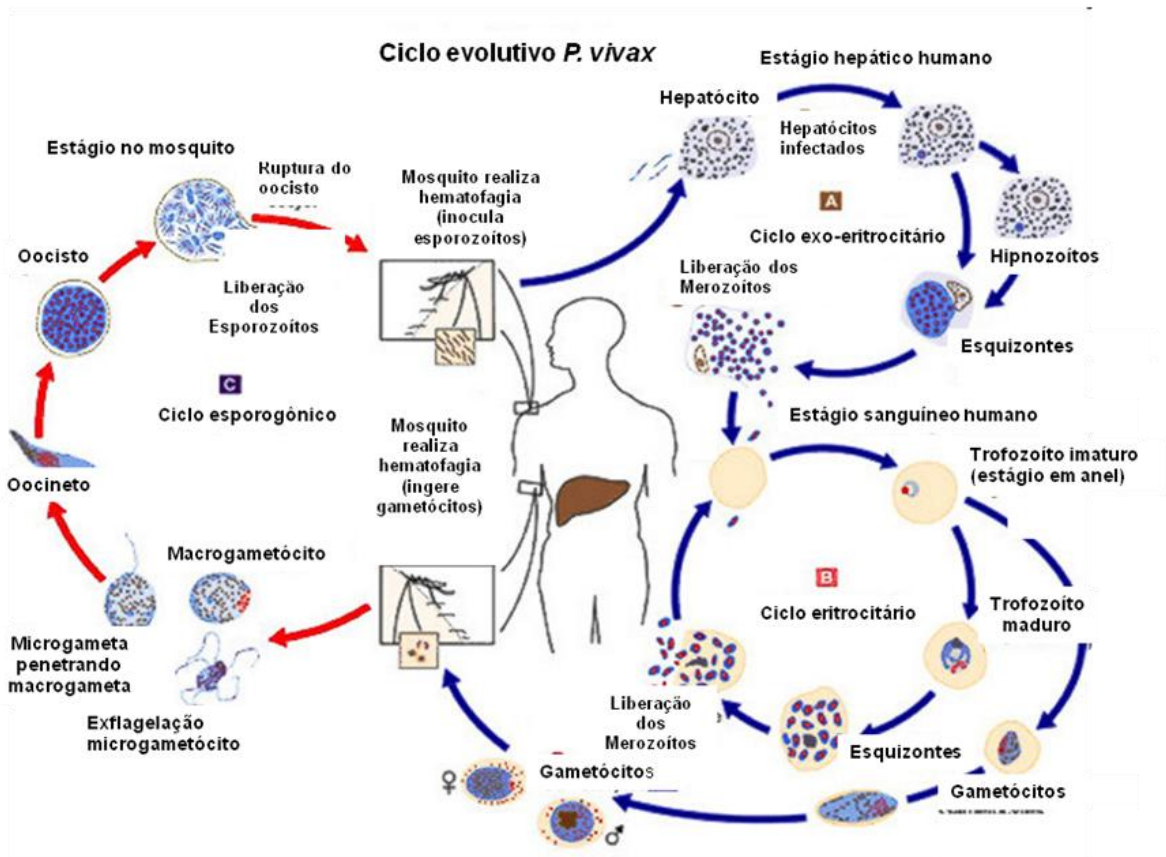


Figura 4: Ciclo evolutivo do *Plasmodium vivax*.
Fonte: Adaptado de acesso dia 07-12-2011.

A transmissão da malária ocorre através da picada de mosquitos fêmea durante seu repasto sanguíneo, inoculando esporozoítos na corrente sanguínea do homem. Estes esporozoítos, durante um período médio de 30 a 60 minutos circulam no sangue, dirigem-se ao fígado, iniciando o ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual. Nos hepatócitos, evoluem para trofozoítos, os quais por divisão assexuada geram os esquizontes e por fim os merozoítos. É interessante ressaltar, que os esporozoítos de duas espécies, *P. vivax* e *P. ovale*, podem-se desenvolver lentamente durante o ciclo hepático, permanecendo na forma de hipnozoítos (formas latentes), os quais posteriormente, por mecanismos ainda não conhecidos, iniciam um novo ciclo eritrocítico, sendo os responsáveis pelas recaídas tardias da malária (NEVES, 2009).

O ciclo eritrocítico ou esquizogonia sanguínea inicia-se com a penetração dos merozoítos provenientes do ciclo hepático nas hemácias. Nestas, os merozoítos evoluem para trofozoítos jovens (estágio em anéis), trofozoítos maduros, esquizontes, até sua diferenciação em merócitos, rompendo as hemácias e liberando novos merozoítos, perpetuando o ciclo e invadindo novas hemácias. É durante o ciclo eritrocítico que as respostas imunológicas e as manifestações clínicas no hospedeiro são verificadas. Durante o ciclo eritrocítico, alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos, formas sexuadas responsáveis pela infecção do vetor. No *Anopheles*, ocorre o ciclo esporogônico ou sexuado, o qual consiste na fecundação dos gametas e produção dos esporozoítos (forma infectante ao homem) (COWMAN et al., 2012).

Dependendo da espécie responsável pela infecção, o ciclo eritrocítico se repete a cada 48 horas (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*), ou a cada 72 horas (*P. malariae*) (COWMAN et al., 2012).

O ciclo evolutivo do *P. vivax* apresenta algumas diferenças importantes em relação ao do *P. falciparum*. Primeiramente, a capacidade de se diferenciarem em hipnozoítos, os quais são responsáveis pelas recaídas tardias da doença. Segundo, a preferência da espécie em parasitar os reticulócitos, ou seja, formas imaturas das hemácias. Além disso, durante a infecção, verifica-se a presença dos gametócitos de *P. vivax* no sangue periférico antes mesmo do aparecimento das manifestações clínicas, dificultando o controle da doença (COSTA et al., 2011).

2.3 Doença Malárica

2.3.1 Malária Não Grave

A malária, em sua forma mais freqüente, a não grave, é uma doença febril aguda, caracterizada por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese profunda e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie do *Plasmodium sp.* infectante (BRASIL, 2010).

Os sintomas da malária estão associados diretamente à ruptura das hemácias pelo parasita e a produção de citocinas pirogênicas, como o fator de necrose tumoral (TNF) pelo sistema imune do hospedeiro (ANDRADE et al., 2010).

As manifestações clínicas da malária se iniciam após um período de incubação variável segundo a espécie do *Plasmodium sp.* causadora da infecção (média de 12 dias para o *P. falciparum* e 14 dias para o *P. vivax*) (REY, 2008).

2.3.2 Malária Grave

A malária é uma doença infecciosa que pode se apresentar de forma grave, cursando com diversas disfunções sistêmicas, como complicações cerebrais, renais, pulmonares, hematológicas, circulatórias e hepáticas (ALVES et al., 2007).

A malária grave está frequentemente associada a infecções causadas por *P. falciparum*. Apesar disso, crescentes relatos na literatura têm destacado casos de malária grave por *P. vivax* (PRICE et al., 2009; ACHARYA et al., 2011).

As manifestações clínicas observadas na malária grave são bastante variáveis, dependendo do órgão envolvido. O diagnóstico das formas graves da doença é realizado quando achados clínicos e resultados laboratoriais preconizados pela OMS (Tabela 1) são observados no paciente infectado (GOMES et al., 2011).

Tabela 1: Indicadores da malária grave e pior prognóstico.

Critérios para Malária Grave segundo a OMS 1990, 2000.

Manifestações Clínicas	Características
Malária cerebral	Coma não atribuído a outras causas, com Glasgow ≤ 9
Anemia severa	Hemoglobina $< 5\text{g/dL}$, Hematócrito $< 15\%$ com parasitemia $> 10.000/\mu\text{l}$
Insuficiência renal aguda	Diurese $< 400\text{ml}/24$ horas em adultos ($< 12\text{ml}/\text{kg}/24$ horas em crianças) e creatinina sérica $> 3,0\text{ mg/dl}$
Edema pulmonar	Alterações radiográficas e hipoxemia severa
Hipoglicemia grave	Glicemia $< 40\text{ mg/dl}$
Choque	Pressão arterial sistólica $< 70\text{mmHg}$ em pacientes com idade superior a 5 anos ($< 50\text{mmHg}$ em crianças)
Sangramento anormal e/ou coagulação intravascular disseminada	Sangramento espontâneo nasal, trato gastrointestinal ou evidência laboratorial de coagulação intravascular disseminada
Convulsões generalizadas repetidas	≥ 3 episódios observados em 24 horas
Acidose metabólica	pH arterial $< 7,25$ ou $\text{HCO}_3^- < 15\text{mmol/l}$
Hemoglobinúria macroscópica	Hemólise não secundária a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
Prostração ou Fraqueza	
Comprometimento do estado de consciência	Alteração de nível de consciência
Hiperparasitemia	$>5\%$ dos eritrócitos parasitados ou > 250.000 parasitas/ μl em indivíduos não imunes
Hiperpirexia	Temperatura corporal $> 40^\circ\text{C}$
Hiperbilirrubinemia	Bilirrubina total $> 2.5\text{mg/dl}$

Fonte: Adaptado de GOMES et al., 2011. Malária Grave por *Plasmodium falciparum*.

A anemia severa é considerada a complicação mais comumente encontrada nos pacientes com malária. CALIS et al., (2008) demonstraram que a presença de co- infecções virais, bacterianas e helmínticas estão associadas ao desenvolvimento da anemia severa por *P. falciparum*. Além disso, alterações genéticas e deficiências nutricionais também podem estar associadas à gênese da anemia na malária.

A malária grave é uma emergência médica e as medidas como o diagnóstico rápido e correto, bem como, o estabelecimento do tratamento antimalárico adequado e a disponibilidade de medidas de suporte terapêutico diminuem a letalidade associada à doença (GOMES et al., 2011).

2.3.3 Malária Grave por *Plasmodium vivax*

Devido à maior mortalidade associada à espécie *P. falciparum*, principalmente no continente Africano, a maioria das pesquisas sobre patogênese da malária tem sido relacionada sobre esta espécie (AKHWALE et al., 2004). No entanto, estudos realizados em áreas endêmicas da Índia (KOCHAR et al., 2005; 2009), Indonésia (GENTON et al.,2008; TRIIJA et al., 2008; POESPROPRODJO et al., 2009) e Brasil (LACERDA et al.,2012; ALEXANDRE et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2010) demonstraram que a espécie *P. vivax* pode causar malária grave ou mesmo fatal com amplo espectro de manifestações clínicas.

Comumente observadas nas infecções graves por *P. falciparum*, as manifestações graves da malária *vivax* já relatadas na literatura são: malária cerebral, anemia severa, trombocitopenia, convulsões, icterícia, ruptura do baço, choque, insuficiência hepática, insuficiência renal aguda, síndrome da angústia respiratória aguda e edema pulmonar

(KOCHAR et al., 2005; 2009; PRICE et al., 2007; ALEXANDRE et al., 2010; GEORGE & ALEXANDER, 2010; COSTA et al., 2011).

Não existem critérios de gravidade específicos para a malária *vivax*. Para a classificação da doença em sua forma grave utilizam-se os critérios de gravidade para malária *falciparum* preconizados pela OMS (Tabela 1) (ALEXANDRE et al., 2010).

Em relação à terapia medicamentosa, apenas a primaquina encontra-se disponível para a eliminação dos hipnozoítos do *P. vivax*, e é cada vez maior o número de registros de resistência in vivo a cloroquina (GAMA et al., 2011).

No Brasil, manifestações clínicas incomuns como púrpura trombocitopênica idiopática após cura da infecção (LACERDA et al., 2004), hematoma esplênico (LACERDA et al., 2007) e rabdomiólise (SIQUEIRA et al., 2010) foram observadas em pacientes com malária *vivax*.

Na FMT-HVD em Manaus, em estudo retrospectivo de 2001 a 2002, 12,8% (43/336) dos pacientes hospitalizados com malária *vivax*, apresentaram diagnóstico para a forma grave da infecção, e as complicações clínicas mais frequentes foram anemia severa, hiperbilirrubinemia, insuficiência renal aguda, edema pulmonar e malária álgida (ALEXANDRE, 2004).

Alexandre *et al.*, (2010) descreveram a icterícia e a anemia severa como as complicações mais frequentes entre os pacientes hospitalizados com diagnóstico de malária *vivax* na FMT-HVD.

Apesar de não ser considerado um critério de gravidade da malária, a trombocitopenia é uma complicação frequente nas infecções causadas pela espécie *P. vivax*. Entre os mecanismos propostos que poderiam ser responsáveis pela diminuição da contagem plaquetária destaca-se o estresse oxidativo (LACERDA et al., 2011).

Em estudo de revisão na literatura brasileira, Lacerda et al., (2012) descreveram as complicações clínicas comumente diagnosticadas em pacientes de todas as faixas etárias, infectados pelo *P. vivax*: anemia, trombocitopenia, icterícia e síndrome do estresse respiratório agudo.

2.4 Fatores Genéticos do Hospedeiro Humano e a Doença Malária

O hospedeiro humano, ao se infectar com o *Plasmodium sp.*, pode evoluir com um amplo espectro de manifestações clínicas, desde quadros assintomáticos a infecções graves, potencialmente fatais (QUINTERO et al., 2011).

As manifestações clínicas da malária são determinadas por interações complexas entre os fatores do hospedeiro, do parasita e do ambiente (ANDRADE & BARRAL-NETO, 2011).

Diferenças na biologia das espécies dos *Plasmodium sp.* podem explicar parcialmente as diferenças nos padrões da doença. Principal destaque se dá a preferência por determinado estágio de vida das hemácias, enquanto o *P. vivax* infecta somente hemácias jovens ou reticulócitos, o *P. falciparum* parasita indiferentemente qualquer tipo de hemácia, resultando em maior parasitemia. Segundo destaque refere-se à capacidade de multiplicação de determinada espécie. Durante o ciclo hepático, para cada esporozoítio de *P.falciparum* que penetra no hepatócito, 40.000 merozoítos são liberados, enquanto o *P. vivax*, em torno de 10.000 merozoítos. Além disso, ao fim de cada ciclo eritrocítico, cada hemácia parasitada pelo *P. falciparum* libera de 8 a 32 novos merozoítos, enquanto *P. vivax* libera de 12 a 18 (MILLER et al., 2002; REY, 2009).

Fatores do hospedeiro, incluindo idade, sexo, etnia, imunidade, presença de comorbidades crônicas, co-infecções e vários polimorfismos genéticos foram descritos como

importantes determinantes da progressão e severidade da doença malárica (ANDRADE & BARRAL-NETO, 2011; BASSAT & ALONSO, 2011).

A malária, por ser uma doença antiga e de grande impacto na saúde da população, exerceu grande pressão seletiva no genoma humano (KWIATKOWSKI, 2005; LONGLEY et al., 2011). Centenas ou mesmo milhares de polimorfismos em enzimas e proteínas estruturais das hemácias surgiram nas populações que vivem em áreas endêmicas da malária. Essas variações genéticas podem conferir certa proteção contra formas graves e potencialmente fatais da doença (DRISS et al., 2011; LONGLEY et al., 2011).

