



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



**Monografia**

**Associação entre mutações no gene da enzima *superóxido dismutase 1* e a malária por *Plasmodium vivax***

**Edson Fonseca Diniz Filho**

Salvador (Bahia)  
Dezembro, 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA****UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira**

Diniz Filho, Edson Fonseca

D585 Associação entre mutações no gene da enzima *superóxido dismutase 1* e a malária por *plasmodium vivax* / Edson Fonseca Diniz Filho. Salvador: EF, Diniz Filho, 2014.  
VIII; 31 fls.: il. [tab. graf.].

Professor Orientador: Manoel Barral Netto.

Monografia como exigência parcial e obrigatória para Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

1. Malária *vivax*. 2. *Cu-Zn superóxido dismutase*. 3. Mutação genética. I. Barral Netto, Manoel. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU: 616.936



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## Monografia

# **Associação entre mutações no gene da enzima *superóxido dismutase 1* e a malária por *Plasmodium vivax***

**Edson Fonseca Diniz Filho**

Professor orientador: **Manoel Barral Netto**  
Orientador Tutor: **Vitor Rosa Ramos de Mendonça**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MEDB60, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia),  
Dezembro 2014

**Monografia:** *Associação entre mutações no gene da enzima superóxido dismutase 1 e a malária por Plasmodium vivax*, de **Edson Fonseca Diniz Filho**.

Professor orientador: **Manoel Barral Netto**  
Orientador tutor: **Vitor Rosa Ramos de Mendonça**

**COMISSÃO REVISORA.**

- **Manoel Barral Netto** (Presidente, Professor orientador), Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira**, Professora do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Angelina Xavier Acosta**, Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da /Universidade Federal da Bahia.
- **Lílian Silva Medina**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VIII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

*“Emancipate yourselves from mental slavery.  
None but ourselves can free our mind.”  
Robert Nesta Marley*

*Aos meus pais, Edson Fonseca Diniz e Julia Maria Barreto Diniz, por toda dedicação e carinho destinados a minha formação.*

## **EQUIPE**

- Edson Fonseca Diniz Filho, Estudante de medicina pela FMB-UFBA, edsonfdf@outlook.com,
- Manoel Barral Netto, Professor Orientador, Professor titular da FMB-UFBA, mbarral@bahia.fiocruz.br
- Vitor Rosa Ramos de Mendonça, Orientador tutor, Estudante do Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação Patologia Humana e Patologia Experimental UFBA, vitorrosaramos@hotmail.com
- Bruno Bezerril Andrade, Doutor em Patologia Humana e Patologia Experimental da FMB-UFBA, brunobezerril@gmail.com
- Lígia Correia Lima, Estudante de medicina pela FMB-UFBA, ligiacorreialima@gmail.com,
- Robson Logrado Cedro Filho, Estudante de medicina pela FMB-UFBA, robsonlogrado@gmail.com
- Antônio Ricardo Khouri Cunha, Doutor em Patologia Humana e Patologia Experimental UFBA, Ricardo\_khouri@hotmail.com
- Arthur Trancoso Lopo de Queiroz, Doutor em Bioinformática pelo Programa Interunidades em Bioinformática da USP, arturlopo@gmail.com

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

### **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
- Laboratório de Imunorregulação e Microbiologia

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Centro Nacional de Pesquisas Gonçalo Moniz
2. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);

## AGRADECIMENTOS

◆ Ao meu Professor orientador, Doutor Manoel Barral Netto, pelos grandes ensinamentos que o convívio me proporcionou e a perceber que a grandiosidade da docência se encontra na humildade e preocupação com os detalhes.

◆ Ao Doutorando Vitor Rosa Ramos de Mendonça, meu Orientador Tutor pelo exemplo de trabalho e dedicação que devemos ter na elaboração de um projeto científico.

◆ Ao Doutor Bruno Bezerril Andrade, por transmitir sua visão crítica sobre os estudos científicos e os objetivos que todo pesquisador deve ter em mente.

◆ Aos Doutores Antônio Ricardo Khouri Cunha e Artur Trancoso Lopo de Queiroz, pela constante disponibilidade e didática ao repassar o conhecimento.

◆ À colega Lígia Correia Lima, pelos ensinamentos práticos da rotina do laboratório e pelo coleguismo durante os experimentos.

◆ Aos meus colegas do Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulação, pelo constante apoio e companheirismo.



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICES DE QUADROS E FIGURAS</b>	<b>2</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
III.1. A Malária na atualidade	5
III.2 A fisiopatologia da malária	5
III.2.1 <i>O ciclo do parasita do gênero Plasmodium sp.</i>	5
III.2.2 A via do heme na malária vivax	6
III.3 A superóxido dismutase 1	7
III.3.1. Características bioquímicas	7
III.3.2. Correlação com a malária vivax	7
III.3.3. Polimorfismos genéticos da <i>superóxido dismutase 1</i> e a esclerose lateral amiotrófica familiar	7
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>9</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>23</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>24</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS</b>	<b>25</b>
<b>X. ANEXO</b>	<b>31</b>
• ANEXO I : Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa	31

## ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS

### TABELAS

<b>TABELA 1</b> Sequência de oligonucleotídeos sintéticos	<b>11</b>
<b>TABELA 2</b> Variáveis epidemiológicas relacionadas com os grupos clínicos de malária <i>vivax</i>	<b>13</b>
<b>TABELA 3</b> Marcadores de disfunção orgânica relacionados com os grupos clínicos de malária <i>vivax</i>	<b>14</b>
<b>TABELA 4</b> SNPs em relação aos grupos clínicos de malária <i>vivax</i>	<b>18</b>
<b>TABELA 5</b> Alteração na estrutura proteica em relação aos grupos clínicos de malária <i>vivax</i>	<b>18</b>

### GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b> Níveis de SOD1 x Forma clínica da malária <i>vivax</i>	<b>15</b>
<b>GRÁFICO 2</b> Níveis de TNF-alfa x Forma clínica da malária <i>vivax</i>	<b>15</b>
<b>GRÁFICO 3</b> Níveis de IL6 x Forma clínica da malária <i>vivax</i>	<b>16</b>
<b>GRÁFICO 4</b> Níveis de IL12p70 x Forma clínica da malária <i>vivax</i>	<b>16</b>
<b>GRÁFICO 5</b> Níveis de IFN- $\gamma$ x Forma clínica da malária <i>vivax</i>	<b>17</b>
<b>GRÁFICO 6</b> Níveis de IL10 x Forma clínica da malária <i>vivax</i>	<b>17</b>

## I. Resumo

**Introdução:** A malária ainda hoje representa a doença parasitária mais incidente em todo mundo, 3.4 bilhões de indivíduos estão dentro da área de risco de contrair a doença. A fisiopatologia da malária *vivax*, permanece com muitos pontos a serem esclarecidos, como é o caso da enzima superóxido dismutase 1 (SOD1), que apresentou maior especificidade e sensibilidade para diagnosticar malária por *P. vivax*, em comparação com o TNF. **Objetivo:** Avaliar as mutações na *SOD1* em pacientes com malária *vivax* e correlacionar com as formas clínicas da infecção. **Metodologia:** Estudo de corte transversal com amostra composta por 56 indivíduos, sendo 28 sintomáticos, 17 assintomáticos e 11 indivíduos controle saudáveis da região amazônica brasileira. A análise dos cinco éxons do gene da *superóxido dismutase 1* foi realizada através de PCR sequenciamento. A investigação de posições significantes na manifestação dos sintomas foi feita através de mineração de dados pelo software WEKA versão 11.0. **Resultado:** Níveis de SOD1, TNF e IL6 apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos sintomáticos e assintomáticos. Níveis de IL10 apresentaram diferenças significativas estatisticamente entre os grupos assintomáticos e sintomáticos e assintomáticos e controles. Mutações na *SOD1* significantes foram encontradas nos éxons 3 e 5. A substituição de uma guanina por uma citosina na posição 02 do éxon 3 mostrou alta sensibilidade e especificidade para discriminar pacientes sintomáticos e assintomáticos. Assim como mutações nos aminoácidos da cadeia proteica da SOD1, nas posições 06 G>V, 08 H>T, 09 F>L, apresentando alta especificidade para discriminar os grupos clínicos de malária *vivax* entre assintomáticos e sintomáticos. **Discussão:** A resposta inflamatória da malária é complexa e depende de vários fatores. O componente genético da *SOD1* mostrou importância na forma clínica sintomática da malária *vivax*. Estudos devem ser conduzidos a fim de confirmar esses achados e avaliar se as mutações correspondem na prática alterações na forma e na função da enzima SOD1 **Conclusão:** Foram encontradas mutações no gene da *SOD1* e mutações de aminoácidos na enzima SOD1 associadas com as formas sintomáticas da malária *vivax*.

