



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DA PROTEÍNA
CIRCUNSPOROZOÍTA DO *Plasmodium vivax* COM ACHADOS
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS EM UMA ÁREA
ENDÊMICA DO BRASIL

ANDREA SILVESTRE LOBÃO COSTA

Belém-Pará

2017

ANDREA SILVESTRE LOBÃO COSTA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DA PROTEÍNA
CIRCUNSPOROZOÍTA DO *Plasmodium vivax* COM ACHADOS
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS COM IMUNOLÓGICOS EM UMA
ÁREA ENDÊMICA DO BRASIL**

Dissertação, em formato de artigo, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

Belém-Pará

2017

ANDREA SILVESTRE LOBÃO COSTA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DA PROTEÍNA
CIRCUNSPOROZOÍTA DO *Plasmodium vivax* COM ACHADOS
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS EM UMA ÁREA
ENDÊMICA DO BRASIL**

Dissertação, em formato de artigo, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Banca Examinadora: Prof. Dr. Francisco Acácio Alves
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profª. Dra. Andrea Luciana Soares da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profª. Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues
Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 20 de Fevereiro de 2017

**ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO COMO ARTIGO ORIGINAL À
REVISTA ACTA TROPICA (ISSN: 0001-706X – QUALIS B1)**

**Associação entre os genótipos da proteína circunsporozoíta do
Plasmodium vivax com achados hematológicos, bioquímicos e
imunológicos em uma área endêmica do Brasil**

Andrea Silvestre Lobão-Costa^{a*}, Carlos Rodrigo Souza do Monte^{b*}, Rafele Procópio Oliveira^b, José Eduardo Gomes Arruda^b, Ana Maria Revoredo da Silva Ventura^b, Arnaldo Jorge Martins-Filho^a, Maristela Gomes Cunha^c, Rosana Maria Feio Libonati^d, Gustavo Capatti Cassiano^e, Ricardo Luiz Dantas Machado^{b**}.

^aSeção de Patologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil

^bSeção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil

^cInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

^dNúcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

^eUniversidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

*Contribuíram igualmente

**Endereço para correspondência: Rodovia Br 316, KM07, s/n°. Bairro Levilândia. CEP.: 67.030-000 Ananindeua-PA, Brasil.

Endereços de E-mail: andreacosta@iec.pa.gov.br (A.S. Lobão-Costa), rodrigo.mcalister@hotmail.com (C.R.S. Monte), rafealeoliveira@iec.pa.gov.br (R.P. Oliveira), anaventura@iec.pa.gov.br (A.M.R.S. Ventura), arnaldofilho@iec.pa.gov.br (A.J. Martins-Filho), mgcunha@ufpa.br (M.G. Cunha), rosanalibonati@terra.com.br (R.M.F. Libonati), gcapatti@hotmail.com (G.C. Cassiano), ricardomachado@iec.pa.gov.br (R.L.D. Machado).

Resumo

A diversidade genética da proteína circunsporozoíta (CSP) tem sido por vários anos abordada em estudos de epidemiologia molecular, favorecendo o entendimento acerca da transmissão, dinâmica e relação evolucionária das variantes CSP (VK210, VK247 e *P. vivax-like*). Entretanto, poucos trabalhos correlacionam esse polimorfismo da CSP com a fisiopatologia da malária *vivax*. No presente estudo, avaliou-se o perfil hematológico, bioquímico e imunológico de indivíduos com infecções simples de VK210 e VK247 e a diferença entre carga parasitária entre os dois genótipos. As concentrações séricas de TNF- α , IFN- γ e IL-10 não apresentaram diferenças entre os genótipos. Os resultados revelaram que o genótipo VK247 induz a maior frequência de alterações em parâmetros laboratoriais tais como leucopenia e neutropenia, níveis elevados de bilirrubina e a maior carga parasitária. Por outro lado, foi verificada maior frequência de HDL-C baixo em infecções pelo genótipo VK210, o que sugere que a variante VK247 utilize outras vias metabólicas e conseqüentemente não afete os níveis de HDL proporcionalmente à parasitemia observada. Alterações hematológicas, bioquímicas e da carga parasitária, podem estar relacionadas com o genótipo da CSP na malária *vivax*. Alterações imunológicas podem estar relacionadas ao passado malárico do paciente. Considerando-se que o processo doença é resultado da interação de fatores inerentes ao parasito e ao hospedeiro, a variabilidade genética de ambos deve ser considerada.

Palavras-chave: Proteína circunsporozoíta, *Plasmodium vivax*, parâmetros laboratoriais.

1. Introdução

A malária permanece como um grave problema de saúde pública mundial, principalmente em meio às populações menos favorecidas residentes em torno da zona equatorial, onde as condições de clima e vegetação contribuem para a manutenção do ciclo de transmissão do parasita da malária (Kar et al., 2014). Essa nosologia caracterizada pela tríade calafrios, febre e sudorese é uma das principais causas de morbi-mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais do mundo (Jain et al., 2010).

Dentre as cinco espécies que podem causar malária em humanos, o *Plasmodium vivax* é a espécie mais distribuída geograficamente no mundo (WHO, 2014). No Brasil, de 137.976 casos registrados em 2014, 83,66% são por *P. vivax* (Ministério da Saúde, 2014). Apesar disso por muitos anos o *P. vivax* tem sido negligenciado, devido ser considerado um parasito benigno e o *Plasmodium falciparum* estar classicamente relacionado à malária grave (Price et al., 2007). Contudo, relatos relativamente recentes demonstram a associação do *P. vivax* com complicações clínicas e até casos fatais (Barcus et al., 2007; Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008; Andrade et al., 2010), além de cepas resistentes à drogas antimaláricas (Kain et al., 1993; Machado et al., 2003), sendo estes achados motivo de preocupação para a saúde pública.

Os esporozoítos de *Plasmodium vivax* são recobertos pela proteína circunsporozoíta (CSP), que é multifuncional atuando na maturação dos parasitos nessa fase, na invasão da glândula salivar no mosquito, bem como na invasão dos hepatócitos para iniciar o ciclo pré-eritrocitário no homem (Coppi et al., 2011). Essa proteína é o polipeptídeo mais abundante presente na superfície do esporozoíto e possui alto potencial imunogênico. Esta molécula tem sido apontada como principal alvo no

desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a malária a partir do estágio pré-eritrocítico, uma vez que os peptídeos sintéticos dessa proteína induzem boa resposta humoral específica, semelhante ao observado na exposição natural de humanos ao plasmódio (Herrera et al., 2005; Herrera et al., 2007; Souza-Neiras et al., 2010). O gene da CSP do *P. vivax* possui uma região central imunodominante com repetições em *tandem* flanqueada por duas regiões altamente conservadas que codificam as regiões amino-terminal (N) e carboxi-terminal (C). O domínio central repetitivo (R) da CSP do *P. vivax* é polimórfico (Rosenberg et al., 1989), gerando diferentes genótipos; VK210, VK247 e *P. vivax-like* (Herrera et al., 2004; Valencia et al., 2011).