Os genes que afetam a estrutura e/ou metabolismo das hemácias são os que apresentam maior número de variantes genéticas associadas com a proteção contra a malária ou os seus sintomas (MACHADO et al., 2010). Isso se deve ao papel central das hemácias no ciclo da malária, pois além de fornecerem abrigo e alimento ao parasita, muitas das características da doença estão relacionadas à interação entre as hemácias infectadas e não infectadas com outros tecidos (WILLIAMS, 2006).

Certos polimorfismos de proteção contra a malária *falciparum* grave são encontrados com elevada frequência nas populações que vivem em áreas endêmicas da doença. Um grupo dessas condições, incluindo as hemoglobinopatias estruturais (hemoglobinas S, C, D e E), hemoglobinopatias de síntese (Alfa e beta talassemias) e as enzimopatias (deficiências na desidrogenase da glicose de 6 fosfato - G6PD e piruvato quinase - PK), demonstram prover proteção baseados em um mecanismo comum, envolvendo o estresse oxidativo (CAPPADORO et al., 1998; AYI et al., 2008; GALLO et al., 2009).

Uma vez que na malária severa é observado um intenso processo inflamatório, mediado por uma resposta imune desordenada, a maioria dos estudos sobre a genética do hospedeiro estão voltados para os polimorfismos em genes relevantes da resposta imune e

inflamatória, tais como: Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), Receptores Toll - like (TLR – 4, 9), Interferon gamma (INF- γ), entre outros (MANJURANO et al., 2012).

Durante a infecção malárica, uma intensa resposta pró-inflamatória, com a participação do estresse oxidativo é observada no organismo humano, e ambos estão envolvidos na patogenia das complicações clínicas da doença (PERCÁRIO et al., 2012; ANDRADE et al., 2010).

Polimorfismos nos genes das Glutationa S-Transferases (GSTs) têm sido associados com suscetibilidade a diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo (KAVISHE et al., 2009). Porém, pouco se conhece sobre a relação dos genótipos das GSTs com a proteção ou risco à infecção pelo *Plasmodium sp.* Também não há descrições na literatura a respeito dos genótipos das GSTs e uma possível associação com a gravidade da malária *vivax* (SOHAIL et al., 2010).

2.5 Estresse Oxidativo na Malária

O estresse oxidativo pode ser entendido como um estado de desequilíbrio redox, no qual as defesas antioxidantes são insuficientes para detoxificar as espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e/ou quando há produção excessiva das ROS (SOHAIL et al., 2007).

O excesso das ROS apresenta efeitos prejudiciais ao organismo, ocasionando danos às biomoléculas e, dessa forma, afetando a saúde humana. A peroxidação dos lipídeos das membranas e o dano oxidativo às proteínas, carboidratos e DNA são exemplos de substratos biológicos que reagem com as ROS (BARREIROS et al., 2006).

Na malária, a produção das ROS ocorre devido às ações do sistema de defesa imune do hospedeiro como do próprio metabolismo do parasita (NARSARIA et al., 2011).

A resposta celular do hospedeiro contra o *Plasmodium sp.* ocorre via mecanismo mediado pelas ROS, as quais são tóxicas para o parasita. Dessa forma, células fagocíticas como os monócitos, macrófagos e neutrófilos são recrutadas pelo sistema imune para gerarem maiores quantidades das ROS, como o radical superóxido (O_2^-) devido à ativação da enzima NADPH oxidase presente nas membranas dessas células (EREL et al., 2001; NARSARIA et al., 2011).

O *Plasmodium sp.*, após digerir a hemoglobina, consome somente a fração protéica, liberando para o meio o grupamento heme. Este se oxida na presença do oxigênio (O_2) dando origem a ferriprotoporfirina ou hemeina, a qual é tóxica para o parasita. Durante esse processo, há a produção de radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros nas hemácias (BECKER et al., 2004; SOHAIL et al., 2007; KAVISHE et al., 2009).

Estudos têm demonstrado a participação do estresse oxidativo na imunidade e patogenia da malária (NARSARIA et al., 2012; KAVISHE et al., 2009). No entanto, o papel do estresse oxidativo durante a infecção ainda não está totalmente entendido. Algumas pesquisas têm demonstrado uma ação protetora, contribuindo para depuração das hemácias parasitárias, enquanto outras relatam o seu envolvimento com o dano tecidual e as complicações da doença (PERCÁRIO et al., 2012).

O estresse oxidativo pode apresentar importante papel no desenvolvimento da anemia na malária (EREL et al., 1997; 2001; KULKARNI et al., 2003). KULKARNI et al., (2003) demonstraram correlação negativa entre a concentração de hemoglobina e o nível de peroxidação lipídica nos pacientes com malária.

O aumento da peroxidação lipídica pode ser observado nas membranas das hemácias parasitadas e não parasitadas. A diminuição na deformabilidade das hemácias pode causar efeitos nocivos ao hospedeiro, como obstrução da microcirculação com conseqüente hipóxia tecidual, e aumento da fagocitose das hemácias pelos macrófagos esplênicos, exacerbando a anemia (BECKER et al., 2004).

Segundo EREL et al., (2001) as ROS não reagem somente com as células onde são produzidas, mas também com componentes do plasma, células endoteliais e com outras células pelo transporte através das membranas citoplasmáticas.

Estudos relataram o envolvimento do estresse oxidativo na etiopatogenia da trombocitopenia na malária (EREL et al., 2001; ARAÚJO et al., 2008; LACERDA et al., 2011). EREL et al., (2001) demonstraram correlação negativa entre a contagem plaquetária e o nível de peroxidação lipídica das plaquetas nos pacientes com malária vivax.

GUHA et al., (2006) em estudos com animais de laboratório, demonstraram que a infecção malárica induz a geração do radical OH^\cdot no fígado, com conseqüente indução do estresse oxidativo e apoptose dos hepatócitos. Segundo os resultados da pesquisa, metabólitos produzidos durante o estágio intraeritrocítico do *Plasmodium sp.* são os responsáveis pelo dano oxidativo aos hepatócitos, resultando na disfunção hepática comumente observada nos pacientes com malária.

Segundo KAVISHE et al., (2009), o estresse oxidativo pode induzir a diminuição da atividade dos macrófagos, como também colaborar na redução da capacidade plástica das hemácias e no aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias durante a malária.

Por outro lado, a destruição das hemácias parasitadas pela ação do estresse oxidativo pode proteger o hospedeiro, uma vez que favorece a diminuição da parasitemia e das complicações da doença. Hemácias com deficiências na atividade da Desidrogenase da

Glicose 6 Fosfato (G6PD) ou Glutathione Redutase (GR), apresentam-se mais suscetíveis à fagocitose no estágio prematuro do ciclo sanguíneo do *Plasmodium sp.* (estágio de trofozoíto em anel), permitindo com que as infecções tenham evoluções mais brandas (FOLLER et al., 2009; GALLO et al., 2009).

As drogas antimaláricas agem pelo menos em parte, aumentando o estresse oxidativo nas hemácias parasitadas. A cloroquina impede a detoxificação do grupo heme em hemozoína e os metabólitos da primaquina contribuem com o aumento das ROS. Drogas promissoras que atuam interferindo no metabolismo redox incluem os inibidores das enzimas antioxidantes GR e GST do *Plasmodium sp.* e do hospedeiro. (BECKER et al., 2004).

Para minimizar o dano causado pelo estresse oxidativo, as células contêm sistemas de defesas antioxidantes que agem enzimaticamente, a exemplo da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), e Glutathione S-Transferase (GST) ou não enzimaticamente, a exemplo da Glutathione Reduzida (GSH), peptídeos de histidina, vitaminas A, E, C (BARREIROS et al., 2006).

A molécula da GSH possui papel central na defesa celular contra o estresse oxidativo. É o agente redutor de baixo peso molecular mais abundante nas células, sua concentração é de aproximadamente 2mM nas hemácias e 10mM nos hepatócitos. Entre as enzimas relacionadas ao ciclo da GSH, destaca-se a GST, que catalisa a reação entre a GSH e as ROS, contribuindo para manutenção do equilíbrio redox no organismo (HUBER et al., 2008).

2.6 Glutationa S-Transferases

As Glutationa S- Transferases (GSTs) compreendem um complexo multienzimático responsável pelas reações de conjugação entre a GSH e os compostos eletrofílicos, permitindo a neutralização de substâncias tóxicas de origem exógena e endógena, e dos produtos do estresse oxidativo (ECONOMOPOULOS E SERGENTANIS, 2010).

As GSTs são proteínas diméricas, expressas principalmente no fígado, podendo também ser encontradas em diferentes níveis em muitos tecidos. Por exemplo, a classe theta da GST (GSTT) é expressa em vários tecidos humanos como o fígado, hemácias, pulmões, rins, coração, musculatura esquelética entre outros (HIRAGI, 2010). As isoformas GSTP1 e GSTM1 são expressas em todas as células sanguíneas, com alta expressão nos linfócitos, enquanto a GSTT1 é expressa em altos níveis nas hemácias (ROSSINI et al., 2002).

As GSTs estão divididas em oito classes gênicas: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), z (GSTZ), σ (GSTS), w (GSTO), k (GSTK), com um ou mais genes em cada classe codificando enzimas citosólicas (PALODETTO, 2010). Os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* são polimórficos em humanos, e têm sido considerados importantes modificadores do risco individual a várias doenças (GHOBADLOO et al., 2004).

O gene *GSTM1* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (lócus 1p13.3). O gene *GSTT1* está localizado no braço longo do cromossomo 22 (lócus 22q11.23)(HIRAGI, 2010).

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* apresentam um polimorfismo genético caracterizado pela deleção homocigota. Indivíduos que apresentam genótipos nulos desses genes não expressam atividade enzimática correspondente. As frequências dos genótipos *GSTM1*-nulo e *GSTT1*-nulo nas diferentes populações são altas (SUNEETHA et al., 2011). Entre os diferentes

grupos étnicos brasileiros, a frequência do genótipo GSTM1-nulo é de cerca de 50%, com uma variação de 30 a 70% (HIRAGI et al., 2007; MACIEL et al., 2009; MAGNO et al., 2009).

No Brasil, a frequência do genótipo GSTT1-nulo foi de 18,5% e 19% entre descendentes Caucasianos e Africanos, respectivamente (LANDI, 2000).

O gene *GSTP1* está localizado no cromossomo 11 (locus 11q13), e apresenta um polimorfismo de base única ou SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) na região do éxon 5: a substituição da base nitrogenada adenina pela guanina (A→G) na posição 313 leva a troca do aminoácido isoleucina pela valina no códon 105 (Ile105Val), causando uma diminuição significativa na atividade da isoenzima GSTP1 (VASIEVA, 2011). ROSSINI et al., (2002) demonstraram uma frequência de 38,1% e 12,2% dos genótipos homozigoto e heterozigoto para o SNP/A313G na população Brasileira, respectivamente.

A frequência dos genótipos das GSTs e a atividade das isoenzimas correspondentes variam na população. Portanto, a relação entre os polimorfismos das GSTs e o aumento do risco de várias doenças tem sido examinada em estudos epidemiológicos moleculares (BACLIG et al., 2012; SHUKLA et al., 2012; SILVA DE AGUIAR et al., 2012). No entanto, são poucas as publicações avaliando a contribuição dos polimorfismos conhecidos das GSTs no desenvolvimento das complicações clínicas da malária vivax.

Polimorfismos nos genes das GSTs têm sido associados com o risco para várias doenças, como o câncer e doenças infecciosas. GONCALVES et al., (2009) demonstraram que indivíduos com genótipo GSTT1-nulo apresentaram maior susceptibilidade para o desenvolvimento de leucopenia e neutropenia. SERGENTANIS & ECONOMOPOULOS, (2010) demonstraram genótipos GSTT1-nulo e GSTP1 (Ile105Val) associados com aumento no risco para o desenvolvimento de câncer de mama.

GHOBADLOO et al., (2006) relataram os genótipos GSTM1-nulo e GSTP1 (Ile105Val) no curso crônico da hepatite viral B. KANDEMIR et al., (2008) sugeriram associação entre o genótipo GSTP1 (Ile105Val) e a evolução crônica da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV).

2.7 Polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e malária.

Ainda não está claro como os polimorfismos nos genes que codificam as isoformas das GSTs podem afetar o resultado da infecção pelo *Plasmodium sp.* (KAVISHE et al., 2009). Alguns estudos têm demonstrado genótipos particulares das GSTs associados com as complicações clínicas da malária.

Em estudo realizado na África, com crianças infectadas pelo *P. falciparum*, KAVISHE et al., (2006) verificaram que de um total de 138 crianças, 80 (58%) eram portadores do genótipo polimórfico GSTM1-nulo. Também encontraram uma diferença significativa na distribuição do genótipo GSTM1-nulo entre o grupo com malária não grave (6/80) e o grupo com malária grave ou com menores complicações (22/80 e 52/80, respectivamente).

Esses resultados indicaram que indivíduos sem a atividade da enzima GSTM1 foram significativamente representados no grupo com malária *falciparum* com complicações em comparação com o grupo com malária *falciparum* sem complicações (KAVISHE et al., 2006). Segundo o autor, a GSTM1 catalisa a conjugação da GSH com vários compostos eletrofílicos, sendo importante para prevenção das complicações associadas ao estresse oxidativo na malária (KAVISHE et al., 2006).

KAVISHE et al., (2009) demonstraram que a frequência do genótipo homocigoto da GSTP1 (SNP/A313G) no grupo de crianças da Tanzânia com malária *falciparum* grave (26%)

foi significativamente maior do que no grupo com malária não grave (10,3%), indicando associação com anemia grave na malária.

Polimorfismos nos genes das GSTs podem causar mudanças na atividade enzimática, resultando em diminuição da capacidade detoxificadora das células ou aumento da disponibilidade da GSH do hospedeiro para ser usada pelo parasita. Em ambas as situações, a infecção malárica poderia ser acelerada. É provável que tanto as hemácias quanto outras células envolvidas na resposta imune sejam atingidas por essas alterações genéticas. (KAVISHE et al., 2009).

São poucos os estudos associando polimorfismos nos genes das GSTs e malária *vivax*. SOHAIL et al., (2010) foram os primeiros a associarem o polimorfismo no códon 105 da GSTP1 e malária *vivax*, encontrando elevada frequência dos genótipos heterozigoto e homozigoto da GSTP1 (Ile105Val) (46,5% e 23,07%, respectivamente) em pacientes infectados por *P. vivax*, comparados com indivíduos controles (23,07% e 11,53%, respectivamente) e infectados por *P. falciparum* (23,07% e 11,53%, respectivamente).