**Palavras Chaves:** Malária *vivax*, Cu-Zn Superóxido dismutase, Mutação genética

## II. Objetivos

### Principal

Analisar as mutações no gene da enzima SOD1 em pacientes com malária por *P. vivax* nas formas sintomática, assintomática e controles não infectados da região Amazônica Brasileira.

### Secundários

Correlacionar as mutações na *SOD1* com os níveis plasmáticos da SOD1 e outros marcadores inflamatórios (TNF, IL6, INF-gama, IL10, IL12p70)

Correlacionar as mutações de *SOD1* com os marcadores de disfunção orgânica, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina total, bilirrubina indireta e proteína C reativa(PCR).

### III. Fundamentação Teórica

#### III.1 - A malária na Atualidade

A malária ainda hoje representa a doença parasitária mais incidente em todo mundo, com taxa de mortalidade em torno de 627 mil pessoas por ano, 207 milhões de casos por ano e 3.4 bilhões de indivíduos sob risco de contrair esta doença (1). Existem cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium sp.* que causam malária no mundo: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. No entanto, são as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* que são responsáveis pelo maior número de infecções por malária (2). No Brasil até os anos 80 a incidência de infecção pelo *P. falciparum* era superior à infecção por *P. vivax*, que a partir de então, passou a causar os maiores números de infecção, chegando a representar 90% dos casos de malária(1).

A associação entre mortalidade e malária é mais estudada na infecção pelo *P. falciparum*, que é responsável pela maioria dos casos de malária grave (3,4). No entanto, diversos estudos revelam a inadequação do termo benigno para a forma *vivax* da malária (5–9), pois esta tem sido associada com diversas complicações graves da doença, como anemia grave e insuficiência respiratória(10–18).

#### III.2 - A fisiopatologia da malária

##### III.2.1 O ciclo de vida do parasita do gênero *Plasmodium sp.*

O ciclo da malária consiste na inoculação do parasita do gênero *Plasmodium sp.* na forma de esporozoítos na corrente sanguínea do paciente, apresentando inicialmente uma fase hepática com maturação da forma evolutiva do parasita e liberação de merozoítos na circulação sanguínea, quando se inicia a fase eritrocitária e sintomática da doença (7,19–21). Os merozoítos infectam as hemácias e, após múltiplas divisões, rompem-nas com liberação de esquizontes e gametócitos novamente para o sangue; desta forma, novas hemácias são reinfectadas e o ciclo da malária finaliza com o hospedeiro invertebrado ingerindo os gametócitos que estão na corrente sanguínea do paciente no momento do respasto sanguíneo.(7,19–22).

O conhecimento científico atual mantém foco na malária por *P. falciparum* por causa da mortalidade e morbidade comparado com outras formas clínicas de malária causada por outras espécies como *P. vivax*(3,23). O desequilíbrio a cerca da patologia da malária *vivax* é considerado por alguns autores como uma negligência dos pesquisadores. (5,6,24). Este descaso pode ser exemplificado no montante aplicado em pesquisas relacionadas a doença visto que, no período de 2006-2009, os investimentos em malária *vivax* representaram apenas 3,1% de todo capital utilizado em pesquisa sobre malária no mundo (25). Apesar do baixo investimento no conhecimento da

patologia, as populações em risco sofrem infecções recorrentes de malária *vivax*(26). Por causa disso, a qualidade de vida desses habitantes é reduzida, inclusive, prejudicando o aprendizado de crianças em período escolar, na Amazônia Brasileira e no Sri Lanka(14,26,27).

### III.2.2 - A via do Heme

O *P. vivax* possui peculiaridades no seu ciclo evolutivo que dificultam o tratamento e o controle da doença, como por exemplo, a forma hepática quiescente hipnozoíto que aumenta a incidência de recidivas do parasita (28,29). O *P. vivax* infecta principalmente as formas jovens das hemácias, os reticulócitos, com destruição celular e liberação de gametócitos na corrente sanguínea, concomitantemente com a liberação de hemoglobina (7,19,22). A hemoglobina no sangue será oxidada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) em metahemoglobina com liberação do heme livre em grandes concentrações plasmáticas (30). Em altos valores plasmáticos, o heme livre é extremamente danoso para o ser humano visto que: possui efeito tóxico no endotélio, expondo a matrix extracelular e favorecendo a formação de microtrombos na circulação do hospedeiro; estimula uma resposta inflamatória exacerbada, com recrutamento de neutrófilos que irão iniciar a resposta imune estimulando a produção de ROS(31,32). Desta maneira, constrói-se um ciclo vicioso pois quanto mais heme livre, mais inflamação e conseqüentemente, mais ROS, que irão reagir com a hemoglobina, liberando assim mais heme livre na circulação sanguínea(30,31).

O hospedeiro possui proteínas carreadoras e enzimas para controlar os efeitos tóxicos produzidos pelo heme livre. A associação com proteínas plasmáticas é fundamental para posterior metabolização e inativação do heme livre (33,34). A haptoglobina(Hp), proteína tetramétrica plasmática, se liga ao heme livre conduzindo o complexo Heme livre/Hp para o receptor CD163 dos macrófagos e monócitos presentes na polpa vermelha do baço (35). Os macrófagos então inativam o heme livre através da Heme Oxigenase 1, convertendo o heme livre em biliverdina e monóxido de carbono(CO)(34,36). Entretanto com o grande rompimento de hemácias no ciclo da malária, os mecanismos naturais homeostáticos não são suficientes para impedir que o heme livre haja no endotélio vascular, expondo a matriz trombótica, e ativando os polimorfos nucleares, que consiste no ciclo da malária a ROS mais atuante na oxidação do heme livre (31,32). A produção de radical superóxido está associada com o combate e extermínio do parasita ao nível celular, entretanto a elevada produção de superóxido leva a formação de metehemoglobina e heme livre em excesso (32).

### III.3 - A Superóxido Dismutase

#### III.3.1 - Características bioquímicas

A SOD contribui na resposta imune convertendo o radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que será convertido pela catalase e pela glutationala peroxidase em água e oxigênio (37). Esta enzima possui três isoformas: a SOD1, citoplasmática, também chamada de Cu/Zn SOD; a SOD2, mitocondrial, conhecida como Mn SOD; e a SOD extra celular (SOD EC)(36,38,39).

As mutações na SOD1 podem levar a hiperfunção e ,consequentemente, mudança do efeito protetor da enzima, passando a apresentar efeito nocivo à célula. Os elevados níveis de peróxido de hidrogênio, resultados da hiperatividade da SOD1, aumentará a quantidade do radical hídroxila (-OH) intracelular.(40). Por ser altamente reativa, o radical hidroxila compromete toda a estrutura proteica e da membrana lipoproteica por reação de oxidação intracelular e posterior desnaturação da estrutura.

#### III.3.2 - Correlação com a gravidade da malária vivax

*Andrade et al* (2010) identificaram a enzima SOD-1 como biomarcador para distinguir pacientes com malária *vivax* grave daqueles com infecção moderada na Amazônia brasileira, sendo melhor em sensibilidade e especificidade que o TNF-alfa, marcador rotineiramente utilizado para avaliar a resposta imune-inflamatória na malária (41). Além disso, foi descrito que o heme livre exerce atividade inibitória na produção das citocinas anti-inflamatórias IL10 e TGF-Beta através da SOD1 e da ligação do heme livre ao ao CD14 (42–44).

#### III.3.3 - Polimorfismos genéticos da superóxido dismutase

As mutações na *SOD1* apresentam participação fundamental na patogênese na esclerose lateral amiotrófica familiar (ELAf); já que polimorfismo em único nucleotídeo (SNPs do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*) estão associadas com a manifestação dos sintomas desta doença (45,46). O papel da SOD1 na fisiopatologia da ELAf ainda não é totalmente claro, no entanto, acredita-se que as mutações pontuais da *SOD1* aumentam as funções tóxicas da enzima, principalmente a atividade catalítica devido a liberação do íon Cobre catalítico. (47). Entretanto, os mecanismos o papel da SOD1 na patogênese da ELAf não está totalmente esclarecido,por isso, é necessário de mais estudos para elucidar os mecanismos patológicos da SOD1.(47).

