

Fator de Necrose Tumoral Alfa e Gravidade Clínica em Primoinfectados pelo *Plasmodium Vivax*

Tumor Necrosis Factor Alpha and Clinical Severity in Non-Immune *Plasmodium Vivax*

ISABEL BARROSO AUGUSTO DA SILVA¹
ANA MARIA REVORÊDO DA SILVA VENTURA²
ANA YECÊ NEVES PINTO²
MARIA IMACULADA MUNIZ JUNQUEIRA³
MARIA INALDA ALVES DINIZ⁴
MATHEUS FUCHSHUBER-MORAES⁵
SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS⁶
JOSÉ MARIA DE SOUZA⁷

RESUMO

Objetivo: Avaliar a relação entre o FNT- α , a gravidade da apresentação clínica e a trombocitopenia, além da frequência do FNT2 e sua influência sobre os níveis da citocina. **Material e Métodos:** Foram avaliados pacientes primoinfectados pelo *P. vivax*, ≥ 15 anos, provenientes de Belém, Pará, com sintomas há ≤ 21 dias, atendidos e acompanhados clinicamente no Instituto Evandro Chagas (IEC) ou hospitalizados. A parasitemia foi quantificada todos os dias até a negativização. Adotou-se a cloroquina e a primaquina por via oral, durante sete dias, como tratamento. Amostras sanguíneas foram coletadas em D0 e D7 para análises hematológicas e bioquímicas, títulos do FNT- α e a frequência do FNT2. Os programas *Biostat 2.0* e *Excel-Windows* foram utilizados para as análises estatísticas das diferenças e das correlações entre os parâmetros obtidos. **Resultados:** Oitenta e três pacientes foram atendidos e acompanhados clinicamente no D0, D1, D2, D3 e D7, de fevereiro/2002 a março/2003. O FNT- α se correlacionou positivamente e significativamente com a parasitemia ($r_s = 0,33$; $p < 0,01$) e com os escores clínicos ($r_s = 0,48$; $p = 0,0001$), porém negativamente com as plaquetas ($r_s = -0,48$; $p < 0,001$) em D0. Os níveis elevados de FNT- α foram responsáveis pela intensidade das manifestações clínicas e pela trombocitopenia nestes pacientes, porém o FNT2 não produziu títulos altos da citocina. Conseqüentemente, títulos elevados de FNT- α foram benéficos na maioria dos casos, a plaquetopenia é um sinal de gravidade e outros fatores genéticos foram responsáveis pelos níveis elevados dessa citocina nesta amostra.

DESCRIPTORIOS

Malaria *vivax*. Manifestações Clínicas. Trombocitopenia. FNT- α , FNT2.

SUMMARY

Objective: Evaluate the relationship between the TNF- α , the severity of clinical presentation, the thrombocytopenia, the frequency of TNF2 and its influence over cytokine levels. **Material e Methods:** We evaluated patients with first episode of *vivax* malaria, ≥ 15 years, with disease duration ≤ 21 days, coming from the city of Belém, Pará, attended at the Instituto Evandro Chagas (IEC) or hospitalized. The parasitemia was quantified every day till the negativation. The adopted treatment was chloroquine and primaquine PO, during seven days. Blood samples were collected at D0 and D7 to realize quantification of hematological and biochemical parameters, TNF- α titles and TNF2 frequency. The programs *Biostat 2.0* and *Excel for Windows* were applied to analyze the differences and correlations between the parameters. **Results:** Eighty three patients were attended and accompanied clinically at D0, D1, D2, D3 and D7, from february/2002 till march/2003. The TNF- α level correlated positively and significantly with parasitemia ($r_s = 0.33$, $p < 0.01$) and clinical scores ($r_s = 0.48$, $p = 0.0001$), but negatively with the platelets ($r_s = -0.48$, $p < 0.0001$) at D0. Consequently, high titles of TNF- α levels were beneficial to the majority of the cases; the thrombocytopenia is a signal of severity, and others genetic factors were responsible for the high levels of this cytokine and phenotypic manifestations on this sample.

DESCRIPTORS

Vivax Malaria. Clinical Manifestation. Thrombocytopenia. TNF- α , TNF2.