Vários estudos sorológicos (Arruda et al., 2007, Gonzalez et al., 2001) e moleculares (Gopinah et al., 1994; Kim et al., 2010; Zakeri et al., 2006, Zakeri et al., 2010b; Lopez et al., 2012; González-Ceron et al., 2013) tem sido realizados para avaliar a distribuição das variantes CSP de *P. vivax* e os genótipos VK210 e VK247 foram identificados em diferentes áreas endêmicas do Brasil e do mundo. Ademais, o *P. vivax-like* foi detectado apenas em Papua Nova Guiné, Brasil, Indonésia e Madagascar (Parobek et al., 2014; Qari et al., 1993). No Brasil, a presença das três variantes foi detectada em áreas endêmicas, em amostras de populações indígenas e outras comunidades da Amazônia brasileira (Arruda et al., 1998; Bonilla et al., 2006; Machado & Pova 2000; Storti-Melo et al., 2009). Além disso, há evidências no México (Gonzalez-Ceron et al., 1999) e no Brasil (Da Silva et al., 2006) que os genótipos VK210 e VK247 infectam, diferencialmente, vetores locais.

Além de sua distribuição geográfica e o vetor associado, poucos aspectos tem sido investigados quanto à presença destes genótipos e a evolução da doença. Na Tailândia (Kain et al., 1993) e no Brasil (Machado et al., 2003) foram observadas

diferenças na carga parasitária e no clareamento da parasitemia em infecções com os genótipos VK210 e VK247. Posteriormente, em amostras de área endêmica da Amazônia brasileira nenhuma correlação com os sinais clínicos foi verificada com a presença dos três genótipos (Machado et al., 2003), apesar de já ter sido evidenciado na Colômbia, complicações hepáticas e pulmonares em pacientes infectados por *P. vivax* (Chaparro-Narváez et al., 2016). Recentemente, uma investigação no Estado do Maranhão demonstrou diferenças entre o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias e a parasitemia com relação aos genótipos da CSP (Ribeiro et al., 2016).

Na infecção pelo *P. vivax*, as alterações hematológicas mais frequentemente observadas são a anemia e a trombocitopenia (Lacerda et al., 2011). A anemia na infecção pelo *P. vivax* é multifatorial e é consequência, principalmente, da remoção de eritrócitos não infectados da circulação, hemólise devido ao aumento da fragilidade de eritrócitos infectados/ não infectados (Anstey et al., 2009) e da diseritropoese (Price et al., 2007). Em infecções com o *P. vivax* observam-se mudanças no perfil de marcadores lipídicos (Visser et al., 2013), hepáticos e renais (Echeverri et al., 2003; Mascarenhas-Netto et al., 2014; Arévalo-Herrera et al., 2015) destes pacientes. Nesse contexto, relacionar os achados laboratoriais com as variantes CSP de *P. vivax* pode fornecer relevantes informações acerca de um melhor entendimento do potencial fisiopatológico destes genótipos em pacientes de área endêmica da Amazônia brasileira.

2. Métodos

2.1. Obtenção das amostras e determinação da carga parasitária

No período de abril a junho de 2015, foram coletadas 70 amostras sanguíneas de pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 59 anos, residentes no

município de Itaituba, Pará, Brasil. Foram incluídos no estudo apenas 55 pacientes que apresentaram monoinfecção por *P. vivax*, tendo sido 15 pacientes excluídos devido estar gestante, amamentando ou em uso de anti-inflamatório não hormonal e/ou corticosteroides ou por apresentar outra espécie de plasmódio. Dentre os pacientes incluídos no estudo, a monoinfecção por *P. vivax* foi confirmada pela gota espessa, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e por diagnóstico molecular. A carga parasitária foi definida pela quantificação de parasitos por microlitro em 100 campos microscópicos (Brasil, 2009). Foi coletado um total de 10 mL de sangue por venopunção em tubos Vacutainer contendo anticoagulante EDTA (Becton Dickinson, EUA) para análises hematológicas e bioquímicas. Foram obtidas alíquotas de sangue e plasma e congeladas a -20°C para posterior identificação dos genótipos e avaliação do nível de citocinas, respectivamente. As amostras foram coletadas antes do início do tratamento com cloroquina e primaquina, conforme o protocolo padrão recomendado pelo Programa de Controle da Malária no Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas (CAEE 01774812.2.0000.5415) e os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2. Genotipagem CSP

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total com EDTA, utilizando-se kit comercial *Axyprep™ Blood Genomic DNA MiniPrep Kit* (Axygen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As variantes CSP foram genotipadas pelo protocolo de PCR-RFLP segundo Cassiano *et al.*, 2011, com modificações. Brevemente, obteve-se um mix com volume final de 25µL. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total com EDTA, utilizando-se kit comercial MiniPrep, de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, um mix de reação com

volume final de 25 μ L foi obtido: *P. vivax* DNA, 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μ M of each primer (5' AGG CAG AGG ACT TGG TGA GA 3' and 5' CCA CAG GTT ACA CTG CAT GG 3') and 1 U of *Taq* Platinum (Invitrogen, EUA).

A reação foi realizada em um termociclador como descrito: ciclo inicial de 94°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min com uma extensão final a 72°C por 10 min. Como controle positivo, três plasmídios foram usados contendo um inserto da porção repetitiva do gene da CSP amplificada a partir das variantes VK210, VK247 and *P. vivax*-like (BlueScript). Utilizou-se água estéril como controle negativo da reação. A reação de digestão foi executada em um volume final de 20 μ L: 10 U da enzima AluI (Invitrogen, EUA), 2 μ L do tampão de reação enzimática, 10 μ L do produto da PCR e 7 μ L de água estéril livre de DNase. As reações foram realizadas em banho-maria a 37°C conforme orientação do fabricante.