Portanto, visto que SNPS na *SOD1* já terem sido associados com a ELAf, é válido investigar se mutações desta enzima também estão relacionadas com outras doenças que já demonstraram que a SOD1 pode ter um efeito importante em sua fisiopatologia, como a malária *vivax*. Pretende-se,

então, neste trabalho avaliar se as mutações na *SOD1* encontradas em pacientes com malária *vivax* estão associadas com a gravidade dos sintomas, em uma tentativa de compreender qual a função da *SOD1* na patogênese da malária.



## I. Metodologia

### *Estudo populacional e participantes*

O estudo realizado foi um corte transversal com amostras obtidas de indivíduos residentes em Buritis (10°12'43''S, 63°49'44''W) e Demarcação (8°10'04,12''S, 62°46'52.33''O), Rondônia, Brasil, entre junho de 2006 a agosto de 2007. A detecção ativa da malária foi feita nos indivíduos que solicitaram atenção domiciliar à Fundação Brasileira Nacional de Saúde (FUNASA). Pacientes admitidos no Hospital Municipal de Buritis com sintomas moderados a graves também foram convidados a fazerem parte do estudo. Todos os indivíduos, diagnosticado ou não com malária, de quinze a setenta anos, de ambos os sexos, e que vivem na região por mais de seis meses foram convidados a participar do estudo. O diagnóstico da malária *vivax* foi feita de duas formas: a primeira com o exame da gota espessa, usando microscopia de campo e parasitemia (parasitas/microL) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizado em todas as amostras para confirmar o diagnóstico. Os critérios de exclusão foram: hepatites virais A, B, C e D, alcoolismo crônico, Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV), febre amarela, leptospirose, câncer, doenças degenerativas, traço falcêmico e uso de drogas hepatotóxicas e imunossupressoras. Dois indivíduos com infecção por *P. malariae* foram retirados do estudo.

Depois de confirmado o diagnóstico, os indivíduos infectados por *P. vivax* foram acompanhados por 30 dias. Aqueles que não apresentavam nenhum sintoma foram considerados assintomáticos, e os que apresentavam sintomatologia da doença eram considerados sintomáticos. O grupo amostral utilizado foi de 56 pacientes no total, sendo 28 pacientes sintomáticos, 17 pacientes assintomáticos e 11 pacientes controles. A coleta de sangue foi realizada antes do tratamento, no momento do diagnóstico. Todos os casos foram tratados conforme os protocolos da FUNASA.

### *Confirmação Ética*

O consentimento escrito foi obtido de todos os participantes e toda a investigação clínica ocorreu seguindo a declaração de Helsinki. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina São Lucas, Rondônia, Brasil, sob o número de licença 55/07. O parecer de aprovação do projeto pelo CEP está em anexo (ANEXO I).

### *Diagnóstico de Malária por PCR*

O diagnóstico de malária *vivax* foi confirmado utilizando PCR. 5ml de sangue em um tubo a vácuo contendo EDTA e a extração de DNA feita seguindo o modelo fenol-clorofórmio, seguido da precipitação de acetato de sódio e etanol. A primeira amplificação de DNA foi feita com *primers* gene específicos PLU5 e PLU6. Amostras positivas que rendiam mais que 1,200bp serviam de

padrão para o *nested* PCR. A amplificação do PCR foi realizada com *primers* espécies específicas para 30 ciclos à temperatura de *annealing* de 58°C para *P. Falciparum* (Fal e Fal2), de 65°C para *P. vivax* (Viv e Viv2) e *P. malariae* (Mal e Mal2). Os fragmentos obtidos do *P. vivax* eram de 120bp enquanto que o *P. falciparum* e o *P. malariae* eram de 205 e 144bp, respectivamente. Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 2% com coloração por brometo de etídio. Uma amostra controle foi colocada a cada doze amostras a fim de controlar contaminações cruzadas. Todos os testes foram realizados no Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulacao (LIMI) no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/BA).

### *Dosagens plasmáticas*

A quantificação do TNF, IL6, IL8, IL-10, IL4, e IFN-gama, IL12p70, CXCL10 foi realizada por CBA (do inglês *Cytometric Bead Array*), BD *Biosciences Pharmingen*, USA. Todas as amostras foram analisadas em um único ensaio de acordo com o protocolo do fabricante. Curvas padrão foram elaboradas com detecção mínima das citocinas de 3.7 pg/ml. Após acidificação e ativação do TGF-beta, seguido de neutralização, a TGF-beta total foi mensurado a partir do ELISA (conforme as instruções do fabricante).

A SOD1 foi mensurada através do Kit Elisa Cu/Zn Superoxidodismutase, de acordo com o protocolo do fabricante (*Calbiochem*, EMD, *chemicals*, *Darmstad*, Alemanha). Resumidamente, o plasma humano foi diluído em 1:200 em PBS, distribuído e sensibilizado em 96 poços. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente com HRP conjugado com anticorpo contra Cu/Zn SOD. O substrato colorimétrico foi adicionado por dez minutos protegido da luz intensa. A reação foi interrompida e analisada no 450nm.

As dosagens plasmáticas de creatinina plasmática, ALT, AST, bilirrubina total, direta e indireta, Proteína C reativa (PCR) e Creatinina foram realizadas pelos laboratórios clínicos da Universidade de São Lucas e o Laboratório de Patologia Clínica (Salvador).

### *Genotipagem*

As reações de PCR para amplificação dos éxons do gene da SOD-1 foram realizadas conforme técnica padronizada pela equipe do de Microbiologia e Imunorregulação do CPqGM A reação realizada consiste em uma solução de 50 microL para cada 5 microL de DNA da amostra. A solução é composta por 0,4 microL de Taq DNA polimerase, 1,0 microL de nucleotídeo, 0,5 microL de *Primer Forward* e 0,5 microL de *Primer Reverse*, 5 microL de Cloreto de Magnésio e 3 microL de Tampão 10x. Para completar 50 microL era adicionado água Milli-Q®. Os oligonucleotídeos sintéticos (*Primers*) a serem utilizados nas várias reações são descritos na Tabela 1. Para o

sequenciamento do gene da SOD-1 foi utilizado o protocolo realizado pela Plataforma Tecnológica de Sequenciamento de DNA do CPqGM – FIOCRUZ, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 DNA, o Kit BigDye 03 Terminator™ Sequencing Standards (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os oligonucleotídeos listados na Tabela 1.

**Tabela 01 - Sequência dos oligonucleotídeos sintético**

Gene	Primers (5'-->3')	
SOD-1 éxon1	Direto	GGTTTGCGTCGTAGTCTCCTG
	Inverso	CGCTCCTAGCAAAGGTGCGC
SOD-1 éxon2	Direto	CAGCTGTTTTCTTTGTTTCAG
	Inverso	GTTTAGGGGCTACTCTACTG
SOD-1 éxon3	Direto	TGATGCAGGTCAGCACTTTC
	Inverso	GTATACCATATGACCTCCAG
SOD-1 éxon4	Direto	GCTCATGAACTACCTTGATG
	Inverso	AGAAACCGCGACTAACAATC
SOD-1 éxon5	Direto	GTAGTGATTACTTGACAGCCC
	Inverso	AATCTGTTCCACTGAAGCTG

Os reagentes utilizados foram 100 a 200 ng/ml do DNA molde, oligonucleotídeos sintéticos (2,0 pMol), utilizando 2 microlitros/amostra de cada primer separadamente, tampão de sequenciamento, 1,5 microlitros/amostra, Big dye (versão 3,1), 1 microlitro/amostra e água para PCR (DNase, RNase free) 5,5 microlitros, finalizando 10 microlitros de solução. A purificação foi feita com isopropanol 65% e etanol 70%. A desnaturação foi feita utilizando Formamida Hi-DI, 10 microlitro/amostra. Para a termociclagem, realizou-se 1 ciclo de 1 min a 96°C, 35 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50 °C, 4 min a 60 °C e 4°C por tempo infinito. A precipitação da amostra fez-se com a adição de 40 microlitros de isopropanol 65% por poço, selou-se a placa com tampa de silicone e para agita-la suavemente, depois por 15 a 30 minutos a placa ficou incubada a temperatura ambiente, sendo levada para a centrifugação por 45 minutos a 3700 rpm, após esse período. O sobrenadante foi descartado, diminuiu-se o break da centrífuga para 5 e com a placa invertida foi realizado o spin a 200 rpm sobre um papel absorvente. Adicionou-se 200 microlitros de etanol 70% com posterior vedação com tampa de silicone e centrifugação por 20 minutos a 3700 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado, a centrífuga teve seu break reduzido para 5 e fez o spin a 200 rpm com a placa invertida sobre um papel absorvente. A placa foi secada em temperatura ambiente por trinta minutos no escuro. A desnaturação, que é realizada logo antes de colocar a placa no sequenciador, foi realizada com a suspensão em 10 microlitros de formamida, depois desnaturação por 5 minutos no termociclador, choque térmico por dois minutos em gelo ou freezer a -20°C e finalizando com a placa sendo colocada no sequenciador.