- 1 Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna. Centro de Ciências Médicas. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – Paraíba – Brasil.
- 2 Médica do Instituto Evandro Chagas. Belém – Pará – Brasil.
- 3 Professora Associada II do Departamento de Patologia. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília – Brasil.
- 4 Enfermeira do Instituto Evandro Chagas. Belém – Pará – Brasil.
- 5 Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará. Belém – Pará – Brasil.
- 6 Professor Adjunto IV do Departamento de Farmacologia. Universidade Federal do Pará. Belém – Pará – Brasil.
- 7 Professor Titular do Departamento de Farmacologia e Fisiologia. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. Belém – Pará – Brasil.

A interação do parasito com o hospedeiro, influenciada por características genéticas individuais, é capaz de causar variações fenotípicas na intensidade da resposta imunológica e consequentemente na apresentação clínica das doenças infecciosas e parasitárias, inclusive na malária (FERREIRA, 1973; HILL *et al.*, 1991; WEATHERALL, 1996; BURT, 1999; TOSTA, 2001). O primeiro episódio de malária consiste em um evento patogênico intenso, devido ao contato íntimo entre os antígenos parasitários e as células de defesa de primeira linha do indivíduo, como os neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos *natural killer*. Componentes moleculares diversos também estão presentes, representados por fatores do complemento, proteínas da fase inflamatória aguda, como as citocinas e quimiocinas e outras substâncias como os radicais livres de oxigênio (TOSTA and SANTOS-NETO, 1989; WHITE e HO, 1992; BATE e KWIATKOWSKI, 1994; YAMADA-TANAKA *et al.*, 1995; MUNIZ-JUNQUEIRA e TOSTA, 1996; KARUNAWEEERA *et al.*, 1998; DANIEL-RIBEIRO e CRUZ, 2000; HEDDINI, 2002; MILLER *et al.*, 2002).

Um dos primeiros produtos da resposta imunológica inata é a citocina chamada fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), presente e atuante nos mamíferos desde a embriogênese, inclusive no ser humano, e que pode ser produzido rapidamente em grandes quantidades devido a estimulação direta do fator de transcrição nuclear *kappa B* (OLD, 1985; BEUTLER e CERAMI, 1987; BECK e HABICHT, 1991; BARNES e KARIN, 1997; LEUNG *et al.*, 2000).

O FNT- α pode ser produzido dentro dos tecidos ou ser lançado na corrente sanguínea e tem funções pleiotróficas. Dependendo do alvo e, principalmente, dos níveis sanguíneos e teciduais, age de forma benéfica ou deletéria (CHOUAIB *et al.*, 1991; ROBAYE *et al.*, 1991; JACOB, 1992; LIU *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1999; NATORI *et al.*, 2001).

Mecanismos efetores importantes relacionados ao FNT- α são observados na malária humana, tais como a formação de outras citocinas (interleucinas, interferon- γ etc.), ativação leucocitária e infiltração tissular por essas células, fagocitose, apoptose e, também, controle do parasitismo (MANTOVANI e DEJANA, 1989; KWIATKOWSKI *et al.*, 1989; CHOUAIB *et al.*, 1991; KARUNAWEEERA *et al.*, 1992a; KWIATKOWSKI D, 1995; MUNIZ-JUNQUEIRA *et al.*, 2001).

Interessantemente, o gene do FNT- α está localizado no cromossomo seis, entre os genes do complexo

The parasite-host interaction, influenced by genetic characteristics, is capable to cause phenotypic variation in the immunologic response intensity and consequently in the clinical presentations of the infectious diseases, inclusive malária (FERREIRA, 1973; HILL *et al.*, 1991; WEATHERALL, 1996; BURT, 1999; TOSTA, 2001). The first episode of malária is characterized by an intense pathogenic event, due to the close contact between the parasite antigens and the individual first line defensive cells, like neutrophils, monocytes, macrophages and natural killer lymphocytes. Variable molecular components are present too, represented by complement factors, proteins of the acute inflammatory phase like cytokines and quimiokynes, beyond others substances like oxygen free radicals (TOSTA and SANTOS-NETO, 1989; WHITE and HO, 1992; BATE and KWIATKOWSKI, 1994; YAMADA-TANAKA *et al.*, 1995; MUNIZ-JUNQUEIRA and TOSTA, 1996; KARUNAWEEERA *et al.*, 1998; DANIEL-RIBEIRO and CRUZ, 2000; HEDDINI, 2002; MILLER *et al.*, 2002).