Os resultados sugeriram que o polimorfismo de base única (SNP/A313G) no gene *GSTP1* está associado com aumento do risco na susceptibilidade ou progressão da infecção por *P. vivax* na população de estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Realizar a caracterização molecular das enzimas Glutathione S- Transferases (GSTs) (*Genes GSTM1, GSTT1 e GSTP1*) em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a frequência dos genótipos polimórficos das GSTs (*Genes GSTM1, GSTT1 e GSTP1*) em pacientes diagnosticados com malária por *Plasmodium vivax*.
- Investigar associações dos genótipos das GSTs entre os grupos de pacientes com malária grave e não grave por *Plasmodium vivax*.
- Investigar os genótipos das GSTs com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes do estudo.
- Identificar possíveis marcadores moleculares de suscetibilidade ou proteção para malária grave por *Plasmodium vivax*.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Utilizou-se uma abordagem descritiva e retrospectiva, com amostras oriundas da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV), a partir de pacientes atendidos na Enfermaria de Pesquisa Clínica (PESCLIN) deste hospital, com os dados obtidos dos prontuários atendidos no período março de 2009 a abril de 2010.

4.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado na cidade de Manaus (AM), Brasil. A coleta das amostras foi realizada na FMT-HDV, a partir de pacientes atendidos na Enfermaria de Pesquisa Clínica (PESCLIN) deste hospital.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

4.3 Aspectos Éticos

As amostras e os dados utilizados no estudo foram obtidos por meio do projeto *“Caracterização clínica da malária complicada por Plasmodium vivax”*, e o mesmo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em junho de 2009, pelo parecer nº343/2009, protocolo de nº 25.000.011.792/2009-15 (Anexo).

4.4 Amostras do Estudo

Foram utilizadas amostras de sangue total de 175 pacientes atendidos na FMT-HDV, diagnosticados com malária por *P. vivax* grave (57 pacientes) e não-grave (118 pacientes).

Dados clínicos, hematológicos e bioquímicos dos pacientes foram coletados e analisados.

4.5 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes acima de 18 anos de idade, com diagnóstico microscópico de malária por *P. vivax*.

Foram excluídos da pesquisa pacientes com diagnóstico de malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*) à PCR, e pacientes apresentando co-morbidades infecciosas como Hepatites B e C, D, HIV e Dengue.

4.6 Análises Moleculares

4.6.1 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA foi realizada a partir de 300µL de sangue total armazenado a -20°C, utilizando o kit comercial da *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante (Anexo).

As amostras de DNA genômico permaneciam armazenadas a -20°C no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, até serem processadas.

4.6.2 PCR Multiplex

Para a caracterização dos genótipos da GSTM1 e GSTT1 foi empregada a metodologia da PCR Multiplex, utilizando o gene da β – globina como controle interno da reação (MOURA NETO *et al.*, 2009). Para cada reação molecular, foram incluídos controles negativos e positivos para validação da mesma.

Nessa técnica, três pares de primers específicos para a amplificação de diferentes alvos foram incluídos na mesma reação.

Quadro 1: Primers para amplificação dos genes GSTM1 e GSTT1.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS	PRODUTO AMPLIFICADO
GSTM1 direto	5' - CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG - 3'	271pb
GSTM1 reverso	5' - CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC - 3'	
GSTT1 direto	5' - TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC - 3'	480pb
GSTT1 reverso	5' - TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'	
β-globina direto	5' - GCC AAG GAC AGG TAC GGC TGT CATC - 3'	700pb
β-globina reverso	5' - CCC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT - 3'	

pb: pares de bases.

Quadro 2: Reagentes para preparo do Mix da PCR Multiplex.

MIX - PCR Multiplex	
Água ultra-pura estéril	35 µL
Tampão Tris-HCl (10mmole/l de tris-HCl pH 8,4; 75mmole/l de KCl)	3,5 µL
3.5mmole/l de MgCl ₂	3 µL
100µmole/l cada dNTPs	3 µL
25pmol GSTM1 direto	0,5 µL
25pmol GSTM1 reverso	0,5 µL
25pmol GSTT1 direto	0,5 µL
25pmol GSTT1 reverso	0,5 µL
25pmol β – globina direto	0,5 µL
25pmol β – globina reverso	0,5 µL
2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen)	0,5 µL
DNA extraído	2 µL

Cada reação da PCR possui um volume final de 50 µl. As reações de amplificação foram realizadas no Termociclador (BIO-RAD, T100TM Thermal Cycler, USA).

Quadro 3: Condições de amplificação PCR Multiplex.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
94°C (desnaturação inicial)	10 minutos	1
94°C (desnaturação)	45 segundos	35
58°C (anelamento)	45 segundos	35
72°C (extensão)	1 minuto e 30 segundos	35
72°C (extensão final)	10 minutos	1
4°C	10 minutos	modo de espera

Após cada reação, as amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (1% agarose), utilizando como referência, marcadores de tamanhos moleculares de 100, 500 e 1000pb.

4.6.3 PCR RFLP (Polimorfismos por tamanho de fragmentos de restrição)

Para a caracterização dos genótipos e verificação do SNP A313G no éxon 5 do gene GSTP1 foi empregada a metodologia da PCR RFLP (GHOBADLOO *et al.*, 2006).

Quadro 4: Primers para amplificação do gene GSTP1.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS	PRODUTO AMPLIFICADO
GSTP1 direto	5'- GTA TTT TGC CCA AGG TCA AG -3'	433pb
GSTP1 reverso	5'- AGC CAC CTG AGG GGT AAG -3'.	

pb: pares de bases.

Quadro 5: Reagentes para preparo do Mix da PCR.

REAGENTES PARA O MIX DA PCR	
Água ultra-pura estéril	39 μ L
Tampão Tris-HCl (10mmole/l de tris-HCl pH 8,4; 75mmole/l de KCl)	5 μ L
3.5mmole/l de MgCl ₂	1,5 μ L
200 μ mole/l cada dNTPs	1 μ L
25pmol GSTP1 direto	0,5 μ L
25pmol GSTP1 reverso	0,5 μ L
2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen)	0,5 μ L
DNA extraído	2 μ L

Cada reação da PCR possui um volume final de 50 μ l. As reações de amplificação foram realizadas no Termociclador (BIO-RAD, T100TM Thermal Cycler, USA).

Quadro 6: Condições de amplificação PCR-RFLP.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95°C (desnaturação inicial)	12 minutos	1
95°C (desnaturação)	30 segundos	15
58°C (anelamento)	30 segundos	15
72°C (extensão)	60 segundos	15
95°C (desnaturação)	30 segundos	25
55°C (anelamento)	30 segundos	25
72°C (extensão)	60 segundos	25
72°C (extensão final)	5 minutos	1
4°C	10 minutos	modo de espera

Após cada reação, as amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (1% agarose), utilizando como referência, marcadores de tamanhos moleculares de 100, 500 e 1000pb. Após confirmação da amplificação, os produtos amplificados foram submetidos à análise de restrição com a enzima BsmAI (Biolabs, New England).

A reação de digestão foi realizada para cada amostra, preparando-se soluções contendo 10 µL do produto da PCR e 2,5U da enzima de restrição BsmAI (Biolabs, New England), num volume final de 13 µL. As amostras foram incubadas *overnight* a 37°C.

Visualização das possíveis bandas da digestão enzimática em gel de poliacrilamida a 2%. Os fragmentos foram visualizados de três formas distintas, identificando cada genótipo mutado para o SNP A313G: duas bandas de 329pb e 104pb quando o indivíduo é homozigoto para o alelo ancestral A (AA), ou seja, não possui o polimorfismo; quatro bandas de 329pb, 222pb, 107pb e 104pb (as duas últimas sem distinção) quando o indivíduo for heterozigoto (AG); ou três bandas de 222pb, 107pb e 104pb quando o indivíduo for homozigoto para o alelo variante G (GG).

4.7 Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando os programas estatísticos EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia, USA), the Statistics Data Analysis (STATA) SE 10 (StataCorp, Texas, USA), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) e IBM SPSS Statistics 19.0 (CDC, Atlanta, Georgia). Considerou-se estatisticamente significativo um p-value \leq 0.05.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos com o desenvolvimento desta pesquisa proporcionaram a elaboração de um artigo científico, intitulado “Glutathione S-Transferase P1 A313G mutation is associated with increased risk of anemia in severe *P.vivax* patients-Manaus, Brazil”.

Glutathione S–Transferase P1 A313G mutation is associated with increased risk

of anemia in severe *P. vivax* patients- Manaus, Brazil

Brena L. Aguiar Lima¹; Jéssica L. Santos Mathias²; Anne C. Gomes Almeida²; Marcus V. Guimarães Lacerda²; Paulo Afonso Nogueira⁴; Emerson Silva Lima¹; Marilda Souza Gonçalves³; Pritesh J. Lalwani¹; José P. Moura Neto¹

1 -Universidade Federal do Amazonas-UFAM

2 - Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD

3 - Universidade Federal da Bahia - UFBA

4 - Instituto Leônidas e Maria Deane – FICORUZ-AM

Correspondence: José Pereira de Moura Neto, Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas (FCF/ UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil, Rua Alexandre Amorin n 330, CEP: 69010 –300. E-mail: jp-mn@hotmail.com.

ABSTRACT

Plasmodium vivax threatens ~40% of the world's population, with a wide spectrum of asymptomatic to severe clinical manifestations. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms have been shown to influence their ability to reduce oxidative stress. Using molecular tools we identified and compared GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphism in uncomplicated and severe vivax patients. There were no differences in the frequency of GST alleles between uncomplicated and severe malaria. Nevertheless, a comparison of biochemical and hematological parameters in severe malaria, we observed patients with GSTM1 double-deletion had more platelets ($p < 0.04$) suggesting a decreased risk of thrombocytopenia. In addition, patients with single and/or double deletion of GSTT1 and GSTM1 also had a reduced risk for thrombocytopenia ($p < 0.045$, $p < 0.026$, respectively) compared to wild type allele. In contrast, individuals with GSTP1 heterozygous or homozygous A313G mutation had an increased risk of jaundice ($p < 0.034$, $p < 0.022$) and anemia as observed with decreased RBCs ($p < 0.008$), hemoglobin ($p < 0.019$) and hematocrit ($p < 0.008$) levels in serum. Our results, not only indicate a direct influence of GST polymorphism on biochemical and hematological parameters but also its diagnostic potential in assessing disease progression during clinical malaria.

INTRODUCTION

Among the *Plasmodium* species causing malaria infections in humans, *P. vivax* is the most widely distributed species worldwide, with over 400 million reported infections annually.¹ In Brazil, 99.8% of malaria cases were reported from Amazon region in 2009 and the *P.vivax* species accounted for approximately 85% of these cases.² Moreover, the Brazilian Amazon region is responsible for more than 50% of the total malaria cases in Latin America. Malaria infection is one of the major causes of severe morbidity in individuals living in these endemic areas. *P. vivax* malaria was considered a benign disease for several years, severe and fatal cases were mainly associated with infection by *P.falciparum*. However, recent studies have shown an increased frequency of severe vivax malaria cases in the endemic areas of Brazil,^{3, 4, 5} Indonesia,^{6, 7, 8} and India.^{9, 10} Anemia, thrombocytopenia, jaundice and acute respiratory syndrome are the most frequent clinical complications described in vivax-infected malaria patients.^{3, 11} Malaria is a complex disease; where in interactions between host genetics and environmental factors influence the disease severity and progression.¹² Recent studies have estimated a 25% risk of developing severe form of malaria to be influenced directly by the host genetics.¹³ Nevertheless, within the clinical spectrum of Plasmodium infections, we consider the two opposite poles that remain to be fully understood of utmost importance: asymptomatic malaria, which is directly associated with clinical immunity to infection and severe malaria, which underlies key processes in susceptibility to infection.

An intense inflammatory and oxidative stress response has been demonstrated to be involved in the pathogenesis of malaria and plays a crucial role in the observed clinical complications of the disease.^{1, 14} However, the exact role of oxidative stress responses in malaria disease is unclear. Some studies have demonstrated a protective function, whereas others have shown oxidative stress to be associated with development of complications like anemia,

thrombocytopenia and hepatic dysfunction.^{15, 16, 17, 18} Glutathione S-transferase (GST) enzymes are known to play a key role in the detoxification and reduction of reactive oxygen species (ROS). The GSTs catalyzes the conjugation of a variety of electrophilic substrates with reduced glutathione (GSH).¹⁹ The mammalian GST super-family consists of cytosolic dimeric isoenzymes of 45–55 kDa size that have been assigned to at least eight classes: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), ζ (GSTZ), σ (GSTS), ω (GSTO), κ (GSTK), with one or more genes encoding for these cytosolic enzymes.²⁰ In liver, GST proteins are expressed at high levels and contribute up to 10% of the soluble proteins in cells.²¹

The majority of GST genes harbor polymorphisms that influence their transcription and/or function of their encoded proteins.²² GSTM1 and GSTT1 genes exhibit homozygous deletions (null) and individuals with GSTM1 and GSTT1 null genotypes have no corresponding enzyme activity. The GSTM1-null and GSTT1-null genotypes frequencies are described to be high in some ethnic populations.²³ Frequency of GSTM1-null genotype is about 50%, with a range of 30 to 70% among different Brazilian ethnic groups.^{24, 25, 26} In addition, the frequency of GSTT1-null genotype was 18.5% and 19% among Caucasian and African descendants, respectively.²⁷ GSTP1 gene has a polymorphic site in the region of exon 5; a replacement of A313G causes an Ile105Val change, resulting in a significant decrease in the GSTP1 isoenzyme activity.²⁸ Rossini et.al, described a frequency of 38.1% and 12.2% of homozygous and heterozygous genotypes for SNP/A313G in the Brazilian population, respectively. The frequency of GSTs polymorphic genotypes and the activity of corresponding isoenzymes vary in the population, which has been shown to be associated with increased risk of various diseases.^{30, 31, 32} However, there are few reports that have evaluated the involvement of known GST polymorphisms in the development of clinical complications in malaria vivax.

In Cameroon, a study with 138 children demonstrated a statistically significant difference in GSTM1-null frequency; 32% and 58% in uncomplicated and severe malaria falciparum, respectively.³³ In addition, a study with 157 children from Tanzania demonstrated a significant association of GSTP1/SNP A313G with severe anemia in *P. falciparum* malaria: 26% in severe anemia group against 10.3% in non-severe group.²² Sohail et.al first reported a significant association between GSTP1/SNP A313G and the progression of vivax malaria disease compared with healthy individuals and those infected with *P. falciparum*.

Despite the great morbidity associated with *P. vivax* infections in the Amazon region, there is very little information about the genetic background of the population affected and the association with susceptibility or resistance to severe forms of malaria. In this study, we investigated GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphisms in patients presenting with uncomplicated and severe *P. vivax* malaria in Manaus (Amazon), Brazil to understand its crucial role in disease progression and pathogenesis.

POPULATION, MATERIAL AND METHODS

Patients

The clinical data and DNA samples described in this study were collected between March 2009 and April 2010, in a study of clinical characterization of malaria vivax severe in the Tropical Medicine Foundation of Amazonas, Manaus. This study was approved by the National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, n°343/2009, procedure n° 25.000.011.792/2009-15. The severity of malaria was assessed according to World Health Organization (WHO) standards (formerly validated for *P. falciparum*)³⁵. All individuals recruited were positive for *P. vivax* mono-infection confirmed by thick smear examination using field microscopy and were negative for mixed malaria, which was checked by PCR. Patients were excluded when presented with co-infections such as viral hepatitis (HBV, HCV and HDV), HIV and dengue virus. The clinical, hematological and biochemical manifestations were analyzed and are depicted in tables.