2.3. Análises Hematológicas

O perfil hematológico foi determinado e interpretado usando um contador celular Pentra 60® (ABX Diagnostics, França). Os parâmetros hematológicos avaliados foram: número global de eritrócitos (RBC; intervalo de referência: homens 4.5 – 6.5 x 10⁶/ μ L, mulheres 3.9 – 5.6 x 10⁶/ μ L), hemoglobina (Hb; homens \geq 13 g/dL, mulheres \geq 12 g/dL), hematócrito (Ht; homens 38 – 50%, mulheres 36 – 47%), volume corpuscular médio (VCM; 80 - 100 μ m³), hemoglobina corpuscular média (HCM; 27,0 – 32,0 pg), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM; 32,0 – 36,0 g/dL), contagem total de leucócitos (WBC; 4 – 10 x 10³/ μ L), linfócitos (1,0 – 3,8 x 10³/ μ L), neutrófilos (1,5 – 6,8 x 10³/ μ L), monócitos (200 – 800/ μ L), eosinófilos (40 – 400/ μ L) e contagem

de plaquetas (PLT 150 – 400 x 10³/μL). A anemia foi definida pelo critério da Organização Mundial de Saúde (OMS).

2.4. Análises Bioquímicas

Os exames bioquímicos foram realizados e interpretados no analisador automático Cobas Integra 400 (Roche®, Suíça). Foram dosados os seguintes parâmetros: ureia (10 – 49 mg/dL), creatinina (0,64 – 1,4 mg/dL), colesterol total (desejável < 200 mg/dL, alto > 240 mg/dL) HDL-C (desejável > 45 mg/dL), LDL-C (< 129 mg/dL, alto > 160 mg/dL), VLDL-C (normal values < 40 mg/dL), triglicérides (desejável < 150 mg/dL, elevado > 200mg/dL, aspartato aminotransferase (AST; homens ≤ 40 U/L, mulheres ≤ 32 U/L), alanina aminotransferase (ALT; homens ≤ 41 U/L, mulheres ≤ 33 U/L) e bilirrubina total (≤ 1 mg/dL).

2.5. Análises Imunológicas

As concentrações séricas das citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-10 foram mensuradas pelo método de ELISA de captura conforme instruções do fabricante (BD Biosciences®, USA). Todas as dosagens foram realizadas em duplicata, a densidade óptica (DO) foi determinada com o leitor de placas de ELISA (Biotek®, USA), em comprimento de onda de 450nm (DO₄₅₀) e a média dos dois valores obtidos foi utilizada para as análises. Uma curva padrão foi estabelecida para cada placa e os valores foram expressos em pg/mL.

2.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada nos programas *BioEstat 5.3* e *GraphPad Prism 6*. Utilizou-se a mediana global da densidade parasitária para estabelecimento do ponto de corte: os pacientes foram classificados com baixa parasitemia quando apresentaram ≤

5.500 parasitos/ μ L e alta parasitemia quando apresentaram > 5.500 parasitos/ μ L. Aplicou-se o teste t ou Mann-Whitney para avaliação da carga parasitária, dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, das dosagens de citocinas e do tempo de doença. Aplicou-se o teste de Qui-quadrado para avaliar a frequência de baixa e alta parasitemia, de reinfeção e de alterações hematológicas e bioquímicas. Utilizou-se o Teste de Correlação de Spearman para avaliar a associação entre os níveis de parasitemia e citocinas.

3. Resultados

O sexo masculino foi predominante ($n=34$; 62%) e a idade média de 29 (DP ± 8 anos). Os indivíduos com episódio anterior da doença, sem especificação da espécie, foram predominantes ($n = 44$; 80%). Houve apenas 11 indivíduos (20%) primoinfectados. O número médio de dias com sintomas de malária foi de 6 ± 5 dias. A densidade parasitária média foi de 11.425 parasitos/ μ L (SD ± 12.283 parasitos/ μ L) de sangue com variação de 65 a 60.000 parasitos/ μ L (mediana de 5.500 parasitos/ μ L; IQR 3.250 – 14.250 parasitos/ μ L). Utilizou-se a mediana para estabelecimento do ponto de corte: os pacientes foram classificados com baixa parasitemia quando apresentaram ≤ 5.500 parasitos/ μ L e alta parasitemia quando apresentaram > 5.500 parasitos/ μ L.

Houve maior frequência do genótipo VK210 ($n = 42$; 76%). Não foi detectado *P. vivax-like*, nem co-infecção entre o VK210 e o VK247. A densidade parasitária foi mais elevada na variante VK247 ($p = 0,037$) registrando média de 15.076 ± 12.043 p/ μ L (mediana de 15.000 p/ μ L; IQR 5.000 – 20.500 p/ μ L) em comparação a VK210 com média de 9.171 ± 12.158 p/ μ L (mediana de 5.000 p/ μ L; IQR 3.000 – 10.000 p/ μ L) (Figura 1A). Além disso, observou-se a maior frequência de alta parasitemia no genótipo VK247 (69%; $p < 0,001$) quando comparado ao VK210 (43%) (Figura 1B).