One of the first products of the innate immunological response is the cytokine named tumor necrosis factor alpha (TNF- α), present since the mammal's embryogenesis, including the human being and that is intensively and rapidly produced through the prompt stimulation of transcriptional nuclear *kappa B* factor (OLD, 1985; BEUTLER and CERAMI, 1987; BECK and HABICHT, 1991; BARNES and KARIN, 1997; LEUNG *et al.*, 2000).

The TNF- α can be produced inside the tissue or circulates freely in the blood and has diversified functions. Depending of the level and the target, can act beneficially or deleteriously (CHOUAIB *et al.*, 1991; ROBAYE *et al.*, 1991; JACOB, 1992; LIU *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1999; NATORI *et al.*, 2001).

Important effectors mechanisms, related to the TNF- α , are observed in the human malária, like the production of others cytokines (interleucins, γ -interferon, etc.), leukocyte activation and tissue infiltration by these cells, phagocytosis, apoptosis, and too, parasitic control (MANTOVANI and DEJANA, 1989; KWIATKOWSKI *et al.*, 1989; CHOUAIB *et al.*, 1991; KARUNAWEEERA *et al.*, 1992a; KWIATKOWSKI D, 1995; MUNIZ-JUNQUEIRA *et al.*, 2001).

Interestingly, the TNF- α gene is localized at the

principal de histocompatibilidade. É susceptível ao polimorfismo de nucleotídeo único e está em desequilíbrio de ligação com os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA). Todos são essenciais para as respostas imunológicas e, conseqüentemente, influenciam as manifestações fenotípicas patológicas das doenças (NEDWIN *et al.*, 1985; SPIES *et al.*, 1986; WILSON *et al.*, 1993; DELVES e ROITT, 2000a; DELVES e ROITT, 2000b).

Tem sido bastante demonstrado que níveis elevados de FNT- α na malária *falciparum* causam anemia e trombocitopenia graves, hemorragia cerebral e pulmonar, coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal, entre outras manifestações (CLARK *et al.*, 1989; GRAU *et al.*, 1989; BUTCHER *et al.*, 1990; KWIATKOWSKI, 1990; SHAFFER *et al.*, 1991). Além disso, em indivíduos da África, a presença de uma mutação de ponto localizada em -308 da região promotora do gene FNT- α , chamada FNT2, que consiste na troca da guanina pela adenina (G \rightarrow A), cuja frequência está em torno de 20% nesta população étnica, é responsável por títulos altos de FNT- α , manifestações clínicas graves e morte (WILSON *et al.*, 1992; McGUIRE *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1997).

A malária *vivax*, apesar de ser considerada uma forma benigna da doença, evolui com aumento considerável de FNT- α e trombocitopenia, contudo, somente eventualmente, ocorrem apresentações graves, caracterizadas por insuficiência respiratória aguda, hemorragia ou morte (HILL e KNIGHT, 1964; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1998; CARLINI *et al.*, 1999; CURLIN *et al.*, 1999; MODEBE e JAIN, 1999; SILVA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2003; Da SILVA *et al.*, 2003; Da SILVA *et al.*, 2004).

Diante dessas observações, decidiu-se avaliar a intensidade das manifestações clínicas e as alterações laboratoriais em paciente primoinfectados pelo *P. vivax*, relacionando-as aos níveis de FNT- α e à presença do alelo FNT2.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi prospectivo, com pacientes primoinfectados pelo *P. vivax*, atendidos no Programa de Ensaios Clínicos em Malária (PECM) do Instituto Evandro Chagas (IEC), em Belém, capital do Pará, e desenvolvido durante 13 meses, de fevereiro/2002 a março/2003.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IEC e todos os participantes ou seus

sixth chromosome, inside the major histocompatibility complex. It is susceptible to single nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium with the human leukocyte antigen (HLA) genes. All of them are essential factors to the immunological responses and influence the phenotypic illness presentations (NEDWIN *et al.*, 1985; SPIES *et al.*, 1986; WILSON *et al.*, 1993; DELVES and ROITT, 2000a; DELVES and ROITT, 2000b).