### *Análise de dados*

As sequências genéticas foram analisadas através do *Electropherogram Quality Analysis* (Embrapa) e alinhadas com o software Bioedit versão 5.0 a partir da sequência referência de cada éxon para a *Superoxido Dismutase 1*.

As sequências foram submetidas ao algoritmo BLAST do *National Center of Biotechnology Information*, NCBI, (Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para comparação com as sequências genéticas homólogas da *Superóxido dismutase 1* no *Genbank*, (Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Por fim, as sequências foram alinhadas através do programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log Expectation).

### *Mineração de Dados*

Utilizou o programa WEKA volume 11 para realizar a mineração de dados das mutações nas posições encontradas. Os critérios de exclusão para cada posição adotados foram informação perdida em mais de 50% dos pacientes e variância da posição encontrada em menos de 10% dos pacientes.

### *Análise Estatística*

A análise estatística foi realizada utilizando o método do Qui-quadrado ou teste de Fisher para análise de dois grupos com amostras paramétricas, utilizando o valor de significância estatística  $P < 0.05$ . Para análise entre dois grupos de dosagens não paramétricas utilizou-se o teste de Mann –Whitney e para análise de dois ou mais grupos, realizou-se o teste de Oneway-Anova, Kruskal-Wallis com Teste de comparação múltipla de Dunns, para comparar a relação entre os grupos, especificamente.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism ( versão 5.0b) software ( Graphpad software, San Diego, CA, EUA).

#### IV. Resultados

O grupo amostral analisado foi composto de 56 indivíduos, sendo 28 pacientes sintomáticos, 17 pacientes assintomáticos e 11 controles saudáveis. Nos grupos sintomáticos e controle, houve uma proporção equilibrada entre homens e mulheres, com um percentual da população masculina de 47,5% e 45,4% nos grupos respectivamente. No grupo assintomático, observou-se uma maior quantidade de mulheres com percentual de 70,6% do total das amostras de assintomático (Tabela 02). A mediana das idades entre os grupos também não foi estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ), o grupo de assintomáticos apresentou a maior mediana com o valor em anos de 42 e nos grupos de sintomáticos e controles a mediana ficou entre 35 e 37 anos (Tabela 02). O número de episódios de malária prévios se mostrou elevado no grupo de assintomáticos com mediana de 17 e significância estatística ( $P<0,001$ ) tendo o grupo de sintomáticos média de 5. A parasitemia mostrou ser um parâmetro significativo estatisticamente ( $P<0,001$ ) para diferenciar o grupo de sintomáticos e assintomáticos, com mediana do primeiro grupo em torno de 6.852 parasita/microlitro comparado com mediana de 0 parasitas/microlitro no grupo assintomáticos(Tabela 02).

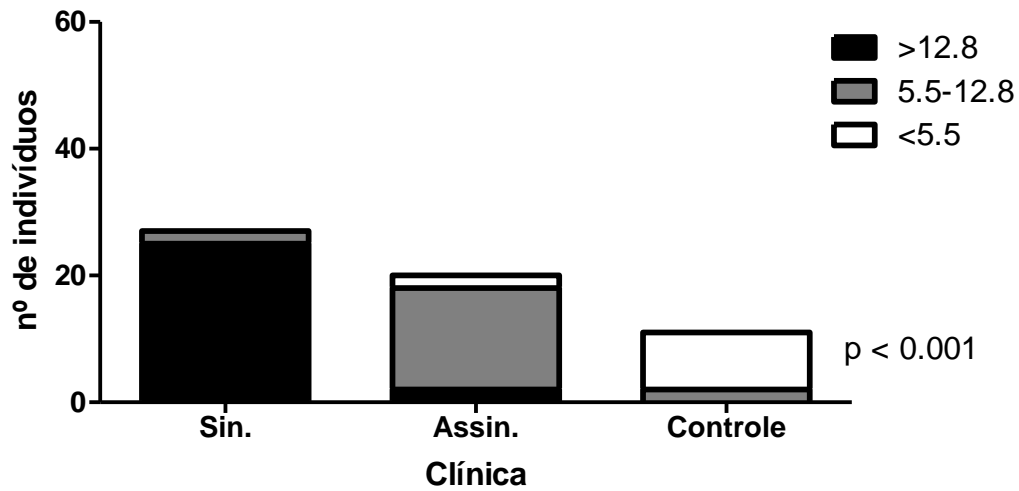
**Tabela 02 – Variáveis epidemiológicas relacionadas com os grupos clínicos de malária vivax**

Variáveis Epidemiológicas	Sintomático	Assintomático	Controle	Valor de P
Homens(%)	47,5	29,4	45,4	0,5030
Idade(Anos)				
Mediana	35	42	37	0,5399
Intervalo Interquartil	28-48	32-47	29-47	
Episódios de Malária				
Mediana	5	17	13	<0.0001
Intervalo Interquartil	1-12	13-21	8-22	
Parasitemia(Parasita/Microlitro)				
Mediana	6852	0	0	<0.0001
Intervalo Interquartil	1493,2-56334,5	0-30,5	0	

As amostras de grupos sintomáticas apresentaram níveis elevados de ALT comparado com os outros dois grupos ( $P<0,001$ ) com mediana de 167,52U/L em comparação com a média do grupo de assintomáticos que foi de 35 (Tabela 03). Os níveis de AST mostraram que os grupos sintomáticos apresentam maiores valores com mediana de 152 U/L contra valores de 45 e 43 das médias dos grupos de assintomáticos e controles ( $P<0,05$ ). As medidas de creatinina se mostraram significativas para distinguir o grupo controle de sintomáticos e assintomáticos ( $P<0,05$ ). Os valores de Proteína C reativa (PCR) mostraram-se maior no grupo de sintomáticos com valor de  $P < 0,05$  para diferenciar entre o grupo de assintomático (Tabela 03). A diferença entre os valores de bilirrubina total não mostrou ser estatisticamente significantes entre os grupos clínicos ( $P>0,05$ ). A