Determination of GST gene polymorphism

DNA was extracted from dried blood spots collected on filter paper using a DNA isolation kit (*Wizard® Genomic DNA Purification*, Promega) according to the manufacturer's instructions. In order to identify the deletions of GSTM1 and GSTT1 genes a triplex polymerase chain reaction (PCR) was employed that included primers for Beta-globin gene that served as a control for DNA integrity. To detect the variants of codon 105 of GSTP1 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was employed.

The complete deletions in GSTM1 and GSTT1 genes were determined using a multiplex PCR-based assay. Isolated DNA (100 ng) was amplified in a 50 µl reaction containing 25 pmol

each of the following: GSTM1 primers of 5'- CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG- 3', 5'- CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC - 3', and GSTT1 primers of 5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC -3', 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'. As an internal control a fragment of the human Beta-globin gene was also amplified using the primers 5'- GCC AAG GAC AGG TAC GGC TGT CATC -3'and 5'- CCC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT - 3'in the presence of 200 µmol dNTPs, 10x PCR buffer, 3.5 mmol MgCl₂ and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil). The PCR protocol included an initial denaturation temperature of 94 °C for 10 minutes, followed by 35 cycles of amplification (45 seconds at 94°C, 45 seconds at 58°C and 1 minute and 30 seconds at 72°C). A final 10 minutes extension step at 72°C terminated the process. PCR products from co-amplification of GSTM1 (271pb), GSTT1 (480pb) and Beta- globin (700pb) were visualized on an ethidium bromide stained 1% agarose gel (Invitrogen).

To genotype the GSTP1 A313G polymorphism the PCR-RFLP was applied as follows: 100 ng DNA was amplified in a reaction volume of 50 µl containing 25 pmol of each GSTP1 primers: 5'- GTA TTT TGC CCA AGG TCA AG -3'and 5'- AGC CAC CTG AGG GGT AAG- 3', 10x PCR buffer (10mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3.5mmol MgCl₂), 200 µmol dNTPs and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil). After an initial denaturation step 12 minutes at 95 °C, 15 cycles of amplification were performed (30 seconds at 95°C, 30 seconds at 58°C and 1 minute at 72°C), followed by 25 cycles (30 seconds at 95°C, 30 seconds at 55°C and 1 minute at 72°C). A final 5 minutes extension step at 72°C terminated the process. Approximately 15µl of PCR products was digested for 24h hours at 37°C with 2.5 U of BsmAI restriction enzyme (Biolabs, New England) in a final volume of 18µl. Restriction digests DNA was analyzed on a polyacrylamide gel (2%) (Invitrogen) containing ethidium bromide. Genotypes were determined by characteristics band patterns: two bands (329pb and

104pb) for homozygous wild type, four bands (329pb, 222pb, 107pb and 104pb) for heterozygote mutant and three bands (222pb, 107pb and 104pb) for homozygous mutant.

Statistical Analyses

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. The parametric ANOVA test confirmed by the Bonferroni post hoc test and the nonparametric Kruskal-Wallis test were used to compare means among two or more groups of interval variables that were normally distributed and not normally distributed, respectively. The interactions between specific categorical clinical variables were tested for significance using a χ^2 test corrected by Yates's χ^2 and Fisher's exact tests, taking into account the expected frequency in the table cells.

The statistical analysis was developed to test dependent variables associated with clinical data and cause of hospital admission and all demographic, epidemiological and clinical information and management were collected from hospital records. The data analysis was performed using EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia, USA), the Statistics Data Analysis (STATA) SE 10 (StataCorp, Texas, USA), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and using IBM SPSS Statistics 19.0 (CDC, Atlanta, Georgia). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Study population and physical characteristics

P. vivax positive (n= 175) patients attending the Tropical Medicine Foundation of Amazonas, hospital in Manaus, Brazil with confirmed diagnosis for mono-infections were enrolled to study GST gene polymorphism and its implications in disease pathogenesis. Patients with comorbidities, mixed plasmodial infections and virus infection were excluded from this study. As no specific criteria exists for classification of *P. vivax* patients into uncomplicated or severe malaria. We used the criteria described for *P. Falciparum* by World Health Organization (WHO). Table 1 represents epidemiological and severity criteria used to classify the study group. Patients presenting with uncomplicated malaria (n= 118) and severe malaria represented (n= 57) represented 67.43 and 32.57% of the study population, respectively. Majority of severe malaria cases were characteristic of Jaundice (85.96%), hemoglobinuria (26.67%) and acute respiratory distress (10.53%) (Table 1).

GST gene polymorphism in *P.vivax* infection

For all uncomplicated and severe malaria cases DNA sample was collected on the filter paper to study the relation between human genetic factors and malaria disease presentation. DNA was isolated from filter paper and amplified by PCR and/or restriction-enzyme digested and visualized on gel, for detection of deletion (Null) in GSTT1, GSTM1 genes or mutation (A313G) in GSTP1 gene. Next, we compared the frequency of distribution of GST alleles in uncomplicated and severe malaria vivax patients (Table 2). We observed no statistically significant differences in GSTT1 (Null), GSTM1 (Null) gene frequency between uncomplicated and severe vivax malaria cases in our study population. Furthermore, a

comparison of uncomplicated and severe malaria cases for double or single deletion of GSTT1 and GSTM1 genes, we observed no differences between our study groups. In addition, we estimated the frequency of A313G mutation in GSTP1 gene and observed no significant differences between uncomplicated and severe malaria patients.

Collectively, we observed no significant risk associated in malaria patients with GSTT1, GSTM1 or GSTP1 gene polymorphism in our study population.

Biochemical and Hematological analysis of patients with GST polymorphism and *P. vivax* infection

GST proteins play an important role in reducing the oxidative stress caused by parasitic and parasite-induced host factors.^{33, 36} Furthermore, oxidative stress has been shown to have an important in cell regulation, with effects on gene regulation. We measured biochemical and hematological parameters in *P. vivax* infected patients to identify markers that may be associated with GSTT1, GSTM1 or GSTP1 gene polymorphism contributing to malaria clinical disease. Relatively high platelet count ($p < 0.022$) and platelet cell volume ($p < 0.033$) were measured in patients with GSTM1 deletion (Null) compared to patients with wild type gene (Table 3). In addition, an increased platelet number ($p < 0.018$) and platelet cell volume ($p < 0.037$) in patients with single or double deletions in GSTT1 and GSTM1 genes in vivax malaria patients was estimated (Table 3). Moreover, a statistically significant increase in platelet numbers ($p < 0.006$) and Red Cell Distribution Width (RDW) ($p < 0.009$) was present in patients with complete deletions for GSTT1 and/or GSTM1 genes compared to patients expressing wild type alleles (Table 3).

In contrast, an increased level of direct ($p < 0.031$) and total ($p < 0.039$) bilirubin was detected in-patient serum that had heterozygous or homozygous A313G mutation in GSTP1 gene

compared to wild type allele (Table 4). In addition, *P.vivax* patients with homozygous mutation for SNP A313G had statistically significant decrease in direct ($p<0.022$) and total ($p<0.023$) serum bilirubin (Table 4). Furthermore, we also observed decreased number of RBCs ($p<0.031$) and amount of hemoglobin ($p<0.042$) in patients with a homozygous mutation (A313G) in GSTP1 gene compared to patients expressing wild type haplotype (Table 4). *P. vivax* infected patients homozygous for A313G mutation in GSTP1 gene had significantly decreased hematocrit ($p<0.039$) and RDW ($p<0.025$) levels compared to patients with wild type allele.

However, we observed no significant differences in any of the leukocyte measured in vivax patients when compared depending on their GSTT1, GSTM1 and GSTP1 gene polymorphism (data not shown). Overall an increased amount of platelet numbers and platelet cell volume was measured in patients with GSTT1/GSTM1 deletion. Whereas, decreased amounts of markers that suggest anemia were measured in patients with homozygous A313G mutation in GSTP1 gene.

Influence of GST gene polymorphism on indicators of severe malaria

P. vivax infections have long been neglected and mistakenly considered 'benign' but several studies have observed thrombocytopenia, anemia, jaundice and acute respiratory distress syndrome related complications in vivax infections. We next compared GST haplotypes with hematological and biochemical parameters described as indicators of severe falciparum in malaria patients by WHO. Firstly, we divided uncomplicated and severe malaria cases with two groups depending on the platelet numbers and presence or absence of hemolysis (Table 5). We observed increased platelet numbers in severe malaria patients with homozygous deletion of GSTM1 ($p<0.04$) compared to severe malaria patients with wild type allele. In

addition, we observed a further increased platelet numbers in patients with heterozygous or homozygous deletion ($p < 0.045$) or only double homozygous deletion ($p < 0.026$) for GSTT1 and GSTM1 genes compared to wild type allele (Table 5). In contrast, we did not observe any significant differences in uncomplicated malaria patients when analyzed with reference to platelet numbers (Table 5). Moreover, an increased risk of hemolysis was associated with heterozygous or homozygous deletion for GSTT1 and GSTM1 genes ($p < 0.033$) (Table 5). In contrast, double deletion of GSTM1 gene ($p < 0.025$) was associated with increased risk of hemolysis in severe malaria risk group (Table 5). No differences were observed in the uncomplicated malaria group when compared for hemolysis. GSTT1 and GSTM1 deletion not only demonstrate a destructive role in RBC hemolysis but also imply a protective role that may protect patients from thrombocytopenia.

Anemia accounts for a major of the severe *P.vivax* malaria cases, usually associated with jaundice in these patients. Uncomplicated and severe malaria cases were classified into two groups depending on the RBC number, hemoglobin content or hematocrit levels and checked for the influence of GST gene polymorphism on these hematological parameters. Using criteria for jaundice (total bilirubin ≥ 2.5 mg/dl) we observed an increased risk for jaundice in patients with heterozygous or homozygous ($p < 0.034$) and homozygous ($p < 0.022$) mutation for A313G in GSTP1 gene (Table 6). Furthermore, an increased risk of renal failure ($p < 0.024$) was associated with heterozygous or homozygous mutation in patients with A313G mutation in GSTP1 gene.

In accordance with increased risk for jaundice, we observed decreased RBC number in severe malaria patients with heterozygous or homozygous A313G mutation compared to patients with wild type allele. In addition, decreased levels of hemoglobin ($p < 0.019$) and hematocrit

($p < 0.008$) were measured in patients with heterozygous or homozygous A313G GSTP1 gene mutation compared to wild type haplotype. In short, we observed an increased risk of anemia in patients with GSTP1 mutations is in accordance with the hematological parameters measured.

DISCUSSION

In this study, we set out to systematically identify GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic variation in uncomplicated and severe vivax malaria infected patients to identify influence of gene polymorphism on disease presentation. Specifically, we measured hematological and biochemical parameters in these patients and examined the association between GST polymorphism and *P. vivax* disease. Moreover, to the best of our knowledge, our investigation is the first report to evaluate an association between GST gene polymorphism and biochemical levels in clinical vivax malaria and their association with disease in an adult population residing in a high *P. vivax* prevalent region (Amazon, Brazil).

Contrary to expectations we did not find any significant differences in the distribution of GSTT1 and GSTM1 gene deletion in uncomplicated and severe vivax malaria patients in Amazon, Brazil. Previous reports, from Cameroon and Tanzania had also found no differences in GSTT1 distribution between uncomplicated and severe malaria falciparum patients. However, a significant distribution of GSTM1 gene deletion was observed in Cameroon and Tanzania in severe falciparum patients. Furthermore, GSTP1 was demonstrated to be important in African and Indian patients infected with falciparum and vivax malaria, respectively.^{22, 33, 34} Moreover, there was no significant distribution of GSTP1 A313G mutation in our study population in Amazon. GST gene haplotypes have been shown to be distributed unequally depending on the ethnic groups. Moreover, frequency of SNPs distribution does not seem to explain the full extent of variation in expression raising the possibility of variations in disease risk and different responses to drug therapy and subsequent influence on transcription.³⁷

Thrombocytopenia is not a WHO criterion for severe malaria but several studies have shown it to be a common complication in both *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. Lacerda et.al reviewed the literature and demonstrated that platelet counts under 150,000/mm³ ranged from 24-94% in patients with acute malaria. Free radicals may play an important role in the platelet destruction and GST play an important role in encountering the free radicals to reduce oxidative stress responses. In our study, we observed patients with GSTT1 and GSTM1 gene deletion had more platelets compared to individuals with wild type allele. Which suggests a protective role of GSTT1 and GSTM1 gene deletion in patients with vivax malaria in accordance with platelet count and platelet cell volume. Further, it would be interesting to see in these patients, if they can be protected from infections that are known to cause thrombocytopenia such as Dengue virus.

World Health Organization (WHO) criterion for severe anemia is hemoglobin below 5 g/dL in children and under 7 g/dL in adults. However, there is scarce literature on vivax malarial anemia in population-based studies in Latin America, as reviewed elsewhere.³⁸ The cut-off of hemoglobin under 12 g/dL as a criterion of anemia in our study should be seen with skepticism because of age ranges and the lack of baseline levels of hemoglobin validated to specific populations. However, comparison of vivax patients with GSTP1 (A313G) mutation with patients with wild type gene we observed an increased risk of jaundice and renal failure. This was in accordance with the increased direct and total bilirubin amounts in serum of patients with A313G mutation. When we analyzed patients with severe malaria we observed a significant association of GSTP1 mutation (A313G) with decreased number of RBCs and amounts of hemoglobin and hematocrit levels in these vivax infected patients. Sohail et.al demonstrated that Ile105Val (A313G) mutation causes decreased GST enzyme expression that may affect its ability in reducing oxidative stress.

In summary, we demonstrate that GSTT1 and GSTM1 gene deletion may be partly beneficial in patients, as they had decreased risk of thrombocytopenia compared to patients with wild type gene. On the other hand, we observed an increased risk in patients with GSTP1 homozygous or heterozygous A313G mutation in causing jaundice and severe anemia. Regardless of the exact functional relevance, based on existing evidence and our findings, we hypothesize that the GST gene polymorphism is associated with an increased risk of disease progression in vivax infection. Furthermore, GST proteins play diverse roles, from phase II drug metabolism to the regulation of apoptosis in cells. Functional and epidemiological implications of GST polymorphism may not only improve our understanding of malaria pathogenesis but also help us comprehend the individual variation in response to antimalarial drug therapy.

Table 1. Epidemiological and physical parameters for uncomplicated and severe P. vivax malaria patients from Manaus, Amazon.