There were demonstrated, extensively, that high TNF- α levels in malaria *falciparum* can cause severe anemia and thrombocytopenia, cerebral and pulmonary hemorrhage, disseminated intravascular coagulation, renal insufficiency, beside others manifestations (CLARK *et al.*, 1989; GRAU *et al.*, 1989; BUTCHER *et al.*, 1990; KWIATKOWSKI, 1990; SHAFFER *et al.*, 1991). Further, in African individuals, the presence of a mutation at -308 promoter region TNF- α , named TNF2, that consist of an exchange between guanine and adenine (G \rightarrow A), and that has a frequency around 20% in this ethnic population, is responsible for high TNF- α titers, accompanied by severe clinical findings and death (WILSON *et al.*, 1992; McGUIRE *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1997).

The *vivax* malaria, in spite of being consider a benign type, evaluates with important increase of TNF- α and thrombocytopenia but, only eventually, could be observed severe presentations, characterized by acute respiratory insufficiency, hemorrhage or death (HILL and KNIGHT, 1964; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1998; CARLINI *et al.*, 1999; CURLIN *et al.*, 1999; MODEBE and JAIN, 1999; SILVA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002; MOUTA *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2003; Da SILVA *et al.*, 2003; Da SILVA *et al.*, 2004).

In face of these observations, we decided to study the intensity of clinical findings and laboratory changes in prime infected *P. vivax* patients, relating them to TNF- α titles and the presence of TNF2 allele.

MATERIAL AND METHODS

The study was prospective, with *P. vivax* prime infected patients, attended to the Programa de Ensaios Clínicos em Malária (PECM) of Instituto Evandro Chagas (IEC) at Belém, capital of Pará, and was developed during thirteen months, from February/2002 to march/2003.

The research was approved by Ethical Committee of IEC and all the participant patients or theirs

responsáveis legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de inclusão foram: primeiro episódio de malária *vivax*, idade ≥ 15 anos, e história de febre e calafrios durante um período ≤ 21 dias.

Os critérios de exclusão foram: gestantes ou mulheres em período de amamentação, pacientes com outras doenças infecciosas ou imunológicas, em uso de antiinflamatório não-hormonal, corticosteróides ou drogas citotóxicas.

A consulta e o seguimento dos pacientes foram conduzidos pelo médico responsável pela pesquisa e registrados em um prontuário específico, nos dias zero (D0), um (D1), dois (D2), três (D3) e sete (D7).

O tratamento da malária *vivax* instituído foi por via oral, durante 7 dias, segundo protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2001), qual seja:

D0: 4 comprimidos de cloroquina 150 mg e 2 comprimidos de primaquina 15 mg;
 D1: 3 comprimidos de cloroquina 150 mg e 2 comprimidos de primaquina 15 mg;
 D2: 3 comprimidos de cloroquina 150 mg e 2 comprimidos de primaquina 15 mg;
 D3 ao D7: 2 comprimidos de primaquina 15 mg

A parasitemia foi realizada diariamente pelo método de ANTUÑANO (1988a,b), modificado por De SOUZA (1996), até ser obtido resultado negativo, e também em D7.

Treze sintomas: febre, calafrios, cefaléia, adinamia, dor articular e muscular, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, colúria, tosse e dispnéia, informados pelo paciente, foram graduados de 0 a 4 de acordo com a intensidade, o que gerou um somatório variável de 0 a 52 pontos. O estado clínico do paciente, a temperatura axilar em graus centígrados ($^{\circ}\text{C}$), a coloração da pele e das mucosas e a gradação da icterícia na esclerótica foram pontuadas de 0 a 3 de acordo com a intensidade, sendo obtida uma soma que variou de 0 a 12 pontos. Esses pontos foram somados e geraram um escore clínico para cada paciente.

A hemoglobina, as plaquetas e os leucócitos foram quantificados em amostras sanguíneas, em D0 e D7, utilizando-se um contador automático da marca ABX *Pentra-120-R*. A bilirrubina indireta (BI), a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT) e a γ -glutamil transpeptidase (GGT) foram analisadas em D0 e D7, em um auto-analizador bioquímico *Cobas Mira-Plus*.