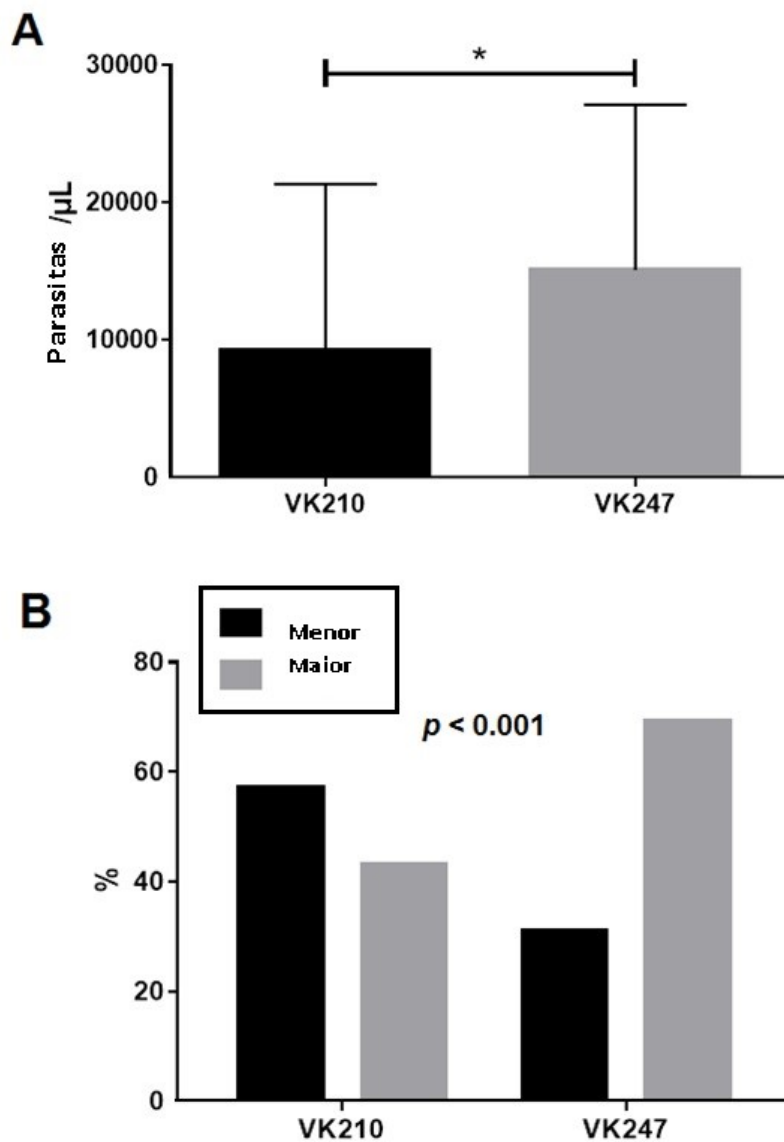


Fig. 1. Diferença na densidade parasitária por variante de CSP de *Plasmodium vivax*. A) Parasitemia mais elevada no genótipo VK247 ($p = 0.038$). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Comparação dos dois grupos utilizando o teste Mann-Whitney. B) Faixa de alta parasitemia (> 5.500 parasitos/ μ L) mais frequente no genótipo VK247 ($p < 0.001$), de acordo com o teste de Qui-quadrado. Dados expressos em porcentagem (%). O asterisco representa resultados significativamente diferentes entre os grupos avaliados de acordo com o Teste de Mann-Whitney; $*p < 0.05$.

Tabela 1

Parâmetros epidemiológicos, hematológicos, bioquímicos e perfil de citocinas por variante de CSP de *P. vivax*.

Parâmetros	Geral n(%)	CSP		P
		VK210 n(%)	VK247 n (%)	
Episódio prévio de malária	44 (80)	34 (81)	10 (77)	0.603 ^a
Duração da doença	6 ± 5	6 ± 6	4 ± 4	0.190 ^b
Hematológicos				
RBC (10 ⁶ /μL)	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.6	0.880 ^c
Hemoglobina (g/dL)	13.4 ± 1.9	13.4 ± 1.9	13.2 ± 1.9	0.764 ^b
Hematócrito (%)	40.2 ± 5.9	40.2 ± 6.0	39.9 ± 5.6	0.866 ^b
MCV (fL)	88.0 ± 3.7	88.2 ± 3.7	87.3 ± 3.4	0.321 ^b
MCH (pg)	29.7 ± 1.1	29.7 ± 1.1	29.7 ± 1.1	0.878 ^b
MCHC (%)	33.8 ± 1.1	33.6 ± 1.0	34.1 ± 1.2	0.135 ^b
WBC (10 ³ /μL)	5.0 ± 1.7	5.2 ± 1.8	4.4 ± 1.3	0.136 ^c
Linfócitos (10 ³ /μL)	1.4 ± 0.6	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.7	0.488 ^c
Neutrófilos (10 ³ /μL)	3.2 ± 1.5	3.4 ± 1.6	2.7 ± 1.3	0.166 ^c
Monócitos (10 ² /μL)	1.5 ± 1.0	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.679 ^b
Eosinófilos (10 ² /μL)	1.6 ± 1.1	1.5 ± 1.1	1.8 ± 1.0	0.418 ^b
Linfócitos (%)	29.7 ± 12.1	29.4 ± 11.8	30.7 ± 13.2	0.738 ^c
Neutrófilos (%)	63.4 ± 13.2	64.3 ± 12.6	60.8 ± 15.1	0.409 ^c
Monócitos(%)	3.0 ± 1.9	2.8 ± 1.7	3.7 ± 2.5	0.151 ^b
Eosinófilos (%)	3.4 ± 2.4	3.0 ± 1.8	4.8 ± 3.2	0.060 ^b
Plaquetas (10 ³ /μL)	109 ± 56	110 ± 51	106 ± 73	0.855 ^c
Bioquímicos				
Urea (mg/dL)	28.3 ± 9.2	27.2 ± 8.4	31.6 ± 11.0	0.134 ^c
Creatinina (mg/dL)	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.228 ^c
AST (U/L)	23 ± 12	22 ± 9	29 ± 18	0.153 ^b
ALT (U/L)	20 ± 15	19 ± 13	24 ± 21	0.746 ^b
BT (mg/dL)	1.1 ± 1.0	1.1 ± 1.1	1.1 ± 0.8	0.968 ^b
BI (mg/dL)	0.6 ± 0.7	0.7 ± 0.7	0.6 ± 0.3	0.780 ^b
BD (mg/dL)	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.469 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	186 ± 96	186 ± 96	187 ± 101	0.994 ^b
Colesterol total (mg/dL)	121 ± 32	123 ± 33	118 ± 28	0.643 ^b
VLDL-C (mg/dL)	37 ± 19	37 ± 19	37 ± 20	0.996 ^b
LDL-C (mg/dL)	62 ± 31	66 ± 31	51 ± 30	0.135 ^b
HDL-C (mg/dL)	13 ± 13	11 ± 11	17 ± 17	0.400 ^b
Imunológicos (Citocinas)				
TNF-α (pg/mL)	48.9 ± 99.2	57.9 ± 108.1	19.9 ± 56.5	0.241 ^b
IFN-γ (pg/mL)	4.9 ± 9.7	3.6 ± 9.2	9.4 ± 10.7	0.067 ^b
IL-10 (pg/mL)	312.3 ± 265.5	297.5 ± 259.8	359.9 ± 289.1	0.465 ^b

RBC: contagem de hemácias; MCV: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração hemoglobínica corpuscular média; WBC:

contagem absoluta de leucócitos; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirubina total; BI: bilirubina indireta; BD: bilirubina direta; VLDL-C: lipoproteína de muito baixa densidade; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ : interferon gamma; IL-10: interleucina-10.

Parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos expressos pela media \pm desvio padrão. Os grupos foram comparados utilizando-se o Teste de Qui-Quadrado (^a), Mann-Whitney (^b) and Teste t-Student (^c).

Tabela 2

Frequência das alterações hematológicas e bioquímicas por variante de CSP de *P. vivax*.