	Uncomplicated (n = 118)	Severe (n = 57)	p-value*
Gender (% male)	53/118 (44.92%)	36/57 (63.16%)	
Age (years)	27.09 ± 19.78	30.75 ± 18.1	0.194
Temperature (°C)	36.59 ± 1.08	36.57 ± 0.93	0.870
Weight (Kg)	49.42 ± 26.96	55.42 ± 23.42	0.096
Numbers of days in hospital	3.02 ± 1.86	3.61 ± 4.29	0.362
Asexual Parasite Density (/mL)	27663.7 ± 61589.0	32379.16 ± 101291.59	0.687
Platelet Count (X 10 ⁹ /L)	107.39 ± 124.1	120.31 ± 132.71	0.422
White Blood Cells (WBC) (x10 ⁶ /L)	6.39 ± 2.92	7.36 ± 4.45	0.116
Red Blood Cells (RBC) (x10 ⁶ /mL)	3.82 ± 0.734	3.26 ± 1.103	0.000
Hemoglobin Concentration, median (g/dl)	10.76 ± 2.30	9.49 ± 2.96	0.004
Hematocrit (%)	32.53 ± 6.82	28.27 ± 8.69	0.001
Reticulocytes (%)	2.18 ± 2.52	4.59 ± 5.40	0.004
Jaundice	56/118 (47.46%)	49/57(85.96%)	
Hyperbilirubinemia (total bilirubin ≥ 2.5mg/dl)	8/58 (13.79%)	49/57 (85.96%)	
Acute Respiratory Distress	0/118	6/57(10.53%)	
Renal Failure	1/79 (1.27%)	3/57(5.26%)	
Hemoglobinuria	5/50 (10%)	12/45 (26.67%)	
Hematuria	2/40 (5%)	3/35 (8.57%)	
Reduced Consciousness	2/60 (3.33%)	6/57 (10.53%)	

Continuous variables are presented as mean ± SD

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/ Bonferroni test

Table 2. Genotypic distribution of GSTs polymorphisms among uncomplicated and severe vivax malaria patients.

Genotype		<i>P. vivax</i> malaria		p-value*
		Uncomplicated n (%)	Severe n (%)	
GSTT1	WT ^{Theta} /WT ^{Theta}	91	44	.370 ^a
	Null ^{Theta} /Null ^{Theta}	20 (18.02%)	12 (21.43%)	
GSTM1	WT ^{Mu} /WT ^{Mu}	80	38	.506 ^a
	Null ^{Mu} /Null ^{Mu}	38 (32.2%)	19 (33.3%)	
GSTT1/GSTM1	WT ^{Theta} /WT ^{Mu}	50	27	.322 ^a
	WT ^{Theta} /Null ^{Mu}	68 (57.63%)	30 (52.63%)	
	Null ^{Theta} /WT ^{Mu}			
	Null ^{Theta} /Null ^{Mu}			
GSTT1/GSTM1 (2)	WT ^{Theta} /WT ^{Mu}	110	53	.590 ^b
	Null ^{Theta} /Null ^{Mu}	8 (6.78%)	4 (7.02%)	
GSTP1	WT/WT	23	12	.964 ^a
	WT/A313G	33 (51.56%)	18 (51.43%)	
	A313G/A313G	8 (12.5%)	5 (14.29%)	

GSTT1/GSTM1: Null genotype on one or both of the two genes

GSTT1/GSTM1 (2): Null genotype on both of the two genes

WT^{Theta} : Wild Type for Theta gene

WT^{Mu} : Wild Type for Mu gene

Null^{Theta} : Null genotype for Theta gene

Null^{Mu} : Null genotype for Mu gene

^a χ^2 test (Yates's corrected); ^bFisher's exact test

Table 3. Haematological and Biochemical parameters for all patients with vivax malaria (GSTT1 and GSTM1).

Haematological and Biochemical Data	GSTT1/M1								
	GSTM1 WT ^{Mu} /WT ^{Mu} (n=76)	GSTM1 Null ^{Mu} /Null ^{Mu} (n=41)	p-value*	GSTT1/M1 WT ^{Theta} /WT ^{Mu} (n=56)	GSTT1/M1 WT ^{Theta} /Null ^{Mu} Null ^{Theta} /WT ^{Mu} Null ^{Theta} /Null ^{Mu} (n=61)	p-value*	GSTT1/M1 WT ^{Theta} /WT ^{Mu} (n=108)	GSTT1/M1 Null ^{Theta} /Null ^{Mu} (n=09)	p-value*
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	3.70 ± 0.89	3.54 ± 1.02	.400	3.74 ± 0.92	3.53 ± 0.95	.226	3.67 ± 0.94	3.32 ± 0.84	.285
Haemoglobin (g/dL)	10.62 ± 2.68	10.18 ± 2.45	.384	10.78 ± 2.74	10.14 ± 2.42	.185	10.54 ± 2.61	9.64 ± 2.46	.324
Haematocrit (%)	31.83±7.93	30.48 ± 7.45	.370	32.20±8.17	30.44 ± 7.26	.222	31.52 ± 7.80	29.32 ± 7.30	.416
Reticulocyte count (%)	2.62 ± 3.13	3.71 ± 4.11	.153	2.52 ± 2.5	3.46 ± 4.26	.195	2.80 ± 3.35	5.40 ± 4.70	.059
RDW	13.27 ± 2.11	13.98 ± 2.57	.111	13.29 ± 2.23	13.76 ± 2.36	.277	13.36 ± 2.21	15.41 ± 2.60	.009
Platelet Count (x 10 ⁹ /L)	94.96 ± 108.03	152.15±156.2	.022	88.15 ± 91.97	144.25 ± 156.02	.018	105.61 ± 107.90	227.67 ± 266.63	.006
Platelet Mean Cell Volume (fL)	9.70 ± 1.82	9.03 ±1.06	.033	9.76 ± 1.94	9.14 ±1.12	.037	9.51 ± 1.65	8.92 ± 1.11	.298
Indirect Bilirubin (mg/dL)	2.19 ± 2.96	1.69 ± 3.75	.445	2.37 ± 3.11	1.64 ± 3.38	.239	2.11 ± 3.36	0.88 ± 1.19	.277
Direct Bilirubin (mg/dL)	1.89 ± 2.07	2.44 ± 3.66	.311	1.91 ± 2.22	2.26 ± 3.20	.493	2.19± 2.81	0.83 ± 0.51	.152
Total Bilirubin (mg/dL)	4.02 ± 3.97	4.08 ± 6.08	.944	4.20 ± 4.26	3.87 ± 5.34	.717	4.24 ± 4.93	1.71 ± 1.44	.128
LDH (U/L)	800.46 ± 386.62	821.64 ±472.25	.805	781.0 ± 376.8	837.15 ± 457.07	.487	824.77 ± 451.39	809.29 ± 461.72	.626
Lactate	1.83 ± 1.35	1.90 ± 1.19	.820	1.73 ± 1.10	1.99 ± 1.47	.345	1.79 ± 1.17	1.68 ± 0.99	.504
AST (U/L)	73.26 ± 114.70	46.98 ± 36.75	.162	71.66 ± 1123.24	55.85 ± 51.44	.380	64.06 ± 98.10	63.78 ± 61.40	.993
ALT (U/L)	65.49 ± 68.21	54.18 ± 54.83	.369	60.50 ± 70.34	62.52 ± 57.46	.867	58.41 ± 60.72	97.00 ± 89.07	.082
Alkaline Fosfatase	333.83 ±217.24	308.67 ± 169.42	.537	344.75± 224.53	303.83 ± 171.97	.297	319.24± 204.44	380.44 ± 146.84	.383
Creatinine (mg/dL)	1.00 ± 0.70	1.04 ± 1.19	.805	1.00 ± 0.74	1.03 ± 1.05	.874	1.03 ± 0.93	0.76 ± 0.31	.420
Urea (mg/dL)	37.07 ± 22.02	42.07 ± 38.84	.379	37.10 ± 21.90	40.70 ± 35.22	.510	39.74 ± 30.03	28.44 ± 8.99	.265

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics

ALT: Aspartate Aminotransferase

LDH: Lactate dehydrogenase

AST: Aspartate Aminotransferase

RBC: Red Blood

Cells RDW: Red Cell Distribution Width

Table 4. Haematological and Biochemical parameters for all patients with vivax malaria (GSTP1).

Haematological and Biochemical Data	GSTP1 WT/WT (28)	GSTP1 WT/A313G (39)	p-value*	GSTP1 WT/WT (28)	GSTP1 WT/A313G/A313G (51)	p-value*	GSTP1 WT/WT (28)	GSTP1 A313G/A313G (12)	p-value*
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	3.84 ± 0.98	3.57 ± 0.84	.224	3.84 ± 0.98	3.45 ± 0.87	.077	3.84 ± 0.98	3.10 ± 0.91	.031
Haemoglobin (g/dL)	10.90 ± 2.52	10.17 ± 2.38	.239	10.89 ± 2.52	9.91 ± 2.43	.095	10.89 ± 2.52	9.06 ± 2.51	.042
Haematocrit (%)	32.67 ± 7.53	30.63 ± 7.39	.272	32.67 ± 7.53	29.79 ± 7.54	.109	32.67 ± 7.53	27.08 ± 7.71	.039
Reticulocyte count (%)	1.93 ± 1.48	3.35 ± 3.49	.075	1.93 ± 1.48	3.02 ± 3.35	.146	1.93 ± 1.48	2.17 ± 2.91	.755
RDW	14.16 ± 2.26	13.85 ± 2.49	.606	14.16 ± 2.26	13.50 ± 2.47	.248	14.16 ± 2.26	12.37 ± 2.10	.025
Platelet Count (x10 ⁹ /L)	78.21 ± 60.11	128.82 ± 158.98	.114	78.21 ± 60.11	121.86 ± 144.85	.132	78.21 ± 60.11	99.25 ± 85.59	.379
Platelet Mean Cell Volume (fL)	9.26 ± 1.05	9.30 ± 1.17	.877	9.26 ± 1.05	9.28 ± 1.17	.942	9.26 ± 1.05	9.20 ± 1.24	.882
Indirect Bilirubin (mg/dL)	1.32 ± 1.59	2.36 ± 4.26	.230	1.32 ± 1.59	2.25 ± 3.97	.246	1.32 ± 1.59	1.93 ± 3.12	.421
Direct Bilirubin (mg/dL)	1.18 ± 1.06	2.70 ± 3.80	.044	1.18 ± 1.06	2.81 ± 3.84	.031	1.18 ± 1.06	3.15 ± 4.11	.022
Total Bilirubin (mg/dL)	2.45 ± 1.88	4.93 ± 6.51	.055	2.45 ± 1.88	4.97 ± 6.16	.039	2.45 ± 1.88	5.08 ± 5.20	.023
LDH (U/L)	768.76 ± 292.05	87.66 ± 481.42	.721	768.76 ± 292.05	804.21 ± 473.58	.734	768.76 ± 292.05	794.17 ± 470.51	.841
Lactate	2.20 ± 1.74	1.63 ± 0.92	.148	2.20 ± 1.74	1.83 ± 1.12	.327	2.20 ± 1.74	2.31 ± 1.44	.858
AST (U/L)	59.57 ± 53.70	48.90 ± 34.78	.335	59.57 ± 53.70	49.10 ± 34.09	.299	59.57 ± 53.79	49.75 ± 33.35	.562
ALT (U/L)	73.74 ± 63.32	52.00 ± 48.88	.126	73.74 ± 63.32	48.04 ± 44.09	.041	73.74 ± 63.32	35.83 ± 21.18	.052
Alkaline Fosfatase	329.31 ± 189.5	318.95 ± 117.6	.825	329.31 ± 189.5	315.40 ± 175.24	.752	329.31 ± 189.5	303.45 ± 174.85	.701
Creatinine (mg/dL)	0.88 ± 0.48	1.01 ± 0.74	.402	0.88 ± 0.48	1.17 ± 1.27	.244	0.88 ± 0.48	1.66 ± 2.21	.080
Urea (mg/dL)	35.43 ± 17.00	36.63 ± 21.32	.806	35.43 ± 17.00	44.26 ± 39.18	.261	35.43 ± 17.0	68.42 ± 66.89	.018

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics

ALT: Aspartate

Aminotransferase

LDH: Lactate dehydrogenase

AST: Aspartate

Aminotransferase

RDW: Red Cell Distribution Width

RBC: Red Blood Cell WT/WT: Wild Type

WT/A313G: Heterozygous

Genotype

A313G/A313G: Homozygous Genotype

Table 5. Genotypic and allelic distribution of GSTT1 and GSTM1 in uncomplicated and severe vivax malaria patients.

Genotype		Uncomplicated malaria		RR (CI)	p-value*	Severe malaria		RR (CI)	p-value*
		Platelets $\geq 150 \times 10^3$	Platelets $< 150 \times 10^3$			Platelets $\geq 150 \times 10^3$	Platelets $< 150 \times 10^3$		
GSTM1	WT ^{Mu} /WT ^{Mu}	8	30	0.66 (0.28-1.58)	.353 ^b	5	33	0.36 (0.13–0.98)	.040^a
	Null ^{Mu} /Null ^{Mu}	7	15			7	12		
GSTT1/GSTM1	WT ^{Theta} /WT ^{Mu}	5	23	0.57 (0.22-1.47)	.236 ^a	3	26	0.32 (0.10–1.07)	.045^b
	WT ^{Theta} /Null ^{Mu}	10	22			9	19		
	Null ^{Theta} /WT ^{Mu}								
	Null ^{Theta} /Null ^{Mu}								
GSTT1/GSTM1 (2)	WT ^{Theta} /WT ^{Mu}	14	41	1.27 (0.21-7.78)	.633 ^b	9	44	0.23 (0.10–0.51)	.026^b
	Null ^{Theta} /Null ^{Mu}	1	4	3		1			
		Hemolysis (No)	Hemolysis (Yes)			Hemolysis (No)	Hemolysis (Yes)		
GSTM1	WT ^{Mu} /WT ^{Mu}	28	1	0.97 (0.90-1.03)	.604 ^b	13	3	2.44 (0.94–6.32)	.025^b
	Null ^{Mu} /Null ^{Mu}	19	0			3	6		
GSTT1/GSTM1	WT ^{Theta} /WT ^{Mu}	21	0	1.04 (0.96-1.12)	.563 ^b	11	2	2.03 (1.0–4.12)	.033^b
	WT ^{Theta} /Null ^{Mu}	26	1			5	7		
	Null ^{Theta} /WT ^{Mu}								
	Null ^{Theta} /Null ^{Mu}								

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics WT^{Theta} : Wild Type for Theta gene

WT^{Mu} : Wild Type for Mu gene

Null^{Theta} : Null genotype for Theta gene

Null^{Mu} : Null genotype for Mu gene

a χ^2 test (Yates's

corrected); b Fisher's exact test

RR: Risk Ratio; (CI): Intervals of Confidence

Table 6. Genotypic and allelic distribution of GSTP1 in uncomplicated and severe vivax malaria patients.