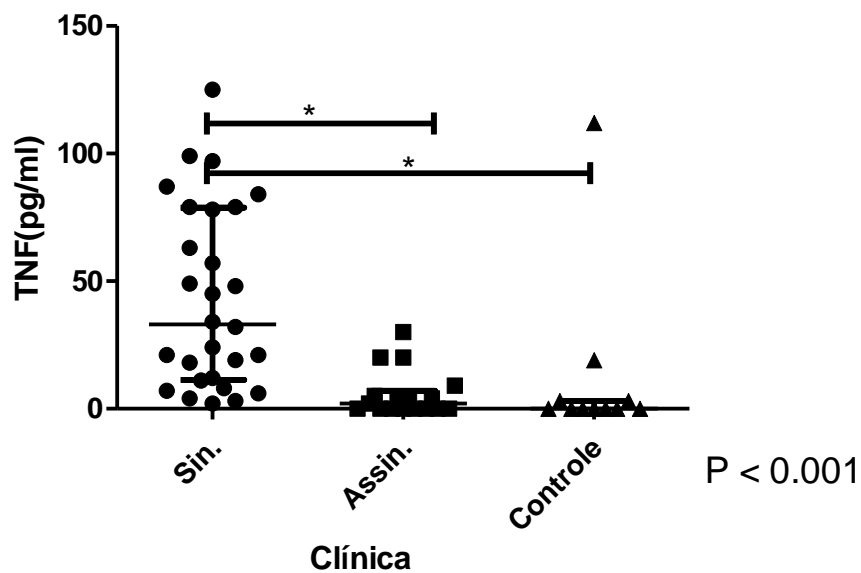


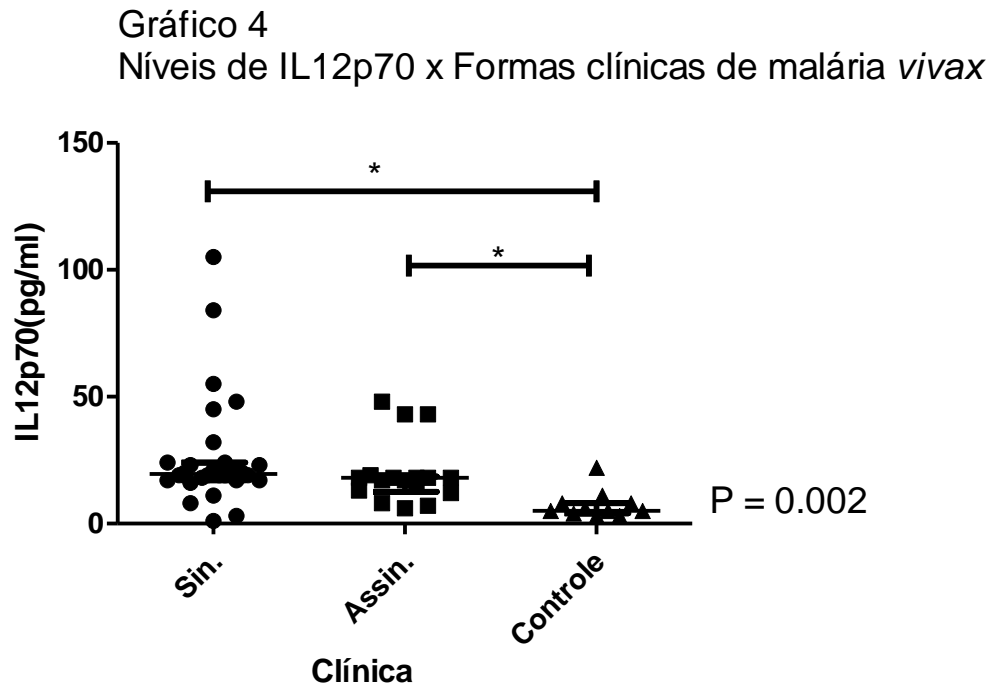
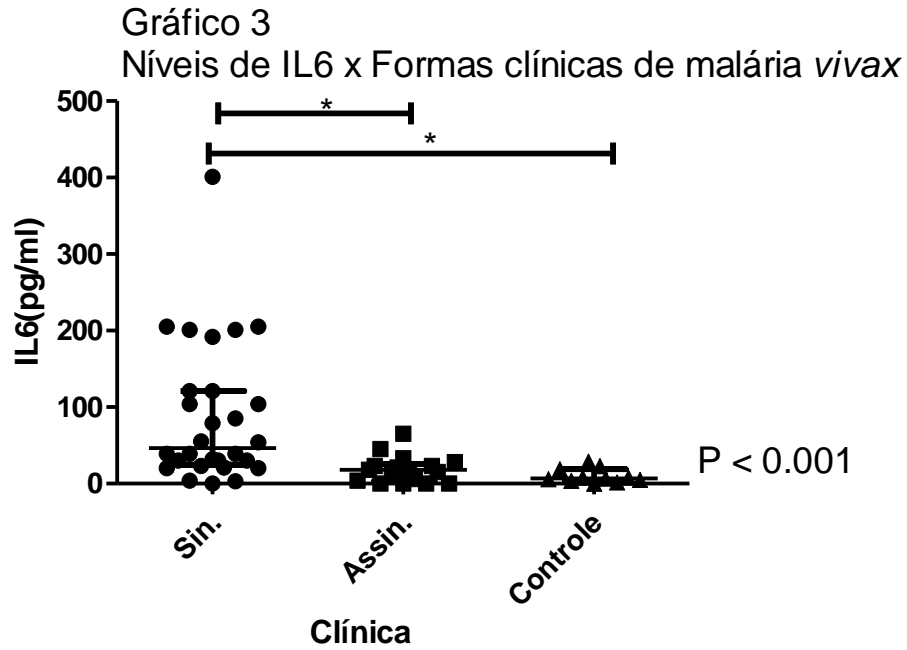
Gráfico 1  
Níveis de SOD1 plasmática x Formas clínicas da malária *vivax*



Os marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e IL6 mostraram um aumento significativo comparando os grupos sintomático e assintomáticos. ( $P < 0.001$ , respectivamente). (Gráfico 2 e Gráfico 3).

Gráfico 2  
Níveis de TNF x Formas clínicas de malária *vivax*





As dosagens de IL12p70 apresentaram diferenças significantes entre os grupos sintomáticos e controles ( $P = 0,002$ ) (Gráfico 4). Os níveis de IFN- $\gamma$  apresentaram média entre os grupos sintomáticos, assintomáticos e controle com pouca variação, não encontrando significância estatística ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 5). A diferença entre os níveis de IL10 teve diferença estatísticas



significante entre os grupos, assintomáticos e sintomáticos e assintomáticos e controles, possuindo elevados níveis no grupo de assintomáticos (Gráfico 6).

Gráfico 5  
Níveis de IFN-gama x Formas clínicas de malária *vivax*

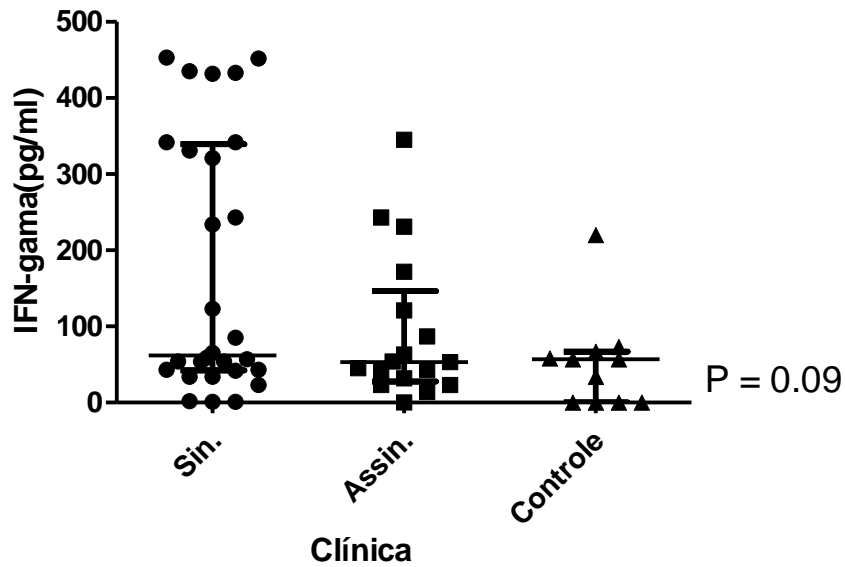
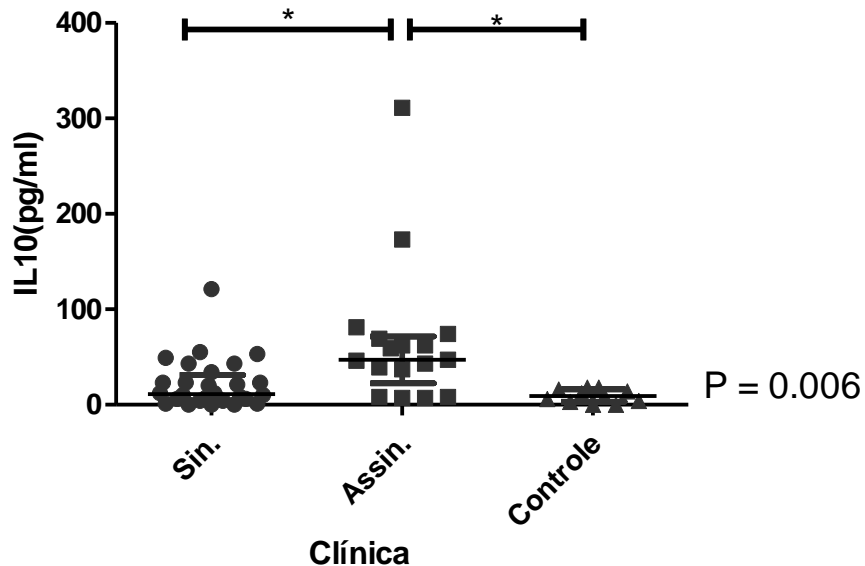