Alterações	Geral	CSP		P
		VK210	VK247	
Anemia	11 (20)	9 (21)	2 (15)	0.357 ^a
Leucopenia	17 (31)	11 (27)	6 (46)	0.008 ^a
Linfopenia	15 (28)	11 (27)	4 (31)	0.640 ^a
Neutropenia	3 (6)	1 (2)	2 (15)	0.001 ^b
Monocitose	2 (4)	1 (2)	1 (8)	0.100 ^b
Trombocitopenia	40 (74)	30 (73)	10 (77)	0.624 ^a
AST \uparrow	5 (9)	3 (7)	2 (15)	0.114 ^a
ALT \uparrow	9 (17)	7 (17)	2 (15)	0.847 ^a
BT \uparrow	21 (39)	14 (34)	7 (54)	0.007 ^a
Hipertrigliceridemia	21 (39)	17 (41)	4 (31)	0.185 ^a
VLDL-C \uparrow	21 (39)	17 (41)	4 (31)	0.185 ^a
HDL-C \downarrow	51 (94)	40 (98)	11 (85)	0.002 ^a

Valores expressos em número absoluto e porcentagem: n (%). P value < 0.05 foi considerado significativo e estão destacados em negrito. P value derivado do Teste de Qui-Quadrado^(a) e do Teste Exato de Fisher^(b).

O símbolo (\uparrow) representa níveis elevados e (\downarrow) representa baixos níveis. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirubina total; VLDL-C: lipoproteína de muito baixa densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade

Não houve diferença significativa nos parâmetros hematológicos avaliados entre os genótipos VK210 e VK247 (Tabela 1). Entretanto, observou-se diferença na frequência das alterações de leucopenia (p=0,008) e neutropenia (p=0,001), que foram mais frequentes no VK247 (Tabela 2). Da mesma forma, os parâmetros bioquímicos foram similares entre as variantes (Tabela 1). Dentre as alterações bioquímicas avaliadas, o achado de bilirrubina total elevada apresentou relevância estatística

($p=0,007$) (Tabela 2). As concentrações séricas de TNF- α (variando de 0 a 444,5 pg/mL), IFN- γ (0 a 46,7 pg/mL) e IL-10 (0 a 683,1 pg/mL) não apresentaram diferenças entre os genótipos (Tabela 1). A parasitemia obteve correlação negativa com o TNF- α ($r_s=-0,301$; $p=0,025$) e positiva IL-10 ($r_s=0,566$; $p<0,001$). No genótipo VK210, a parasitemia teve correlação positiva com IL-10 ($r_s=0,667$; $p<0,001$). Por outro lado, houve correlação negativa entre a parasitemia e o TNF- α ($r_s=-0,722$; $p=0,002$) no genótipo VK247.

4. Discussão

A proteína circumesporozoíta encontrada na forma infectante, o esporozoíto, é considerada ser um dos principais alvos para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Por avaliações sorológicas e moleculares, diferentes autores avaliaram a ocorrência das variantes da CSP do *P. vivax* em áreas endêmicas da Amazônia brasileira.

A frequência elevada de VK210, em infecções simples, continua sendo identificada na Amazônia brasileira (Machado et al., 2003; Storti-Melo et al., 2009; Gomes et al., 2016; Santos et al., 2016). Infecções por VK247, que foram menos frequentes, apresentaram densidade parasitária significativamente maior (figura 1), como já observado recentemente no município de Goianésia do Pará, Estado do Pará (Santos et al., 2016) e no Estado do Maranhão (Ribeiro et al., 2016). Estes resultados reforçam a adaptação deste genótipo no território brasileiro, visto que há quase duas décadas a maior carga parasitária foi verificada em infecções por VK210 tanto no Estado do Pará quanto em outras áreas endêmicas da Amazônia (Machado & Pova, 2000). A hipótese de que estas parasitemias mais elevadas em VK247 sejam ocorrência

de “seleção imune” (Ribeiro et al., 2016), é aqui reforçada, uma vez que a alta prevalência constante de VK210 nas regiões estudadas pode gerar altos títulos de anticorpos anti-VK210. Adicionalmente, as espécies de *Anopheles* podem também ser responsáveis pela seleção do genótipo em cada área endêmica (Santos et al., 2016). A VK247 possui menor prevalência que VK210 e uma distribuição bastante heterogênea na Amazônia Brasileira. Estudo em outras áreas endêmicas na América latina (Gonzalez-Ceron et al., 2013) evidencia que a introdução destes genótipos ocorreu em momentos distintos na região, apesar de VK247 ser ancestral e possuir região repetitiva do gene CSP mais estável que VK210 (Hughes et al., 2004).

Apesar de vários estudos já terem sido desenvolvidos com os genótipos CSP de *P. vivax*, abordando sua possível associação aos aspectos moleculares (Souza-Neiras et al., 2010; Storti-melo et al., 2009), imunológicos (Ribeiro et al., 2016), epidemiológicos (Machado e Povoá., 2000), clínicos (Machado et al., 2003) e entomológicos (Da Silva et al., 2006), este é o primeiro trabalho que verifica sua associação com achados hematológicos e bioquímicos.

Alterações hematológicas durante a malária tem sido relatadas em diversos estudos com a infecção pelo *P. vivax*. No presente trabalho, observou-se presença de 31% de indivíduos com leucopenia. No entanto, a maior frequência (46%; Teste de Qui-quadrado $p=0,008$) foi verificada em indivíduos infectados com o genótipo VK247, com neutropenia mais frequentemente observada na presença deste genótipo (15%; Teste de Qui-quadrado $p=0,001$). A frequência de leucopenia observada nos pacientes de forma geral foi semelhante ao descrito na literatura (Echeverri et al., 2003; Kini and Chandrashekhar, 2016), porém superior à relatada por outros autores em outras áreas endêmicas de malária vivax (Jadhav et al., 2003; Taylor et al., 2008; Philipose and

Umashankar et al., 2016). De fato, a malária induz às diversas alterações quantitativas e qualitativas nas células brancas, como diminuição nas contagens de leucócitos, conhecido como leucopenia. Contudo, a maioria dos pacientes apresenta contagem de leucócitos dentro do intervalo de referência (Taylor et al., 2008). Recentemente, um estudo realizado em Manaus demonstrou significativa redução na contagem de leucócitos de indivíduos primo-infectados e com malária recorrente (Chaves et al., 2016). Ademais, tem sido demonstrada correlação positiva entre número de leucócitos e parasitemia, com contagem de leucócitos significativamente maior em pacientes com alta parasitemia em pacientes maláricos (Kotepui et al., 2015). Nossos resultados não destacam este aspecto, uma vez o genótipo VK247 induziu altas densidades parasitárias, contudo não diferiu quanto a contagem total de leucócitos e apresentou maior frequência de leucopenia. Nossos achados ressaltam a possibilidade de que estes genótipos da CSP possam modular o perfil hematológico de pacientes infectados com este protozoário.