Genotype	Uncomplicated malaria		RR (CI)	p-value*	Severe malaria		RR (CI)	p-value*	
	RBC □ 3.9 x10 ⁶ mm ³	RBC ≤ 3.9 x10 ⁶ mm ³			RBC □ 3.9 x10 ⁶ mm ³	RBC ≤ 3.9 x10 ⁶ mm ³			
GSTP1	WT/WT	8	8	1.08 (0.57- 2.02)	.822 ^a	7	5	4.47 (1.40-14.25)	.008^b
	WT/A313G	13	15			3	20		
	A313G/A31 G								
Genotype	Hemoglobin □ 11.5g/dl	Hemoglobin ≤ 11.5g/dl	RR (CI)	p-value*	Hemoglobin □ 11.5g/dl	Hemoglobin ≤ 11.5g/dl	RR (CI)	p-value*	
	Hematocrit □ 33.9%	Hematocrit ≤ 33.9%			Hematocrit □ 33.9%	Hematocrit ≤ 33.9%			
GSTP1	WT/WT	8	8	1.40 (0.70- 2.81)	.359 ^a	7	5	3.35 (1.22-9.22)	.019^b
	WT/A313G	10	18			4	19		
	A313G/A31 G								
GSTP1	WT/WT	7	9	1.02 (0.51- 2.06)	.955 ^a	7	5	4.47 (1.40- 14.25)	.008^b
	WT/A313G	12	16			3	20		
	A313G/A31 G								

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics

a χ^2 test (Yates's corrected); b Fisher's exact test

RR: Risk Ratio; (CI): Intervals of Confidence

WT/WT: Wild Type

WT/A313G: Heterozygous Genotype

A313G/A313G: Homozygous Genotype

Table 7. Clinical comparison of allelic distribution in GSTP1 vivax malaria patients.

Clinical Data		Jaundice (No)	Jaundice (Yes)	OR (CI)	p-value*
GST Pi	WT/WT	19 (48.72%)	16 (45.71%)		
	WT/A313G	18(46.15%)	33(64.70%)		.034
	A313G/A313G	2(5.13%)	11(84.62%)		
GST Pi	WT/WT	19 (48.72%)	16 (26.67%)	2.61 (1.117-6.109)	.022
	WT/A313G	20(51.28%)	44(73.33%)		
	A313G/A313G				
		Renal failure (No)	Renal failure (Yes)		
GST Pi	WT/WT	29 (34.94%)	0		
	WT/A313G	44 (53.01%)	1 (33.33%)		.024
	A313G/A313G	10 (12.05%)	2 (66.66%)		
GST Pi	WT/WT	29 (34.94%)	0		.286
	WT/A313G	54 (65.06%)	3 (100%)		
	A313G/A313G				

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics

a χ^2 test (Yates's corrected); b Fisher's exact test; c ANOVA; OR: Odds Ratio; (CI): Intervals of Confidence
 WT/WT: Wild Type WT/A313G: Heterozygous Genotype
 A313G/A313G: Homozygous Genotype

Acknowledgements:

We thank medical staff of the hospital in which the patients were studied, and we also thank the patients who gave their informed consent to participate in the study.

Funding:

This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq).

Conflict of interest: None. The sponsors of this study were public or non-profit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analysing or interpreting the data.

Ethical approval: The study was approved by The National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, and provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

REFERENCES

- 1- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza Neto SB, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, Barral-Neto M, 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9:13.
- 2 – Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT, 2010. Malaria in Brazil: na overview. *Malar J* 9:115.
- 3- Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre MAA, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, Santana Filho FS, Brasil P, Ventura AMRS, Tada MS, Couto VSCD, Silva AR, Silva RSU, Alecrim MGC, 2012. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Mala J* 11:12.
- 4- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, Alecrim MGC, 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16:1611-1614.
- 5- Siqueira AM, Alexandre MAA, Mourão MPG, Santos VS, Nagahashi-Marie SR, Alecrim MGC, Lacerda MVG, 2010. Severe Rhabdomyolysis caused by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J trop Med Hyg* 83:271-273.

- 6- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia, 2008. PLoS Med 5:890-899.
- 7- Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Muller I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea, 2008. PLoS Med 5:881-889.
- 8- Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, Sugiarto P, Tjitra E, Anstey NM, Price RN. *Vivax* Malaria: A Major Cause of Morbidity in Early Infancy, 2009. Clinical Infection Disease 48:1704-1712.
- 9- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria, 2005. EmergInfect Dis 11:132-134.
- 10- Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri M P, Gupta V. Severe *Plasmodium vivax* Malaria: A Report on Serial Cases from Bikaner in Northwestern India, 2009. Am J Trop Med Hyg 80:194-198.
- 11-Andrade BB, Barral-Neto M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria, 2011. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106:70-78.

- 12- Santos SS, Clark TA, Campino S, Suarez-Mutis MC, Rockett KA, Kwiatkowski DP, Fernandes O. Investigation of host candidate malaria-associated risk protective SNPs in a Brazilian Amazonian population, 2012. PLoS One 7
- 13- Manjurano A, Clarck TG, Nadjm B, Mtove G, Wangai H, Sepulveda N. Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzarian population, 2012. PLoS One 7.
- 14- Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, Vilhena TC, Dolabela MF, Green MD. Oxidative stress in malaria, 2012. Int J MolSci 13:16346-16372.
- 15- Araújo CF, Lacerda MV, Abdalla DS, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with *vivax* malaria, 2008. Mem Inst Oswaldo Cruz 103:517-521.
- 16- Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? , 2011. Mem Inst Oswaldo Cruz 106:52-63.
- 17- Guha M, Kumar S, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyayi U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway, 2006. FASEB J 20:1224-1226.

18. Kulkarni AG, Suryakar AN, Sardeshmukh AS, Rathi DB. Studies on biochemical changes with special reference to oxidant and antioxidants in malaria patients, 2003. Indian J Clin Biochem 18:136-149.
- 19- Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis, 2010. Eur J Cancer 46:1617-1631.
- 20- Palodetto B, Postal M, Grignoli CRE, Sartorato EL, Oliveira CA. Influence of glutathione s-transferase on the ototoxicity caused by aminoglycosides, 2010. Braz J Otorhinolaryngol 76:306-309.
- 21- Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology, 2012. BiochimBiophysActa 22:
- 22- Kavishe RA, Bousema T, Shekalaghe SA, Sauerwein RW, Mosha FW, Van Der Ven AJ, Russel FGM, Koenderink JB. Common Genotypic Polymorphisms in Glutathione S-Transferases in Mild and Severe *Falciparum* Malaria in Tanzanian Children, 2009. Am J Trop Med Hyg 81: 363-365.
- 23- Suneetha KJ, Nancy KN, Rajalekshmy KR, Rama R, Sagar TG, Rajkumar T. Role of glutathione-s-transferase and CYP1A1*2A polymorphisms in the therapy outcome of south Indian acute lymphoblastic leukemia patients, 2011. Indian J of Med PaediatrOncol 32:25-29.

- 24- Hiragi CO. Análise da variação de marcadores genéticos associados ao estresse oxidativo em grupos populacionais brasileiros, 2010. Tese.
- 25- Maciel ME, OliveiraFK, Propst GB, Bicalho MG, Cavalli IJ, Ribeiro MSF. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants, 2009. *Genet Mol Biol* 32:723-728.
- 26- Magno LAV, Talbot J, Talbot T, Santos AMBS, Souza RP, Marin LJ, Moreli ML, Melo PRS, Côrrea RX, Santos FR, Di Pietro G. Glutathione S-transferase variants in a Brazilian population, 2009. *Pharmacology* 83:231-236.
- 27- Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review, 2010. *Mutat Res* 463:247–283.
- 28- Vasieva O. The Many Faces of Glutathione Transferase Pi, 2011. *Curr Mol Med* 11:129-139.
- 29- Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, Gallo CV, Pinto LF. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population, 2002. *Genet Mol Res* 1:233-240.
- 30- Baclig MO, Alvarez MR, Lozada XMR, Mapua CA, Lozano-Kuhner JP, Dimamay MP, Natividade FF, Gopez-Cervantes J, Matias RR. Association of glutathione S-

transferase T1 and M1 genotypes with chronic liver diseases among Filipinos, 2012. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3:153-159.

31- Saxena A, Dhillon VS, Shahid M, Khalil HS, Kani M, Prasad Das T, Hedau S, Hussain A, Naqvi RA, Deo SV, Shukla NK, Das BC, Husain SA. Methylation and polymorphisms increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer and patients, 2012. *Exp Ther Med* 4:1097-1103.

32- Goncalves MS, Moura Neto JP, Souza CL, Melo Reis MG. Evaluating glutathione S-transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leucopenia, 2009. *Int J Lab Hematol* 32:49-56.

33- Kavishe RA, Koenderink JB, McCall MB, Peters WH, Mulder B, Hermsen CC, Sauerwein RW, Russel FG, Van Der Ven AJ. Severe *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroon: associated with the glutathione S-transferase M1 null genotype, 2006. *Am J Trop Med Hyg*, 75:827-829.

34- Sohail M, Kumar R, Kaul A, Arif E, Kumar S, Adak T. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria compared to *P. falciparum* and upregulates the GST level during malarial infection, 2010. *Free Radic Biol Med* 49:1746-1754.

35-World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria 2006.
[http://www.who.int/malaria/docs/treatment+guidelines 2006.pdf](http://www.who.int/malaria/docs/treatment+guidelines%202006.pdf).

36- Camila et al submitted

37- Moyer AM, Salavaggione OE, Wu TY, Moon I, Eckloff BW, Hildebrandt MA, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM. Glutathione S-transferase P1: gene sequence variation and functional genomic studies, 2008. *Cancer Res.* 68: 4791–4801.

38- Quintero J P, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MV, Valencia SH. Malaria-related anaemia: A Latin American perspective, 2011. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:91-104.

6 CONCLUSÃO

- Este trabalho determinou a frequência dos polimorfismos nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* em pacientes com malária grave e malária não grave por *Plasmodium vivax*; nenhum outro estudo foi publicado a respeito desse tema, sendo este um estudo pioneiro a respeito de gravidade da malária vivax e frequência genotípica das GSTs;
- Não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas das GSTs para malária grave e não grave por *Plasmodium vivax*;
- Indivíduos com malária com deleção no gene *GSTM1* apresentaram maior concentração plaquetária, sugerindo menor risco de trombocitopenia;
- Pacientes com malária vivax grave portadores da deleção nos genes *GSTT1* e *GSTM1* apresentaram menor risco de desenvolverem trombocitopenia daqueles portadores dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* selvagem.
- Pacientes com malária grave, portadores da mutação A313G no gene *GSTP1* em heterozigose ou homozigose apresentaram maior risco de desenvolverem icterícia e anemia comparados aos pacientes portadores do genótipo *GSTP1* selvagem.
- Nosso estudo indica papel importante dos polimorfismos da GST na clínica de portadores de malária vivax, podendo ser relacionado como potencial marcador molecular para avaliação e progressão da doença.

7 PERSPECTIVAS

A situação de malária do país atualmente define-se como de "malária residual", acometendo praticamente a região Amazônica, com predominância restrita para malária vivax, a qual atinge até 80% dos casos. Esta situação caracteriza-se com instabilidade, sempre ameaçando surtos epidêmicos em áreas endêmicas como a Amazônia e com forças de provocar focos em outras regiões do país, estando esta sujeita a grandes oscilações em função de variações como clima, demografia e poder socioeconômico. Portanto, a malária é um desafio sempre atual no Brasil.

Cumpramos ressaltar que os diversos estudos envolvendo marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares alavancaram muito o conhecimento científico em diversas áreas, principalmente as de saúde humana, porém, mesmo com esta grande ala aberta de conhecimentos, pouco impacto nos métodos de controle da malária foi adquirido. O que mais se pensa e se usa atualmente, baseiam-se essencialmente em métodos pouco funcionais a saber, controle de vetores por inseticidas e larvicidas e tratamento de doentes.

O grande número de patologias que afetam o homem desde a séculos, a malária talvez, é a que oferece um quadro paradoxal: estamos vivendo a época da talvez cura da AIDS e do sucesso no tratamento do câncer. Além das excelentes perspectivas para terapia gênica, mesmo com esta imensa gama de conhecimento adquiridos, a malária ainda continua provocando doenças e mortes em muitas partes do mundo, e aqui em nossa região amazônica.

Portanto, este trabalho é apenas um prenúncio para uma visão sintética de novos conhecimentos, principalmente os moleculares podem permitir e desenvolver maiores respostas e conhecimento da a genética tanto do hospedeiro com do parasita.

Neste estudo também encontramos associações fiéis entre a mutação A313G no gene GSTP1 e variáveis clínicas e laboratoriais relevantes, porém exigindo uma maior amostragem para fidelizar e validar nossos promissores resultados na elucidação da influencia deste

polimorfismo na infecção pelo *P. vivax*. Associações importantes entre os genótipos das GSTs em manifestações clínicas como retinopatia, mioartralgia e crepitação foram descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Associações entre os genótipos das GSTs e manifestações clínicas em pacientes com malária vivax.

Genótipo	Malária Não-Grave		RR (CI)	p-value*	Malária Grave		RR (CI)	p-value*	
	Retinopatia (Não)	Retinopatia (Sim)			Retinopatia (Não)	Retinopatia (Sim)			
GSTP1	WT/WT	5	3	0.63 (0.3 7- 1.07)	.057^b	3	0	1.38 (0.96- 1.97)	.453^b
	WT/A313G A313G/A313G	11	0			8	3		
		Mioartarlgia (Não)	Mioartaralgia (Sim)			Mioartralgia (Não)	Mioartralgia (Sim)		
GSTM1	WT/WT	11	62	0.37 (0.1 9- 0.73)	.003^a	7	31	0.88 (0.29- 2.62)	.536^b
	Nulo/Nulo	15	22			4	15		
		Crepitação (Não)	Crepitação (Sim)			Crepitação (Não)	Crepitação (Sim)		
GSTM1	WT/WT	36	2	1.30 (1.0 0- 1.70)	.023^b	33	4	1.00 (0.82- 1.21)	.674^b
	Nulo/Nulo	16	6			17	2		

* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics

a χ^2 test (Yates's corrected); b Fisher's exact test

RR: Risk Ratio; (CI): Intervals of Confidence

WT: Do Inglês Wild Type (Genótipo Selvagem).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, P.; PALLAUI, R.; CHANDRAN, S.; DANDAVATI, V.; SAYEED, S. K. Clinical Proteomics of the Neglected Human Malarial Parasite *Plasmodium vivax*. **Plos One**. v. 6, p. 1-9, 2011.

AKHWALE, W. S.; LUM, J. K.; KANEKO, A.; ETO, H.; OBONYO, C.; BJORKMANA, A.; KOBAYAKAWA, T. Anemia and malaria at different altitudes in the western highlands of Kenya. **Acta Tropica**. v. 91, p. 167-175, 2004.

ALEXANDRE, Márcia Almeida de Araújo. **Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária *vivax* em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, p. 1611-1613, 2010.

ALVES, A.; MARTINS, A.; ADOLPHSSON, S.; BOCKOMY, B.; CARLETI, G.; CABRAL, G.; SOUZA, A.C.P.; VIANNA, A. Malária Grave Importada. Relato de Caso. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v.19, p. 323-236, 2007.

ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. **Memoriais Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, p. 70-78, 2011.

ARAÚJO, C. F.; LACERDA, M. V.; ABDALLA, D. S.; LIMA, E. S. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in

thrombocytopenia among patients with *vivax* malaria. **Memoriais do Instituto Oswaldo Cruz.** v.103, p.517-521, 2008.

AYI, K.; MIN-OO, G.; SERGHIDES, L.; CROCHETT, M.; KIRBY-ALLEN, M.; QUIRT, I.; GROS, P.; KAIN, K.C. Pyruvate Kinase Deficiency and Malaria. **The New England Journal of Medicine.** v. 358, p. 1805-1810, 2008.

BARRAVIERA, B. Effect of Antimalarial Drugs and of Clindamycin on Erythrocyte Metabolism. A review. **Revista Instituto Medicina Tropical.** v. 31, p. 200-205, 1989.

BARRAVIERA, B.; MACHADO, P. E. A.; MEIRA, D. A. Glutathion reductase and its relation with riboflavin levels measured by methemoglobin reduction by cystamine in patients with malaria. **Revista Instituto Medicina Tropical.** v. 30, p. 107-108, 1988.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova.** v. 29, p. 113-123, 2006.

BASSAT, Q.; ALONSO, P. L. Between bedside and bench. Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. **Nature Medicine.** v. 17, p. 48-49, 2011.

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERSTROM, J. L.; ROBERTS, D.; ROGERSON, S.; GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology.** v. 34, p.163-189, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 36p.

CALIS, J. C.; PHIRI, K. S.; FARAGHER, E. B.; BRABIN, B. J.; BATES, I.; CUEVAS, L. E. Severe anemia in Malawian children. **The New England Journal of Medicine**. v. 358, p. 888-899, 2008.

CAPPADORO, M.; GIRIBALDI, G.; O'BRIEN, E.; TURRINI, F.; MANNU, F.; ULLIERS, D.; SIMULA, G.; LUZZATTO, L.; ARESE, P. Early Phagocytosis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Erythrocytes Parasitized by *Plasmodium falciparum* May Explain Malaria Protection in G6PD Deficiency. **The American Society of Hematology**. v. 92, p. 2527-2534, 1998.

CARVALHO, B.O.; LOPES, S.C.; NOGUEIRA, P.A.; ORLANDI, P.P.; BARGIERI, D.Y. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. **The Journal of Infections Diseases**. v. 202, p. 638-647, 2010.

COELHO, P. M. B. M.; SALVADOR, A.; SAVAGEAU, M. A. Relating Mutant Genotype to Phenotype via Quantitative Behavior of the NADPH Redox Cycle in Human Erythrocytes. **PLoS Medicine**. v. 5, p. 1-13, 2010.

COSTA, F. T. M.; LOPES, S. C. P.; FERRER, M.; LEITE, J. A.; BERNABEU, L. M.; NOGUEIRA, P. A.; MOURÃO, M. P. G.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; LACERDA, M. V. G.; DEL PORTILLO, H. On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: raison d'être? **Memoriais Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, p. 79-84, 2011.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **The Journal of Cell Biology**. v. 198, p. 961-971, 2012.

DHARIA, N. V.; BRIGHT, A. T.; WESTENBERGER, S. J.; BARNES, S. W.; BATALOV, S.; KUHEN, K.; BORBOA, R.; FEDERE, G. C.; MCCLEAN, C. M.; VINETZ, J. M.; NEYRA, V.; LLANOS-CUENTAS, A.; BARNWELL, J. W.; WALKER, J. R.; WINZELERA, E. A. Whole-genome sequencing and microarray analysis of ex vivo *Plasmodium vivax* reveal selective pressure on putative drug resistance genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p. 20045-20050, 2010.

DRISS, A.; HIBBERT, J. M.; WILSON, N. O.; IGBAL, S. A.; ADAMKIEWICZ, T. V.; STILES, J. K. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. **Malaria Journal**. v. 10, p.1-10, 2011.

ECONOMOPOULOS, K. P.; SERGENTANIS, T. N. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: A comprehensive meta-analysis. **European Journal of Cancer**. v. 46, p. 1617-1631, 2010.

EREL, O.; VURAL, H.; AKSOY, N.; ASLAN, G.; ULUKANLIGIL, M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with *vivax* malaria. **Clinical Biochemistry**. v. 34, p. 341-344, 2001.

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; AVCI, S.; AKTEPEN, N.; BULUT, V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erithrocytes in patients with *vivax* malaria. **Clinical Biochemistry**. v. 30, p. 631-639, 2003.

FOLLER, M.; BOBBALA, D.; KOKA, S.; HUBER, S. M.; GULBINS, E.; LANG, F. Suicide for Survival - Death of Infected Erythrocytes as a Host Mechanism to Survive Malaria. **International Journal of Experimental and Clinical Cellular Physiology and Biochemistry and Pharmacology**. v. 24, p. 133-140, 2009.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO: Estatística da em Malária 2012. Disponível em: [□http://www.fmt.am.gov.br](http://www.fmt.am.gov.br)>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2012.

GALLO, V.; SCHWARZER, E.; RAHLFS, S.; SCHIRMER, H.; ZWIETEN, R. V.; ROOS, D.; ARESE, P.; BECKER, K. Inherited Glutathione Reductase Deficiency and *Plasmodium falciparum* Malaria – A case study. **PLoS One**. v.4, p. 7303-7311, 2009.

GAMA, B. E.; LACERDA, M. V. G.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. **Memoriais Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, p. 159-166, 2011.

GENTON, B.; D'ACREMONT, V.; RARE, L.; BAEA, K.; REEDER, J.C.; ALPERS, M.P.; MULLER, IVO. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**. v. 5, p.881-889, 2008.

GEORGE, P.; ALEXANDER, L. M. A study on the clinical profile of complicated *Plasmodium vivax* mono-infections. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p. 560-562, 2010.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 23, p. 358-369, 2011.

GHOBADLOO, S. M.; YAGHMAEI, B.; ALLAMEH, A.; HASSANI, P.; NOORINAYER, B.; ZALI, M.R. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 in patients with HBV-related liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal carriers. **Clinical Biochemistry**. v. 39, p. 46-49, 2006.

GHOBADLOO, S. M.; YAGHMAEI, B.; BAKAYEV, V.; NOORINAYER, B.; ZALI, M. R.; GOUDARZI, H. GSTP1, GSTM1 and GSTT1 Genetic Polymorphisms in Patients with Cryptogenic Liver Cirrhosis. *Journal Gastrointestinal Surgery*. v. 8, p. 423-442, 2004.

GUERRA, C. A.; HOWES, R. E.; PATIL, P. W.; VAN BOECKEL, T. P.; TEMPERLEY, W. H.; KABARIA, C. W.; TATEM, A. J.; MANH, B. H.; ELVAZAR, I. R.; BAIRD, J. K.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. **PLoS Neglected Infectious disease**. v. 4, p. 1-11, 2010.

GUERRA, C.A.; GIKANDI, P.W.; TATEM, A.J.; NOOR, A.M.; SMITH, D.L.; HAY, S.; SNOW, R.W.S. The Limits and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide. **PLoS Medicine**. v. 5, p. 300-311, 2008.

GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAYI, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **The FASEB Journal**. v. 20, p. 1224-1226, 2006.

HIRAGI, Cássia de Oliveira. Análise da variação de marcadores genéticos associados ao estresse oxidativo em grupos populacionais brasileiros. 2010. 108f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade de Brasília, Brasília.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v. 31, p.1170-1179, 2008.

KAMERBEEK, N. M.; ZWIETEN, R. V.; BOER, M. D.; MORREN, G.; VUIL, H.; BANNINK, N.; CARSTEN, L.; DOLMAN, K. M.; BECKER, K.; SCHIRMER, R. H.; GROMER, S.; ROOS, D. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. **The American Society of Hematology**. v. 109, p. 3560-3566, 2007.

KANDEMIR, O.; TAMER, L.; TASDELEN, B. Effects of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 gene polymorphism on the course of hepatitis B virus infection. **Hepatogastroenterology**. v. 55, p. 1729-1733, 2008.

KAVISHE, R. A.; BOUSEMA, T.; SHEKALAGHE, S. A.; SAUERWEIN, R. W.; MOSHA, F. W.; VAN DER VEN, A. A. M.; RUSSEL, F. G. M.; KOENDERINK, J. B. **Common** Genotypic Polymorphisms in Glutathione S- Transferases in Mild and Severe *Falciparum* Malaria in Tanzanian Children. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 81, p. 363-365, 2009.

KAVISHE, R. A.; KOENDERINK, J. B.; MCCALL, M. B. B.; PETERS, W. H. M.; MULDER, B.; HERMSEN, C. C.; SAUERWEIN, R. W.; RUSSEL, F. G. M.; VAN DER VEN, A. J. A. M. Severe Plasmodium *falciparum* malaria in Cameroon: Associated with the glutathione S- transferase M1 null genotype. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 75, p. 827-829, 2006.

KOCHAR, D. K.; DAS, A.; KOCHAR, S. K.; SAXENA, V.; SIROHI, P.; GARG, S.; KOCHAR, A.; KHATRI, M. P.; GUPTA, V. Severe *Plasmodium vivax* Malaria: A Report on Serial Cases from Bikaner in Northwestern India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 80, p. 194–198, 2009.

KOCHAR, D.K.; SAXENA, V.; SINGH, N.; KOCHAR, S.K.; KUMAR, S.V.; DAS, A. *Plasmodium vivax* malaria. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, p. 132-134, 2005.

KREUELS, B.; KREUZBERG, C.; KOBBE, R.; AKONOR, M.A.; APIAH-THOMPSON, P.; THOMPSON, B.; EHMEN, C.; ADJEI, S.; LANGEFELD, I.; ADJEI, O.; MAY, J. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated *falciparum* malaria, anemia, and child growth. **The American Society of Hematology**. v. 115, p. 4551-4558, 2010.

KULKARNI, A. G.; SURYAKAR, A. N.; SARDESHMUKH, A. S.; RATHI, D. B. Studies on biochemical changes with special reference to oxidant and antioxidants in malaria patients. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v. 18, p.136-149, 2003.

KWIATKOWSKI, D. P. How malaria has affect the human genome and what human genetics can teach us about malaria. **The American Journal of Human Genetics**. v. 77, p. 171-190, 2005.

LACERDA, M.V.; MOURÃO, M.P.; ALEXANDRE, M.A.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**. v. 11, p.1-18, 2012.

LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; COELHO, H. C. C.; SANTOS, J. B. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Memoriais Instituto Oswaldo Cruz**. v.106, p. 52-63, 2011.

LACERDA, M. V. G. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. 2007. 395f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), Universidade de Brasília, Brasília.

LACERDA, M. V. G.; OLIVEIRA, S. L.; ALECRIM, M. G. C. Splenic hematoma in a patient with *P. vivax* malaria. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, p. 96-97, 2007.

LACERDA, M.V.; ALEXANDRE, M.A.; SANTOS, P.D.; ARCANJO, A.R.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C. Idiopathic thrombocytopenic purpura due to *vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **Acta Tropical**. v. 90, p.187-190, 2004.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutation Research**. v. 463, p. 247–283, 2000.

LEORATTI, F. M. S.; DURLACHER, R. R.; LACERDA, M. V. G.; ALECRIM, M. G.; FERREIRA, A. W.; SANCHEZ, M. C. A.; MORAES, S. L. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. **Malaria Journal**. v. 7, p.1-11, 2008.

LONGLEY, R.; SMITH, C.; FORTIN, A.; BERGHOUT, J.; MCMORRAN, B.; BURGIO, G.; FOOTE, S.; GROS, P. Host resistance to malaria: using mouse models to

explore the host response. **Official Journal of International Mammalian Genome Society**. v. 22, p. 32-42, 2011.

MACHADO, P.; MENDES, C.; ROSÁRIO, V. E.; AREZ, A. P. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. **Revista pan-amazônica de saúde**. v.1, p. 85-96, 2010.

MACIEL, M. E.; OLIVEIRA, F. K.; PROPST, G. B.; BICALHO, M. G.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, p. 723-728, 2009.

MAGNO, L. A. V.; TALBOT, J.; TALBOT, T.; SANTOS, A. M. B.; SOUZA, R. P.; MARIN, L. J.; MORELI, M. L.; MELO, P. R. S.; CORRÊ R. X.; SANTOS, F. R.; PIETRO, G. Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. **Pharmacology**. v. 83, p. 231–236, 2009.

MANJURANO, A.; CLARCK, T. G.; NADJM, B.; MTOVE, G.; WANGAI, H.; SEPULVEDA, N. Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzanian population. **PLoS One**. v. 7, p. 1-8, 2012.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**. v. 415, p. 673-679, 2002.

MINELLI, C.; GOGELE, M. The role of antioxidant gene polymorphisms in modifying the health effects of environmental exposures causing oxidative stress: A public health perspective. **Free Radical Biology & Medicine**. v.56. p-345-356, 2011.

MO, Z.; GAO, Y.; CAO, Y.; GAO, F.; JIAN, L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. **The Prostate**. v. 69, p. 662-688, 2009.

MOURA NETO, J. P.; GONÇALVES, M. S.; SOUZA, C. L.; MELO, P.; REIS, M. G. Evaluating glutathione S-Transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leucopenia. **The Official journal of the International Society for Laboratory Hematology**. v. 32, p. 49-56, 2009.

NARSARIA, N.; MOHANTY, C.; DAS, B. K.; MISHRA, S. P.; PRASAD, R. Oxidative Stress in Children with Severe Malaria. **Journal of Tropical Pediatrics**. v.18, p-56-58, 2011.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia dinâmica**. 3ªed. São Paulo: Ateneu. 474 p.

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

PICOT. S. Is Plasmodium vivax still a paradigm for uncomplicated malaria? **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 36, p. 406-413, 2006.

POESPOPRODJO, J. R.; FOBIA, W.; KENANGALEM, E.; LAMPAH, D. A.; HASANUDDIN, A.; WARIKAR, N.; SUGIARTO, P.; TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; PRICE, R. N. *Vivax* Malaria: A Major Cause of Morbidity in Early Infancy. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, p. 1704-1712, 2009.

PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Current Opinion on Infection Disease**. v. 22, p. 430–435, 2009.

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. *Vivax* malaria: neglected and not benign. **The American Journal of tropical medicine and hygiene**. v. 7, p. 79-87, 2007.

QUINTERO, J. P.; SIQUEIRA, A. M.; TOBÓN, A.; BLAIR, S.; MORENO, A.; ARÉVALO-HERRERA, M.; LACERDA, M. V. G.; VALENCIA, S. H. Malária related anaemia: a Latin American perspective. **Memoriais Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, p. 91-104, 2011.

REY, Luís. **Bases da parasitologia médica**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 379 p.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C.; AMORIM, L. M.; MACEDO, J. M.; MEDINA, R.; NETO, J. F.; GALLO, C. V.; PINTO, L. F. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genetic Molecular Review**. v. 1, p. 233–240, 2002.