Gráfico 6  
Níveis de IL10 x Formas clínicas de malária *vivax*



Após a análise das sequências genéticas, verificou-se através da mineração de dados que as mutações encontradas nos cinco éxons da *SOD1* foram significativas para diferenciar pacientes sintomáticos de assintomáticos e sintomáticos de controles somente nos éxon 03 e no éxon 05. Os

SNPs encontrados nos outros éxons não foram relevantes por estarem presentes em menos que 10% dos pacientes. No total foram encontrada 33 mutações de nucleotídeos significantes nos éxons 3 e 5. Com o modelo J48 *decision tree* observou-se que o SNP da posição 2 do éxon 3, com modificação de uma base nitrogenada de Guanina por Citosina, está associado com a diferenciação entre os pacientes sintomáticos e assintomáticos ( $P < 0.05$ ) (Tabela 04). Entre os aminoácidos encontrou-se que modificações nas posições 6, com modificação de uma Glicina por uma Valina, na posição 8, com modificação do aminoácido Histidina por uma Treonina e na posição 9 com modificação do aminoácido Fenilalanina por um Leucina, foram significantes estatisticamente ( $P < 0.05$ ), com alta especificidade para diferenciar pacientes sintomáticos de assintomático.(Tabela 05).

**Tabela 04 – SNPs em relação aos grupos clínicos de malária vivax.**

Posição	SNPs	Sensibilidade	Especificidade	Odds Ratio	Intervalo de confiança(95%)	Valor de P
P02_ex3	G>C	0.6154	0.7647	5.200	1,42-18,95	0.0186

**Tabela 05 – Alteração na estrutura proteica em relação aos grupos clínicos de malária vivax**

Posição	Alteração nos Aminoácidos	Sensibilidade	Especificidade	Odds Ratio	Intervalo de confiança (95%)	Valor de P
P06_ex3	G>V	0.7222	0.5789	3.575	1.11-11.48	0.0419
P08_ex3	H>T	0.7105	0.5789	3.375	1.06-10.65	0.0460
P09_ex3	F>L	0.7105	0.5789	3.375	1.069-10.65	0.0460

## VI. Discussão

A malária *vivax* constitui no Brasil uma endemia, com concentração significativa na região norte do país(14,48). Entretanto, viajantes, constantemente, se expõe ao parasita a partir do momento que visitam regiões endêmicas. Quando retornam aos seus locais de origem podem manifestar os sintomas em centros de saúde que não estão preparados para tratar a malária como diagnóstico diferencial, subdiagnosticando a doença(49,50). O tratamento inadequado está associado a uma maior morbimortalidade da malária fora das regiões endêmicas (4,17,20). Além disso, estudar a patogênese da malária *vivax*, elucida informações importantes a cerca da fisiopatologia das doenças hemolíticas e a importância do Heme livre na resposta Imune/Inflamatória do hospedeiro(32,34). A associação dos componentes da via do Heme na patogênese da malária *vivax* já foi realizada por Mendonça et al (2012). Dessa forma a correlação entre as moléculas da via do Heme, como as proteínas que transportam o heme livre para metabolização nos macrófagos, haptoglobina, e os receptores dessas proteínas nos macrófagos, o CD163, foi estabelecida com grupos de sintomáticos na malária *vivax*(34).

Episódios de malária e Parasitemia foram informações epidemiológicas que mostraram significância estatística entre os grupos clínicos. Os assintomáticos mostraram estar associados com o maior número de Episódios de malária. Outros estudos mostraram que tanto na infecção por *P. Falciparum* e por *P. vivax*, a maior quantidade de episódios de infecção pelo plasmodium confere ao hospedeiro maior a probabilidade dele manifestar formas assintomáticas da doença (6,43,51). Manifestação sintomática da doença está intimamente relacionada com a parasitemia da malária, por aumentar a reação inflamatória do hospedeiro, a parasitemia elevada encontrada no grupo sintomático confirma achados prévios, sobre a correlação entre quantidade de parasitas e exacerbação dos sintomas(6,52).

O ciclo de vida do parasita do gênero *Plasmodium* envolve lise dos hepatócitos, logo, espera-se que enzimas intracelulares como AST e ALT estejam aumentados em pacientes sintomáticos(23). Nos pacientes analisados, tanto os marcadores de AST e ALT entre os grupos clínicos, os pacientes sintomáticos apresentaram níveis elevados estatisticamente significantes, comparando com os pacientes assintomáticos e com o grupo de controles saudáveis. A via do heme tem como um dos produtos finais a bilirrubina, que sofre conjugação hepática e depois secreção intestinal (44). Nos pacientes sintomáticos, somente a bilirrubina direta apresentou níveis elevados, em comparação com os demais grupos.

Os marcadores inflamatórios TNF e IL6 apresentaram níveis elevados, com diferenças estatisticamente significantes, nos pacientes sintomáticos em relação aos assintomáticos e o grupo

de controle. Como são citocinas relacionadas com a resposta imune pró-inflamatória do hospedeiro, espera-se que os pacientes com esses marcadores elevados manifestem os sintomas da doença(43,52). Nos pacientes infectados com *P. falciparum*, observa-se padrão semelhante no comportamento das citocinas e na manifestação de sintomas, inclusive, pacientes com manifestações graves da doença (1,21). Entre os pacientes assintomáticos, importante observar que os níveis de IL10 tiveram diferenças significativas entre os indivíduos assintomáticos e sintomáticos e assintomáticos e sintomáticos de forma significativa estatisticamente. A característica moduladora da citocina IL10 pode estar relacionada com a não manifestação de sintomas pelos indivíduos assintomáticos, indicando importância no controle da malária *vivax* (43)

Os níveis de SOD1 acompanham o padrão das citocinas inflamatórias TNF e IL6(47). Portanto, estão aumentados de forma significativa nos pacientes sintomáticos em comparação com os assintomáticos. No entanto, estabelecer se os níveis de SOD1 como causadores dos sintomas dos pacientes com *P. vivax* ainda não é possível com os dados obtidos. Sabe-se que a resposta imune da malária é complexa e multifatorial(43). As moléculas da resposta imune, tanto as inflamatórias e as moduladoras, atuam em rede e com suas interações variando a todo momento, acompanhando a evolução natural da doença(43). Percepção que transcende a busca natural de um fator causal para a respectiva doença e expande a visão para uma rede de fatores interligados e dinâmicos, contribuindo para a infecção. Assim, faz-se necessário, adaptar a concepção de resposta imune em rede para a malária como já foi proposto por Mendonça et al (2013). Pois, dessa forma, diminui-se a probabilidade de restringir a complexidade da malária em uma única molécula e aumenta a compreensão da resposta imune, de uma maneira holística, do hospedeiro ao ser infectado pelo parasita do gênero *Plasmodium* sp.

A via da SOD1 é intimamente relacionada com as enzimas peroxidase e catalase, que degradam o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (36). Entretanto, em doenças hemolíticas, quando o heme induz o aumento dos níveis de SOD1 e a produção de radicais superóxido em excesso podem provocar o acúmulo de peróxido de hidrogênio (47). Supõe-se que, os níveis de catalase e peroxidase não aumentam proporcionalmente aos níveis de SOD1, levando ao desequilíbrio e excesso de peróxido de hidrogênio na célula (47). A atividade oxidativa mais significativa entre os radicais oxidativos é do radical superóxido, já que ele é a molécula mais instável(40,47). no entanto o peróxido de hidrogênio apresenta atividade oxidativa significativa e que se não for neutralizado, apresenta danos intracelulares a membrana lipoproteica e a enzimas destituindo a função de cada molécula(41,53–55). Por isso, investigar os níveis de peroxidase e

catalase em pacientes com malária *vivax* é essencial para compreender qual o papel da SOD1 na manifestação de sintomas pelo paciente infectado.