Quanto ao perfil bioquímico, de uma forma geral, houve uma alta frequência de indivíduos com baixos níveis de HDL-C (94%) e bilirrubina total elevada (39%) quando comparado à outros trabalhos (Visser et al., 2013; Arévalo-Herrera et al., 2015; Mesquita et al., 2016) e média frequência com hipertrigliceridemia (39%) e VLDL-C aumentado (39%), inferior ao observado em outros estudos (Visser et al., 2013; Mesquita et al., 2016). Duas alterações bioquímicas apresentaram-se diferentes entre os genótipos: houve maior frequência de valores elevados de bilirrubina total em infecções por VK247 (54%; Teste de Qui-Quadrado, $p=0,007$) e maior frequência de HDL-C baixo em infecções por VK210 (98%; Teste de Qui-Quadrado $p=0,002$). A hiperbilirrubinemia está usualmente relacionada à ocorrência de hemólise ou de

colestase hepática levando a um aumento da bilirrubina indireta ou direta, respectivamente⁽³³⁾. Mudanças no perfil lipídico de indivíduos na fase aguda de malária, tem sido observadas em diversos estudos, tanto em malária complicada quanto nos quadros não complicados, independente da espécie infectante (Faucher et al., 2002; Visser et al., 2013). A primeira revisão sistemática e meta-análise sobre o assunto avaliando o impacto da malária nos principais parâmetros do perfil lipídico, confirmou que colesterol total, HDL-C e LDL-C são consideravelmente mais baixos durante a malária quando comparado a valores de referência e grupos controle de indivíduos saudáveis e sintomáticos (Visser et al.,2013). Está bem descrito na literatura a existência de correlação negativa entre a densidade parasitária e o nível de HDL-C, devido este ser um composto essencial para o desenvolvimento do *Plasmodium* spp., durante o ciclo eritrocítico (Mohanty et al., 1992), uma vez que o parasito demanda uma considerável quantidade de lipídeos durante o processo de replicação e na formação da hemozoína *in vivo* (Sinnis et al., 1997; Fitch et al., 1999). Apesar de ter sido demonstrado neste e em outros trabalhos que o VK247 pode atingir parasitemias mais elevadas (Santos et al., 2016; Ribeiro et al., 2016), surpreendentemente, observamos maior proporção de níveis mais baixos de HDL-C entre pacientes infectados com a variante VK210. Sabe-se que o parasito apesar da necessidade de esteróis para efetiva replicação, pode adaptar-se às condições com quantidades restritas de colesterol, utilizando vias alternativas (Labaied et al., 2011). Dessa forma, é possível que a variante VK247 utilize outras vias metabólicas e conseqüentemente não afete os níveis de HDL proporcionalmente à parasitemia observada.

Na malária humana, a resposta imune persistente mediada por citocinas inflamatórias resultam na imunopatologia que, por sua vez, leva à sintomatologia

apresentada. Esta produção de citocinas inflamatórias é um importante estímulo à fagocitose que acelera a eliminação dos eritrócitos parasitados, contudo, também mediam alterações patológicas que determinam as manifestações dos sinais e sintomas da malária. Nos casos onde o padrão inflamatório é prevalente, a doença tende a ser mais grave. Na malária grave, há um aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-6 (Andrade et al., 2010; Ribeiro et al., 2016) e, de fato, a concentração plasmática dessas citocinas são diretamente relacionadas à gravidade da doença, com relação direta de níveis plasmáticos de TNF e IFN- γ e a gravidade da doença (Andrade et al., 2010). Já o aumento da IL-10, citocina anti-inflamatória, ocorre em resposta a um aumento das citocinas pró-inflamatórias, como mecanismo regulatório, a fim de prevenir uma resposta inflamatória exacerbada e efeitos prejudiciais (Andrade et al., 2010; Medina et al., 2011), por outro lado, podendo contribuir para a manutenção do parasita no hospedeiro e favorecer recaídas (Andrade et al., 2010; Medina et al., 2011). A avaliação dos níveis de citocinas entre indivíduos primoinfectados com malária vivax e com quadro recorrente mostra um progressivo aumento dos níveis de IL-10 de acordo com o número de episódios de malária, o que reforça a importância do papel da IL-10 na redução da imunopatologia após sucessivos episódios maláricos, gerando certa imunidade clínica e relativa proteção contra a forma grave na malária recorrente (Mahanta et al., 2015; Chaves et al., 2016). Aliado a isso, tem sido observado também elevados níveis de IL-10 em indivíduos assintomáticos (Andrade et al., 2010).

No presente estudo observou-se que apesar de haver diferença entre as médias dos níveis de citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 entre as variantes VK210 e VK247, essa diferença não adentrou a relevância estatística, semelhante ao descrito em pacientes no

Estado do Maranhão, que também verificou que os níveis de IL-6 e IL-10 tendem a se elevar em resposta ao aumento da parasitemia (Ribeiro et al., 2016).

Além disso, os autores verificaram uma correlação negativa entre a carga parasitária e níveis de TNF- α (Teste de Correlação de Spearman, $r_s=-0,301$; $p=0,025$). De modo oposto, uma avaliação em pacientes maláricos em Buritis no Estado de Rondônia, evidenciou níveis mais elevados de TNF em indivíduos com maior gravidade, tendo estes indivíduos com infecção grave apresentado maior parasitemia que indivíduos com malária não complicada, demonstrando assim, uma relação proporcional da parasitemia com os níveis de TNF (Andrade et al., 2010). Foi demonstrado que altos níveis de IFN- γ durante a infecção por *P. vivax* estaria relacionado ao aumento da parasitemia e à gravidade da doença (Medina et al., 2011). Semelhantemente, no presente estudo observou-se uma tendência a níveis mais elevados de IFN- γ em pacientes com VK247 (genótipo que apresentou parasitemias mais elevadas), entretanto sem correlação dessa citocina com a parasitemia. Diante do exposto, reconhecemos que o tamanho amostral pode ser um fator de confusão, uma limitação, embora com um tamanho amostral também reduzido, em pacientes infectados com *P. vivax* no Estado do Maranhão (Ribeiro et al., 2016), foi verificado que os polimorfismos da CSP estão associados ao aumento das respostas imunes inflamatórias não regulatórias e, que por sua vez podem estar associados ao resultado da infecção. Deve-se pensar também que as alterações imunológicas podem estar relacionadas ao estado imune, ou seja, ao número prévio de infecções maláricas do paciente. Por último, a população brasileira é bastante miscigenada, devido à influência da colonização pelos portugueses, onde houve cruzamentos que envolveram principalmente os europeus, africanos e americanos nativos (Furini et al., 2016), onde a

etnia pode influir na frequência de polimorfismos de moléculas do sistema imune e, portanto podem comprometer sua eficiência (Cassiano et al., 2015).