O FNT- α foi quantificado em D0 e D7, pelo

legal representatives assigned a free and informed consent.

The inclusion criteria were: first episode of *vivax* malaria, age ≥ 15 years, and history of fever and chills during a period ≤ 21 days.

The exclusion criteria were: pregnant and nursing women, patients with others infectious or immunological diseases, in use of non-hormonal anti-inflammatory, corticosteroid or cytotoxic drugs.

The consultation and follow-up of the patients were conducted by the physician responsible for the research and registered in a specific medical file, at zero day (D0), first day (D1), second day (D2), third day (D3) and seventh day (D7).

The *vivax* malaria treatment per oral and during seven days obeyed the scheme dictated by Health Ministry of Brazil (BRASIL, 2001):

D0: 4 pills of chloroquine 150 mg and 2 pills of primaquine 15 mg;
 D1: 3 pills of chloroquine 150 mg and 2 pills of primaquine 15 mg;
 D2: 3 pills of chloroquine 150 mg and 2 pills of primaquine 15 mg;
 D3 to D7: 2 pills of primaquine 15 mg

The parasitemia was done daily by ANTUÑANO method (1988a,b), modified by De SOUZA (1996), until were obtained negative result, and also at D7.

Thirteen symptoms: fever, chills, headache, weakness, joint and muscle pain, anorexia, vomit, abdominal pain, diarrhea, jaundice urine, cough and dyspnea, informed by the patient, were graduated from 0 to 4 according to the intensity, and generated a sum that varied from 0 to 52 points. The clinical state, the axillary's temperature measured in centigrade ($^{\circ}\text{C}$), the color of the skin and mucosa, and the graduation of jaundice of the eye sclerotic were graduated from 0 to 3 according the intensity, and a sum was obtained, which varied from 0 to 12. These results were added and originated a clinical score for each patient.

Hemoglobin, leukocyte and platelet quantification were done at D0 and D7, utilizing blood samples processed in an automatic count *ABX Pentra-120-R*. The indirect bilirubin (IB), the aspartate aminotransferase (AST), the alanine aminotransferase (ALT) and the γ -glutamyl transpeptidase (GGT) were analyzed in blood samples, obtained at D0 and D7, by a clinical auto-analyzer *Cobas Mira-Plus*.

The TNF- α was quantified at D0 and D7, by

método ELISA sanduíche, em soro obtido de amostras sanguíneas dos pacientes sem EDTA (VAN Der LINDEN *et al.*, 1998), utilizando-se a *Pearce Endogen kit* (Rockford-Illinois/USA), com sensibilidade < 2pg/ml. Títulos $\geq 30,5$ pg/ml foram considerados elevados (SCUDERI *et al.*, 1986; MICHIE *et al.*, 1988).

Os alelos do FNT- α alelos na posição -308 foram tipados mediante extração do DNA de leucócitos do sangue total, pelo método de MILLER *et al.* (1988); acompanhado pela sua amplificação através da reação em cadeia da polimerase, utilizando os iniciadores A = 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3' and B = 5' TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3', que amplificaram um fragmento de 127 pares de bases (WILSON *et al.* 1992). Esse processo foi seguido por digestão enzimática, usando a enzima de restrição *NcoI* da *BioLabs* (New England/USA). A leitura do resultado foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata. A frequência (f) de 0.13 (13%), observada numa amostra da população de Belém, foi usada como parâmetro no estudo (FUCHSHUBER-MORAES *et al.*, 2003).

Os resultados da parasitemia e do escore clínico de D0, D1, D2, D3 e D7; e da hemoglobina, leucócitos, plaquetas, BI, AST, ALT, GGT e FNT- α de D0 e D7 foram comparados. Os programas informatizados *Biostat 2.0* (AYRES *et al.*, 2000) e o *Excel-Windows 2003* foram utilizados nas análises estatísticas.

Os resultados foram apresentados pela média \pm erro padrão. Os seguintes testes foram aplicados: teste t para dados pareados dependentes com distribuição normal; teste de Wilcoxon para dados sem distribuição normal e teste U Mann-Whitney para dados independentes não pareados. A correlação de *Spearman* foi usada para correlacionar os parâmetros; o teste χ^2 para analisar a relação de dependência entre variáveis e χ^2 do programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) para determinar o equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os tipos genéticos observados e esperados, considerando-se $gl = 1$. O nível de significância (p) foi estabelecido em ≤ 0.05 com intervalo de confiança = 95%.