Os resultados encontrados mostraram que alterações genéticas no gene da *Superoxido Dismutase 1* podem estar associados com a susceptibilidade de pacientes a o *Plasmodium vivax*. Mutações no éxon 3 do gene, na posição 02, com substituição de uma Citosina por uma Guanina e nas mutações na própria enzima, nas posições 06,08,09. A mutação na posição 06 encontrada mostrou a substituição de um aminoácido glicina por uma valina, que apresentam cadeias alifáticas laterais não conjugadas similares e potenciais de ionização (PI) próximos, fatores que podem estar associados com alteração da forma ou da função da enzima(56). Já a posição 08 apresenta o aminoácido histidina, que além de possuir o radical imidazol na sua estrutura, possui características básicas, sendo substituído pelo aminoácido treonina, que não possui o mesmo radical em sua estrutura. Na posição 09 o aminoácido fenilalanina, que contém um radical aromático nas suas cadeias laterais, é substituído pelo aminoácido leucina, que possui cadeia alifática não polarizada nas suas cadeias laterais(56). As modificações nas características de cada aminoácido provavelmente alteram a estrutura da enzima SOD1, que pode comprometer sua função ou não(55,56).

Entretanto, os dados não são suficientes para afirmar que as mutações são causa da sintomatologia da malária *vivax*, eles apontam que o polimorfismo da SOD1 pode estar associado com a repercussão de sintomas clínicas em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Dados similares foram encontrados nas moléculas IL6 e BAT1, indicando que polimorfismos dessas vias também estão associados com a malária *vivax* (57). Estudos tridimensionais da estrutura proteica da enzima com cada mutação analisando se sua função permanece intacta ou se altera a partir do novo aminoácido modificado em sua estrutura é necessário para corroborar ou afastar tais achados.

A Esclerose Lateral Amiotrófica familiar é uma doença do neurônio motor superior degenerativa. Genótipos diferentes da *SOD1* estão associados com a manifestação clínica da doença e a evolução da doença(45,47). A relação que é mais aceita no papel da SOD1 na patogênese da ELAf é com hiperfunção da molécula, aumentando os níveis de peróxido de hidrogênio e comprometendo a dinâmica intracelular dos neurônios, afetando principalmente as mitocôndrias(47). Mutações pontuais na posição 4, com a substituição de uma valina por uma alanina, e na posição 46, com a substituição de uma arginina por uma histidina, estão associadas com expectativa de vida de 1,5 anos e 18 anos, respectivamente, nos pacientes com ELAf(55). A interseção entre a patogênese da ELAf e a malária *vivax* não é bem estabelecida, no entanto observando os mecanismos intracelulares da SOD1 na ELAf é fundamental para investigar como é desenvolvida a patogênese da malária *vivax*.

O estudo é o primeiro a analisar mutações genéticas na SOD1 em pacientes com malária *vivax*. Apesar de ter um número amostral restrito, que impede de relacionar casualmente a SOD1 com a malária, observa-se que há uma relação entre as formas sintomáticas de malária com a presença de mutações na SOD1. No entanto, estudos futuros devem ser realizados para investigar se a manifestação dos sintomas é por causa de mutações que levem a uma hiperfunção da enzima, como ocorre na ELAf (47). Ou por uma inatividade da enzima, tornando a SOD1 incapaz de proteger o indivíduo do radical superóxido(47). Ainda deve ser investigado a repercussão proteica dessas mutações encontradas. A substituição de aminoácidos indica que deve haver alteração na forma e na funcionalidade da enzima devido as diferenças bioquímicas entre os aminoácidos modificados. Por isso, avaliar a estrutura tridimensional proteica dessas mutações é fundamental para correlacionar se essas mutações repercutem na prática fisiopatológica da doença. Por fim, a análise com o software WEKA não permitiu relacionar as mutações com os níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas e com os marcadores de função orgânica, por causa de uma limitação inerente ao modelo adotado, J48 *decision tree*. Entretanto novas metodologias já estão investigadas para correlacionar esses dados.

## VII. Conclusões

1. Foram encontradas mutações genéticas na *SOD1* em pacientes com formas clínicas sintomáticas da malária por *P. vivax*.
2. Foram encontradas mutações proteicas na SOD1 em pacientes com malária por *P. vivax*.
3. Mutação de um único nucleotídeo no gene da SOD1 pode estar associado com a manifestação de sintomas de paciente com malária por *P. vivax*.
4. Alterações de aminoácidos na estrutura proteica da enzima SOD1 podem modificar a função e estrutura da SOD1, contribuindo para a manifestação de sintomas em pacientes com malária por *P. vivax*.

## VIII. Summary

**Background:** Actually, malaria still the most protozoan disease in all the world, with 3.4 billion of people under the risk zone. Malaria's *vivax* physiopathology remains with some unclear pathological mechanisms, which is the paper of Superoxide dismutase 1 (SOD1), that showed more sensibility and specificity, in malaria *vivax*, than TNF. **Objective:** Evaluate if mutations in *SOD1* are associated with symptomatology in patients with malaria *vivax* **Methods:** A cross sectional study was realized with 56 individuals, 28 symptomatic, 17 asymptomatic and 11 health controls, at the amazon Brazilian rain forest. After this, all mutations were data mining with software WEKA version 11.0, with exclusion criteria: missing data more than 50% and mutations present in 10% of patients or less. Cytokines and chemokines were dosed with CBA(Cytometric Bead Array). Organic dysfunction markers were dosed in São Lucas, University **Results:** SOD1, TNF, IL6 levels show differences statistically significant between symptomatic and asymptomatic groups, and symptomatic and controls groups. IL10 levels show differences statistically significant between asymptomatic and symptomatic groups and asymptomatic and controls groups. Mutations in exon 3 and exon 5 were significant, single nucleotide polymorphism (SNPs) were founded at position 2 of exon 3, with a cytosine replacing a guanine. Aminoacids replacements were founded significant in position 6, 8 and 9 of exon 3, with elevated specificity and sensibility to diagnose malaria *vivax* symptomatic. **Discussion:** Malaria inflammatory response is complex and depends from a lot of variables. Genetic component of *SOD1* show relevance in symptomatic malaria *vivax*. More studies must be done to confirm this finds. **Conclusion:** Mutations was founded in *SOD1* gene and was associated with malaria symptomatic. As well as, amino acids mutations in protein structure of SOD1 were associated with symptomatic clinical form of malaria *vivax*

**Key words:** 1. Malaria *vivax*, 2. Cu/Zn superoxide dismutase, 3. Gene mutation.



## IX. Referências

1. Butler D. who malaria report 2013. Nature [Internet]. 2013 Aug 8; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature.2013.13535>
2. Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is Plasmodium malariae in Rondônia, Western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. SBMT; 2000 Oct [cited 2014 Sep 15];33(5):489–92. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822000000500011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000500011&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
3. Vitorino R, De A, Mendonça D, Goreti M. Malária grave por Plasmodium falciparum. 2011;23(3):358–69.
4. Marks M, Gupta-Wright a, Doherty JF, Singer M, Walker D. Managing malaria in the intensive care unit. Br J Anaesth [Internet]. 2014 Jun 19 [cited 2014 Jun 23];1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946778>
5. Galinski MR, Barnwell JW. Plasmodium vivax: who cares? Malar J [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Jun 4];7 Suppl 1:S9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2604873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Europe PMC Funders Group Vivax malaria : neglected and not benign. 2009;77(61):79–87.
7. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. Trends Parasitol [Internet]. 2009 May [cited 2014 May 29];25(5):220–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349210>
8. Bammigatti C, Shetty S, Shetty S, Kumar A. Benign tertian malaria--a misnomer? Trop Doct [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 Jul 2];41(3):168–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676982>
9. Gogia A, Kakar A, Byotra SP. Is benign tertian malaria actually benign? Trop Doct [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Jun 3];42(2):92–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431827>
10. Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. J Infect Dis [Internet]. 2007 Feb 15;195(4):589–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2532499&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Douglas NM, Anstey NM, Buffet P a, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. [Internet]. Malaria journal. 2012. p. 135. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3617122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