Finalmente, o genótipo VK247 induz a uma maior frequência de alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos e pode induzir à cargas parasitárias mais elevadas na malária vivax, e possivelmente estar relacionado à manifestações clínicas mais proeminentes. Considerando-se que o processo doença é resultado da interação entre fatores do parasito e do hospedeiro, a variabilidade genética de ambos deve ser considerada.

Referências

- Alecrim M. G. C., Alecrim W. D., Macedo V., Korves C. T., Roberts D. R., Li J. et al., 1999. Description of a possible clonal expansion of *Plasmodium vivax* in Manaus-Amazonas-Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 303-305.
- Andrade B. B., Reis-Filho A., Souza-Neto S. M., Clarêncio J., Camargo L. M. A., Barral A., 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar. J.* 9, 13.
- Anstey N. M., Russel B., Yeo T. W., Price R. N., 2009. The pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 25, 220-227
- Arévalo-Herrera M., Lopez-Perez M., Medina L., Moreno A., Gutierrez J. B., Herrera S., 2015. Clinical profile of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. *Malar. J.* 14, 154.
- Arruda M. E., Souza R. C., Veiga M. E., Ferreira A. F., Zimmerman R. H., 1998. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK247 and *P. vivax*-like human malaria: a retrospective study in indigenous Indian populations of the Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 628.
- Arruda M. E., Zimmerman R. H., Souza R. C., Oliveira-Ferreira J., 2007. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of Amazon region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 367-372.

- Bonilla J. A., Validum L., Cummings R., Palmer C. J., 2006. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvmsp1 and Pvmsp1 in Guyana, South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 830-835.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2009. Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2. Ed. Brasília: Ministério da Saúde.
- Cassiano GC, Santos EJ, Maia MH, Furini Ada C, Storti-Melo LM, Tomaz FM, Trindade PC, Capobianco MP, Amador MA, Viana GM, Póvoa MM, Santos SE, Machado RL. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. *Hum Immunol.* 2015 Nov;76(11):836-42.
- Cassiano G. C., Storti-Melo L. M., Póvoa M. M., Galardo A. K. R., Rossit A. R. B., Machado R. L. D., 2011. Development of PCR-RFLP assay for the discrimination of *Plasmodium* species and variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in *Anopheles* mosquitoes. *Acta Tropica.* 118, 118-122.
- Chaparro-Narváez P. E., Lopez-Perez M., Rengifo L. M., Padilla J., Herrera S., Arévalo-Herrera M., 2016. Clinical and epidemiological aspects of complicated malaria in Colombia, 2007-2013. *Malar. J.* 15, 269.
- Chapman S. J., Hill A. V. S., 2012. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* 13, 175-188.
- Chaves Y. O., Costa A. G., Pereira M. L. M., Lacerda M. V. G., Coelho-dos-Reis J. G., Martins-Filho O. A. et al., 2016. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.* 15, 445.
- Coppi A., Natarajan R., Pradel G., Bennett BL., James E. R., Roggero M. A. et al., 2011. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J. Exp. Med.* 208, 341-356.
- Da Silva NA, Santos CC, Lacerda RN, Machado RL, Póvoa MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darling* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem Ins Oswaldo Cruz.* 2006; 101:547-50.
- Echeverri M., Tobón A., Alvarez G., Carmona J., Blair S., 2003. Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia, 2001. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo* 45, 29-34.
- Faucher J. F., Ngou-Milama E., Missinou M. A., Ngomo R., Kombila M., Kremsner P. G. 2002. The impact of malaria on common lipid parameters. *Parasitol Res.* 88, 1040-1043.
- Fitch C. D., Cai G. Z., Chen Y. F., Shoemaker J. D., 1999. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochim Biophys Acta.* 1454, 31-37.

- Furini AA, Cassiano GC, Petrolini Capobianco M, Dos Santos SE, Machado RL. Frequency of TNFA, INFG, and IL10 Gene Polymorphisms and Their Association with Malaria Vivax and Genomic Ancestry. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:5168363.
- Gomes M. S. M., Vieira J. L. F., Cassiano G. C., Musset L., Legrand E., Nacher M. 2016. Evaluation of circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* to estimate its prevalence in Oiapoque, Amapá State, Brazil, bordering French Guiana. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 58, 72.
- González J. M. , Hurtado S., Arévalo-Herrera M., Herrera S., 2001. Variants of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (VK210 and VK247) in Colombian Isolates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 709-712.
- González-Céron L., Rodriguez M. H., Nettel J. A., Vilarreal C., Kain K. C., Hernández J. E., 1999. Differential susceptibility of *Anopheles albimanus* e *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 e VK247 in southern Mexico. *Infect. Immun.* 67, 410-412.
- González-Céron L., Martinez-Barnerche J., Montero-Sólis C., Santillán F., Soto A. M., Rodríguez M.H., et al., 2013. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar. J.* 12, 243
- Gopinath R., Wongsrichanalai C., Córdón-Rosales C., Mirabelli L., Kyle D., Kain K. C., 1994. Failure to detect a *Plasmodium vivax-like* malaria parasite in globally collected blood samples. *J. Infect. Dis.* 170, 1630-1633.
- Herrera S., Bonelo A., Perlaza B. L., Fernandez O. L., Victoria L., Lenis A. M., et al., 2005. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in Colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 3-9.
- Herrera S., Corradin G., Arévalo-Herrera M., 2007. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol.* 23, 122-128.
- Herrera S., Bonelo A., Perlaza B. L., Valencia A. Z., Cifuentes C., Hurtado S. et al., 2004. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int. J. Parasitol.* 34, 1535-1546.
- Hughes A. L., 2004. The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms. *J. Mol. Evol.* 59, 528-535.
- Jadhav U. M., Singhvi R., Shah R. 2003. Prognostic implications of White cell differential count and White cell morphology in malaria. *J. Postgrad. Med.* 49, 218-221.
- Kain K. C., Brown A. E., Lanar D. E., Ballou W. R., Webster H. K., 1993. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 478-484.