ROVER JR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 24, p. 112-119, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 72, p. 5463-7, 1977.

SENTURK, M.; TALAZ, O.; EKINCI, D.; CAYDAR, H.; KUFREVIÖG, O.I. In vitro inhibition of human erythrocyte glutathione reductase by some new organic nitrates. **Science Direct**. v. 19, p. 3661-3666, 2009.

SERGENTANIS, T. N.; ECONOMOPOULOS, K. P. GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Resolution Treatment**. v. 121, p. 195-202, 2010.

SETIAWAN, B. Current Malaria Management: Guideline 2009. **Acta Medicine Indones-Indones Journal International**. v. 42, p. 258-261, 2010.

SIQUEIRA, A. M.; ALEXANDRE, M. A.; MOURÃO, M. P.; SANTOS, V. S.; NAGAHASHI-MARIE, S. K.; ALECRIM, M. G. Severe rhabdomyolysis caused by Plasmodium *vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 83, p. 271–273, 2010.

SOHAIL, M.; KAUL, A.; RAZIUDDIN, M.; ADAK, T. Decreased glutathione-S-transferase activity: Diagnostic and protective role in *vivax* malaria. **Science Direct**. v. 40, p. 377-382, 2007.

SOHAIL, M.; KUMAR, R.; KAUL, A.; ARIF, E.; KUMAR, S.; ADAK, T. Polymorphism in glutathione S- transferase P1 is associated with susceptibility to

Plasmodium vivax malaria compared to *P. falciparum* and upregulates the GST level during malarial infection. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, p. 1746-1754, 2010.

STRANGE, R. C.; JONES, P. W.; FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicology Letters**. v. 112–113, p. 357–363, 2000.

STRANGE, R.C.; FRYER, A.A.; BOFFETTA, P.; CAPORASO, N.; CUZICK, J.; LANG, M.; VINEIS, P. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on susceptibility to cancer. **Metabolic Polymorphisms and Cancer. IARC Scientific Publications**. v. 148, p. 231–249, 1999.

SUNEETHA, K. J.; NANCY, K. N.; RAJALEKSHMY, K. R.; RAMA, R.; SAGAR, T. G.; RAJKUMAR, T. Role of glutathione-s-transferase and CYP1A1*2A polymorphisms in the therapy outcome of south Indian acute lymphoblastic leukemia patients. **Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology**. v. 32, p. 25- 34, 2011.

TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; SUGIARTO, P.; WARIKAR, N.; KENANGALEM, E.; KARYANA, M.; LAMPAH, D. A.; PRICE, R. N. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. **PLoS Medicine**. v. 5, p. 890-899, 2008.

TAUIL, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. **Memoriais Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, p. 105-106, 2010.

VASIEVA, O. The Many Faces of Glutathione Transferase Pi. **Current Molecular Medicine**. v. 11, p. 129-139, 2011.

VENTURA, Ana Maria Revorêdo da Silva. Anemia da malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes. 2010. 177f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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


WILLIAMS, T. N. Human red blood cell polymorphisms and malaria. **Science Direct**. v. 7, p. 1-7, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report, 2011**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre>>.

ANEXOS

Anexo. Documento de Aprovação do Projeto em Comitê de Ética (CONEP)

16.06.09 15:41	MS	33153701	p. 1
----------------	----	----------	------

 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 343/2009

Registro CONEP 15243 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE 0054.1.114.000-08 **Processo nº 25.000.011.792/2009-15**
Projeto de Pesquisa: "Caracterização clínica da malária complicada por *Plasmodium vivax*". Protocolo versão final de 25/07/2008. TCLE versão final de 16/06/08 com Emenda 1 de 30/03/09.
Pesquisador Responsável: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda
Instituição: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/MT/AM
CEP de origem: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/MT/AM
Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira
Patrocinador: Centro Internacional de Pesquisa em Saúde de Barcelona - Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB)

Sumário geral do protocolo

A malária é endêmica em 92 países e possui foco de transmissão em um adicional de 8 países.

Em documento recente da OMS, há uma afirmação de que a malária vivax, embora seja considerada uma doença benigna, com baixa letalidade, pode provocar doença febril grave e debilitante. Ocasionalmente, resulta em graves doenças, como a malária falciparum. Várias manifestações graves de malária vivax vêm sendo relatadas, a saber: malária cerebral, anemia severa, plaquetopenia severa, pancitopenia, icterícia, ruptura esplênica, insuficiência renal aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. Os mecanismos das manifestações graves não são bem compreendidos.

Um grande número de casos de malária vivax grave é relatado no continente africano, porém, todos foram diagnosticados por exame de gota espessa de sangue, o que pode ter associado uma infecção por *P. falciparum*. Estudos demonstram que outros exames são necessários para definição de monoinfecção por *P. vivax*, tais como teste de detecção de antígeno *P. falciparum/P. vivax* e teste de PCR.

Neste estudo, serão realizados teste de lâmina de gota espessa de sangue, extração de DNA e PCR em tempo real para diagnóstico de *P. falciparum* e *P. vivax* com utilização de primers específicos, exames laboratoriais para acompanhamento do quadro clínico dos pacientes e autópsias nos casos de óbito.

O objetivo do estudo é "descrever o espectro clínico de malária vivax em pacientes internados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, Brasil", tendo como objetivos secundários: estimar a frequência de hospitalizações devido à malária por *P. vivax* na FMT – AM; descrever as apresentações clínicas dos pacientes com infecção por *P. vivax* que precisam de UTI e evoluem para a morte; verificar a frequência de pacientes com monoinfecção confirmada para *P. vivax* que preenchem os critérios da OMS para malária grave; descrever causas incomuns de internação em pacientes com malária vivax; descrever outras doenças infecciosas agudas concomitantes que podem alterar a apresentação clínica benigna da malária vivax; avaliar os fatores de risco de hospitalização em pacientes com infecção pelo *P. vivax* exclusivo; e descrever a patologia associada com infecção letal por *P. vivax* através de autópsias.

Trata-se de estudo epidemiológico, multicêntrico, prospectivo descritivo, desenvolvido em dois centros de referência para atendimento e tratamento de malária: um no Brasil e outro na Índia.

1/3 JF

Cont. Parecer CONEP nº 343/09

No Brasil, os pacientes serão recrutados dentre os assistidos no ambulatório/emergência da Faculdade de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/AM. Participarão do estudo pacientes que necessitarem de internação e que cumprirem os critérios da OMS para malária grave. Os critérios de inclusão e de exclusão estão bem claros no protocolo, na folha 12 verso.

Os pacientes do estudo serão admitidos no hospital e avaliados diariamente por um médico até a alta. Será utilizado um questionário padronizado para anotações de sinais, sintomas, evolução clínica, resultados de exames complementares, tratamento e resultado para cada paciente. O manejo clínico e tratamento serão realizados de acordo com os protocolos nacionais. Aqueles que apresentarem malária vivax grave serão tratados segundo protocolo de tratamento para infecção grave por *P. falciparum*.

No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (folha 22 do protocolo) se lê: "Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as parasitas de malária na amostras de sangue coletadas e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir armazenamento mais prolongado de seu sangue em laboratórios da FMT-AM. Para isso seu sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome." Ainda, na folha 44 do protocolo, consta um termo de compromisso do patrocinador de não utilização de materiais e dados para outros estudos e de não efetuar armazenamento de material biológico. Já na folha 52, consta termo de compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e na folhas 51 e 53 constam diretrizes normativas do banco de materiais biológicos da FMT-AM e formulário para armazenamento de material biológico, respectivamente.

Local de realização

A pesquisa será realizada nos centros de referência em tratamento de malária Fundação de Medicina Tropical em Manaus-AM – Brasil e Faculdade de Medicina Sardar Patel em Bikaner - Índia, com patrocínio do Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona

Apresentação do protocolo

O *currículo vitae* do pesquisador responsável o qualifica para a realização deste estudo.

O orçamento financeiro foi apresentado de forma detalhada.

O cronograma de realização da pesquisa prevê sua conclusão em 3 anos.

Foi apresentado contrato com patrocinador onde fica estabelecido o compartilhamento dos dados e resultados da pesquisa entre os pesquisadores e patrocinador.

O TCLE apresenta-se conciso e objetivo, formulado em linguagem apropriada ao público e objetivo a que se destina. Os procedimentos estão bem claros, riscos e desconfortos a que o paciente possa estar submetido, garantias de acordo com a Resolução CNS 196/96.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº.074/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Durante a leitura do protocolo não fica clara a criação de banco de materiais biológicos a partir deste estudo, uma vez que na folha de rosto consta a não criação de banco. No projeto de pesquisa não há qualquer citação sobre coleta de material biológico para armazenamento ou criação de banco de materiais biológicos, no entanto, os documentos: TCLE, Portaria da FMT-AM com diretrizes para banco de material biológico, Termo de Compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e formulário para armazenamento de material biológico apresentam fortes indícios de formação de banco. Solicita-se esclarecimento sobre o armazenamento de material biológico e, caso esteja prevista esta atividade, que todos os documentos

Cont. Parecer: CONEP nº 343/08

sejam apresentados de forma coerente, inclusive adequando-se às exigências previstas na Resolução CNS 347/2005.

RESPOSTA: o pesquisador esclarece que haverá formação de banco de materiais biológicos e inclui este dado no corpo do projeto. Foram apresentadas as normas de funcionamento do Banco de Matérias Biológicas, formulários para armazenamento de material, justificativa para formação de banco a partir do estudo em tela. Não foi apresentado o acordo entre as instituições brasileira e estrangeira para uso destes materiais armazenados, porém, segundo informações constantes no protocolo, o banco será brasileiro e armazenado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, considera-se a pendência atendida.

2. No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE não consta campo para assinatura do pesquisador responsável, somente do entrevistador. Solicita-se a inclusão deste campo.

RESPOSTA: foi incluído o campo para aposição de assinaturas, porém o mesmo ficou fora do corpo de texto, incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do sujeito bem como do pesquisador. Pendência atendida parcialmente.

3. Solicita-se acrescentar, no TCLE, os contatos do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP que irá acompanhar a pesquisa (telefone e endereço).

RESPOSTA: foram incluídos os dados solicitados no TCLE. Pendência atendida.

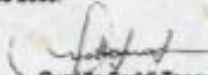
4. A Folha de Rosto encontra-se preenchida e assinada, deixando, porém, dúvida sobre a formação de banco de material biológico. Tendo em vista que é solicitada autorização do sujeito de pesquisa para armazenamento de material biológico (no TCLE), presume-se que esse campo, na Folha de Rosto, está incorretamente assinado, pois indica a "não" formação de banco. Solicita-se adequação do documento.

RESPOSTA: a folha de rosto foi alterada incluindo a informação de formação de banco de materiais biológicos. Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposta, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 2 acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 04 de junho de 2009.


Gyselle Sadi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

*As coordenador
do projeto para
atender o cumprimento
da questão 2.*

Em 17/06/09

Luiz Carlos de Lima Figueira
Coordenador Técnico Nacional
CONEP/CNS/MS

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Direto. de Pesquisa / Comitê de Ética em Pesquisa

PROTOCOLO
Data: 16/06/09 Hora: 14h42

Resp: 

Anexo. Protocolo de extração retirado do Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

Volume de amostra sanguínea: 300µL

Obs: Antes de dar início ao procedimento homogeneizar o tubo com sangue até o mesmo ficar completamente homogeneizado.

Procedimentos:

1. Adicione 900µL de solução Cell Lysis. Inverta o tubo 5 a 6 vezes para misturar o sangue e a solução de lise.
2. Incube por 10 minutos à temperatura ambiente, homogeneizando por inversão duas a três vezes.
3. Centrifugue entre 13.000 e 16.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Descarte o sobrenadante.
5. Agite o tubo vigorosamente no vortex. Ressuspenda completamente as células brancas.
6. Adicione 300 µL de solução Nuclei Lysis. Pipete a mistura 5-6 vezes para lisar as células brancas.
7. OPCIONAL: Adicione 1,5 µL de solução RNAase ao lisado nuclear e misture as amostras invertendo o tubo 2-5 vezes. Incube a mistura a 37°C por 15 minutos e esfrie a temperatura ambiente.
8. Adicione 100µL de solução Protein Precipitation ao lisado nuclear e homogeneíze vigorosamente no vortex de 10-20 segundos.
9. Centrifugue o tubo entre 13.000-16.000 x g por três minutos à temperatura ambiente.
10. Transfira o sobrenadante para um tubo limpo de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Gentilmente misture a solução por inversão até que as brancas cadeias de DNA formem uma cadeia visível.
12. Centrifugue entre 13.000-16.000 x g por um minuto à temperatura ambiente.
13. Decante o sobrenadante e adicione uma amostra de um volume de etanol a 70% à temperatura ambiente. Gentilmente inverta o tubo algumas vezes para lavar o precipitado de DNA e os lados do microtubo.
14. Centrifugue como na etapa 11.
15. Cuidadosamente aspire o etanol. Inverta o tubo em um papel absorvente limpo e seque ao ar o precipitado por 10 a 15 minutos.
16. Adicione 100µL da solução DNA rehydration ao tubo e reidrate o DNA incubando à 65°C por uma hora. Periodicamente homogeneíze gentilmente a solução.

Alternativamente reidrate o DNA incubando a solução overnight à temperatura ambiente.

17. Armazene o DNA entre 2-8°C.

Anexo. Gel de agarose para análise dos produtos da PCR

Preparação do gel de Agarose 1%

1. Em um Erlemeyer pesar 1g de Agarose.
2. Completar com TEB 1x para 100 mL ,
3. Tampar o Erlemeyer com plástico fazendo pequenos furos no mesmo.
4. Levar o material ao forno de microondas por aproximadamente 2 minutos até ficar com aspecto transparente.
5. Acrescentar o Brometo de Etídio no Erlemeyer (40 µL para 100 mL).
6. Preparar o suporte de polimerização colocando o pente com a quantidade desejada de poços.
7. Esperar esfriar o Erlemeyer e despejar a agarose a 1,5% no suporte de polimerização.
8. Aguardar a formação do gel (solidificação) e retirar o pente.
9. Colocar o suporte de polimerização com o gel na cuba de eletroforese.
10. Adicionar na cuba tampão TEB 1X até cobrir a superfície do gel.

Aplicação das amostras no gel de Agarose

1. Homogeneizar em um suporte 10µl da amostra de DNA (produto da PCR) com 10µl de azul de bromofenol.
2. Aplicar as amostras de DNA (20 µl) nos poços do gel.
3. Reservar um poço para aplicação de um marcador de corrida (100pb).
4. Ajustar a voltagem para 80 volts por 1 hora.
7. Analisar o gel sob radiação ultravioleta.
8. Tirar foto do gel para posterior análise dos resultados obtidos.

Obs: As corridas em gel de agarose são para observar se houve amplificação durante o PCR, assim como verificar a qualidade do DNA amplificado, ou seja, se o mesmo está em boa quantidade (Bandas fortes), se não há rastro (não está degradado).