12. Lee H-J, Baek J-H, Chae M-H, Joo H, Lee J-S, Chung M-H, et al. A case of vivax malaria complicated by adult respiratory distress syndrome and successful management with extracorporeal membrane oxygenation. *Korean J Parasitol* [Internet]. 2013 Oct;51(5):551–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3857503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Lomar A V, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, de Matos GJ, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2005 Oct;9(5):425–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410895>
14. Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2012 Nov [cited 2014 May 27];42(12):1099–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022617>
15. Mohapatra S, Samantaray JC, Arulselvi S, Ghosh A. Disseminated intravascular coagulation following malaria due to Plasmodium vivax: a thromboelastography-based study. *Malar J* [Internet]. *Malaria Journal*; 2013 Jan [cited 2014 Jun 30];12(1):336. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3849539&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2007 Jul [cited 2014 Jul 2];101(7):655–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433389>
17. Rifakis PM, Hernandez O, Fernández CT, Rodriguez-Morales AJ, Von A, Franco-Paredes C. Atypical Plasmodium vivax malaria in a traveler: bilateral hydronephrosis, severe thrombocytopenia, and hypotension. *J Travel Med* [Internet]. 2008 [cited 2014 Jun 30];15(2):119–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346245>
18. Song JY, Park CW, Jo YM, Kim JY, Kim JH, Yoon HJ, et al. Two cases of Plasmodium vivax Malaria with the clinical picture resembling toxic shock. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007 Oct;77(4):609–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17978057>
19. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax , a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
20. Idro R, Jenkins NE, Newton CRJC. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* [Internet]. 2005 Dec [cited 2014 Sep 11];4(12):827–40. Available from: [http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS1474-4422\(05\)70247-7/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS1474-4422(05)70247-7/fulltext)

21. Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002 Aug [cited 2014 Sep 11];2(8):472–8. Available from: [http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS1473-3099\(02\)00344-4/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS1473-3099(02)00344-4/fulltext)
22. Joshi H, Prajapati SK, Verma A, Kang'a S, Carlton JM. *Plasmodium vivax* in India. *Trends Parasitol* [Internet]. 2008 May [cited 2014 Mar 3];24(5):228–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492208000822>
23. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009 Sep [cited 2014 Jan 23];9(9):555–66. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330990970177X>
24. Guerra C a, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Jun 3];4(8):e774. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2914753&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra C a, et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jun 4];6(9):e1814. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3435256&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
26. Vitor-Silva S, Reyes-Lecca RC, Pinheiro TR a, Lacerda MVG. Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Jun 29];8:230. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2768742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Fernando SD, Gunawardena DM, Bandara MRSS, De Silva D, Carter R, Mendis KN, et al. The impact of repeated malaria attacks on the school performance of children. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2003 Dec;69(6):582–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740872>
28. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gattton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2014 Aug 26];195(7):934–41. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/content/195/7/934.long>
29. Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Aug 10];13(10):900–6. Available from: [http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS1473-3099\(13\)70095-1/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS1473-3099(13)70095-1/fulltext)
30. Elroy-Stein O, Bernstein Y, Groner Y. Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J* [Internet]. 1986 Mar [cited 2014 Sep 11];5(3):615–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1166807&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>


31. Orjih a U. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1997 Jul;282(1):108–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223546>
32. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2008 Oct [cited 2014 Sep 18];86(10):1097–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641963>
33. Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J, et al. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1992 Nov [cited 2014 Aug 21];298(2):438–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000398619290432V>
34. Mendonça V, Luz N. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. *Infect ...* [Internet]. 2012 [cited 2014 Jul 1]; Available from: <http://iai.asm.org/content/80/4/1445.short>
35. Atkinson SH, Mwangi TW, Uyoga SM, Ogada E, Macharia AW, Marsh K, et al. The haptoglobin 2-2 genotype is associated with a reduced incidence of *Plasmodium falciparum* malaria in children on the coast of Kenya. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 Mar 15 [cited 2014 Sep 18];44(6):802–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2659731&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Turkseven S, Kruger A. Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *Am J ...* [Internet]. 2005 [cited 2014 Sep 12];10595:701–7. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/content/289/2/H701.short>
37. Modrick ML, Didion SP, Lynch CM, Dayal S, Lentz SR, Faraci FM. Role of hydrogen peroxide and the impact of glutathione peroxidase-1 in regulation of cerebral vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Sep 12];29(6):1130–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* [Internet]. 1996 Nov [cited 2014 Sep 12];75(5):617–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8941209>
39. Beyer W, Imlay J, Fridovich I. Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* [Internet]. 1991 Jan [cited 2014 Sep 12];40:221–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1851570>
40. Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem* [Internet]. 1978 Jul 10 [cited 2014 Sep 12];253(13):4697–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/207707>
41. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LM a, Barral A, et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS*

- Negl Trop Dis [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Nov 1];4(4):e650. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2850307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010;9:13.
  43. Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in Plasmodium vivax malaria. *Malar J* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jun 6];12:69. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3598348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  44. Andrade BB, Araújo-Santos T, Luz NF, Khouri R, Bozza MT, Camargo LM a, et al. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jul 15 [cited 2013 Nov 1];185(2):1196–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562262>
  45. Siddique T. ALS: Molecular Clues to the Jigsaw Puzzle of Neuronal Degeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 1996 Jan 1 [cited 2014 Sep 11];61(0):699–708. Available from: <http://symposium.cshlp.org/content/61/699>
  46. Shaw CE, Enayat ZE, Chioza BA, Al-Chalabi A, Radunovic A, Powell JF, et al. Mutations in all five exons of SOD-1 may cause ALS. *Ann Neurol* [Internet]. 1998 Mar [cited 2014 Sep 11];43(3):390–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506558>
  47. Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn J a, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, et al. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SO. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2000 Dec [cited 2014 Aug 26];7(6 Pt B):623–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114261>
  48. Oliveira-ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-ribeiro CT. Malaria in Brazil : an overview Review. 2010;1–15.
  49. Brasil P, Costa AP, Longo CL, da Silva S, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT. Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microscopic parasitaemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. *Malar J* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Oct 30];12:402. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3831259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  50. Dos-Santos JCK, Angerami RN, Castiñeiras CMS, Lopes SCP, Albrecht L, Garcia MT, et al. Imported malaria in a non-endemic area: the experience of the university of Campinas hospital in the Brazilian Southeast. *Malar J* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Oct 30];13:280. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4114409&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

51. Biomedicine T. Serum TNF alpha levels : a prognostic marker for. 2013;30(4):645–53.
52. De Mendonça VRR, Goncalves MS, Barral-Netto M. The host genetic diversity in malaria infection. *J Trop Med* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Sep 2];2012:940616. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3532872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Muyderman H, Hutson PG, Matusica D, Rogers M-L, Rush R a. The human G93A-superoxide dismutase-1 mutation, mitochondrial glutathione and apoptotic cell death. *Neurochem Res* [Internet]. 2009 Oct [cited 2014 Sep 19];34(10):1847–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19399611>
54. Radunović a, Leigh PN. Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1996 Dec;61(6):565–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=486646&tool=pmcentrez&renderertype=abstract>
55. Ratovitski T, Corson LB, Strain J, Wong P, Cleveland DW, Culotta VC, et al. Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1999 Aug;8(8):1451–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400992>
56. Lehninger A, MARZZOCO A. 1: Princípios de Bioquímica. 1985 [cited 2014 Nov 11]; Available from: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=2eEjrytx3\\_UC&oi=fnd&pg=PA11&dq=BIOQU%C3%8DMICA&ots=Lc7ltS0Zez&sig=h6rDoPEXGbHucmUGXdhES87jyu8](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=2eEjrytx3_UC&oi=fnd&pg=PA11&dq=BIOQU%C3%8DMICA&ots=Lc7ltS0Zez&sig=h6rDoPEXGbHucmUGXdhES87jyu8)
57. Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhães BM, Lacerda MV, Andrade BB, et al. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with Plasmodium vivax malaria. *Malar J* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Sep 8];13(1):278. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4112608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

**X. Anexo**

ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de São Lucas, com aprovação da investigação

 **Faculdade São Lucas**  
O conhecimento em ação

**Comitê de Ética em Pesquisa**  
Faculdade São Lucas


Carta AP/CEP/55/07

Porto Velho, 06 de Fevereiro de 2007.


Ilmo(a). Sr(a).  
Luís Marcelo Aranha Camargo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade São Lucas aprovou na reunião do dia 25/04/06, o projeto de pesquisa "**Mecanismos de imunorregulação na Malária Assintomática Humana**", e foi o seguinte parecer do relator: "**APROVADO**".

Atenciosamente.

  
Marcelo Custódio Rubira  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade São Lucas

**Marcelo Custódio Rubira**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade São Lucas

*reubr  
2/14/07* 

Rua Alexandre Guimarães, 1927 Areal – CEP: 78916-450 – Porto Velho/RO  
Fone: (61) 3244.8006 / Fax: 3211.8022