- Kim T-S., Kim H-H., Lee S-S., Na B-K., Lin K., Cho S-H., et al., 2010. Prevalence of *Plasmodium vivax* VK210 and VK247 subtype in Myanmar. *Malar. J.* 9, 195.
- Kini R. G., 2016. Chandrashekhar J. Parasite and the circulating pool-characterisation of leucocyte number and morphology in malaria. *J. Clin. Diagn. Res.* 10, 44-48.
- Kotepui M., Piwkham D., PhunPhuech B., Phiwklam N., Chupeerach C., Duangmano S., 2015. Effects of malaria parasite density on blood cell parameters. *Plos One.* 10, e0121057.
- Labaied M., Jayabalasingham B., Bano N., Cha S. J., Sandoval J., Guan G., 2010. *Plasmodium* salvages cholesterol internalized by LDL and synthesized de novo in the liver. *Cell. Microbiol.* 13, 569-586.
- Lacerda M. V. G., Mourão M. P. G., Coelho H. C. C., Santos J. B., 2011. Thrombocytopenia in malária: wh ocares? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 52-63
- Lacerda M. V. G., Mourão M. P. G., Alexandre M. A. A., Siqueira A. M., Magalhães B. M. L., Martinez-Espinosa F. E. *et al.*, 2012. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar. J.* 11, 12.
- Lopez A. C., Ortiz A., Coello J., Sosa-Ochoa W., Torres R. E. M., Banegas E. I. *et al.*, 2012. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Honduras. *Malar. J.* 11, 391.
- Machado R. L. D., Póvoa M. M., 2000. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic áreas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 377-381.
- Machado R. L. D., Figueredo Filho A. F., Calvosa V. S., Figueredo M. C., Nascimento J. M., Póvoa M. M., 2003 Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. *Braz. J. Infec. Dis.* 7, 175-177.
- Mahanta A., Kar S. K., Kakati S., Baruah S., 2015. Heightened inflammation in severe malaria is associated with decreased IL-10 expression levels and neutrophils. *Innate Immun.* 21, 546-552.
- Maithand K., Marsh K., 2004. Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Trop.* 90, 131-140.
- Mascarenhas-Netto R. C., Fabbri C., Freitas M. V., Bernardino-Neto M., Garrote-Filho M. S., Lacerda M. V. G. *et al.*, 2014. Influence of *Plasmodium vivax* malária on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol. Rev.* 113, 863-874
- Medina T. S., Costa S. P. T., Oliveira M. D., Ventura A. M., Souza J. M., Gomes T. F. *et al.*, 2011. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax*

malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar. J.* 10, 264.

Mohanty S., Mishra S. K., Das B. S. et al., 1999. Altered plasma lipid pattern in falciparum malária. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 601-606.

Parobek C. M., Bailey J. A., Hathaway N. J., Socheat D., Rogers W. O., Juliano J. J., 2014. Differing patterns of selection and geospatial genetic diversity within two leading *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2796.

Philipose C. S., Umashankar T., 2016. The role of haematological parameters in predicting malária with special emphasis on neutrophil lymphocyte count ratio and monocyte lymphocyte ratio: A single Institutional experience. *Trop. Parasitol.* 6, 147-150.

Price R. N., Tjitra E., Guerra C. A., Yeung S., White N. J., Anstey N. M., 2007. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 79-87.

Qari S. H., Shi Y. P., Póvoa M. M., Alpers M. P., Deloron P., Murphy G. S., 1993. Global occurrence of *Plasmodium vivax-like* human malaria parasite. *J. Infect. Dis.* 168, 1485-1489.

Ribeiro B. D., Cassiano G. C., Souza R. M., Cysne D. N., Grisotto M. A. G., Santos A. P. S. A. et al., 2016. Polymorphisms in *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (CSP) influence parasite burden and cytokine balance in a pre-amazon endemic area from Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004479.

Rosenberg R., Wirtz R. A., Lanar D. E., Sattabongkot J., Hall T., Waters A. P., et al., 1989. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* 245, 973-976.

Santos E. A., Primo D. G., Sucupira I. M. C., Cassiano G. C., Barbosa D. R. L., Viana G. M. R. et al., 2016. Frequency of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotypes in humans and anopheline mosquitoes in an endemic area of Southeastern Pará State, Brazil. *Rev. Pan-Amaz. Saúde.* 7, 57-64.

Santos-Ciminera P. D., Alecrim M. G. C., Roberts D. R., Quinnan Jr G. V., 2007. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil. *Acta Trop.* 102, 38-46.

Silva A. N., Santos C. C., Lacerda R. N., Machado R. L., Póvoa M. M., 2006. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *an. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 547-550.

Sinnis P., Sim B. K., 1997. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends Microbiol.* 5, 52-58.

Souza-Neiras W. C., Storti-Melo L. M., Cassiano G. C., Couto V. S. C. A., Couto A. A. R. A., Soares I. S., et al., 2010. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a

limited variation or new subspecies with major biological consequences? *Malar. J.* 9, 178.

Storti-Melo L. M., Souza-Neiras W. C., Cassiano G. C., Joazeiro A. C. P., Fontes C. J., Bonini-Domingos C. R., 2009. *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 672-678.

Taylor W. R. J., Widjaja H., Basri H., Ohrt C., Taufik T., Tjitra E. et al., 2008. Changes in the total leukocyte and platelet counts in Papuan and non Papuan adults from northeast Papua infected with acute *Plasmodium vivax* or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar. J.* 7, 259.

Valencia S. H., Rodríguez D. C., Acero D. L., Ocampo V., Arévalo-Herrera M., 2011. Platform for *Plasmodium vivax* vaccine discovery and development. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 179-192.

Visser B. J., Wieten R. W., Nagel I. M., Grobusch M. P., 2013. Serum lipids and lipoproteins in malaria – a systematic review and meta-analysis. *Malar. J.* 12, 442.

Zakeri S., Mehrizi A. A., Djadid N. D., Snounou G., 2006. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. *Trop. Med. Int. Health.* 11, 729-737.

Zakeri S., Safi N., Afshar M., Butt W., Ghasemi F., Mehrizi A. A., et al., 2010b. Genetic structure of *Plasmodium vivax* isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. *Acta Trop.* 113, 12-19.