Os valores da parasitemia, das plaquetas e do FNT- α foram transformados em logaritmo de dez (Log_{10}) devido à existência de parâmetros muito altos.

RESULTADOS

Oitenta e três pacientes foram avaliados: 71 atendidos no PECM/IEC e 12 hospitalizados. Três mulheres necessitaram tratamento em Unidade de

sandwich ELISA, in serum obtained from patient blood samples without EDTA (VAN Der LINDEN *et al.*, 1998), utilizing a *Pearce Endogen kit* (Rockford-Illinois/USA), with sensibility < 2pg/ml. Titles $\geq 30,5$ pg/ml were consider high (SCUDERI *et al.*, 1986; MICHIE *et al.*, 1988).

The TNF- α alleles at -308 position were obtained through the extraction of leukocytes DNA from total blood, by the method of MILLER *et al.* (1988); accompanied by amplification through polymerase chain reaction, utilizing the primers A = 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3' and B = 5' TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3', which amplified a fragment of 127 base pairs (Wilson *et al.* 1992). This process was followed by *NcoI* restriction enzyme digestion, utilizing a enzyme from the *BioLabs* (New England/USA). The lecture of the result was done through electrophoresis in poliacrilamid gel, dyed with silver nitrate. The frequency (f) = 0.13 (13%), observed in a Belém population sample, was used as parameter on this study (FUCHSHUBER-MORAES *et al.*, 2003).

The parasitemia and clinical score results from D0, D1, D2, D3 and D7; and the hemoglobin, leucocytes, platelets, IB, AST, ALT, GGT and TNF- α from D0 and D7 were compared. We used the *Biostat 2.0* statistic program (AYRES *et al.*, 2000) and *Excel for Windows 2003* to the statistic analyses.

The results were presented by average \pm standard error. It was applied the t -test to pared dependent dates with normal distribution, Wilcoxon test to pared dates without normal distribution, and U Mann-Whitney to non pared independent data. Spearman correlation was used to correlate the dates; χ^2 test to analyze the relation of dependence between variables and χ^2 of CLUMP program (SHAM and CURTIS, 1995) to determine the Hardy-Weinberg equilibrium between the observed and expected genetic types, considering $gl = 1$. Significant level (p) was established in ≤ 0.05 , and confidence interval in 95%.

The values of parasitemia, thrombocytes and TNF- α were transformed to tenth logarithmic (Log_{10}) due to the existence of elevated parameters.

RESULTS

Eighty three patients were evaluated: 71 attended at the PECM/IEC and 12 hospitalized. Three women necessitated treatment at Intensive Therapy Unit: two

Terapia Intensiva: duas desenvolveram insuficiência respiratória aguda seguida de cura e uma apresentou hemorragia pulmonar grave e faleceu no sétimo dia de tratamento.

A idade média foi $37 \pm 1,8$ anos. Vinte e seis eram mulheres (31%) e 57 homens (69%). O tempo médio de doença foi $9,57 \pm 0,55$ anos. A parasitemia média em D0 foi $9254,82 \pm 1009,05$ parasitas/mm³, havendo redução gradativa até se tornar negativa em D3 em todos pacientes. Houve redução significativa no escore clínico de D0 a D7 ($p < 0,0001$). A média do nível de FNT- α alcançou $50,91 \pm 10,06$ pg/ml em D0 e $9,08 \pm 0,41$ pg/ml em D7, observando-se diferença significativa ($p < 0,0001$). Os casos graves apresentaram uma média de FNT- α igual a $275,06 \pm 111,33$ pg/ml.

A parasitemia não se correlacionou com o escore clínico nos D0, D1, D2 e D3, porém se correlacionou significativamente com o nível de FNT- α level ($r_s = 0,33$; $p < 0,01$). O FNT- α se correlacionou positivamente com o escore clínico ($r_s = 0,48$; $p = 0,0001$). Esses resultados estão demonstrados nas figuras 1 e 2.

developed acute respiratory distress followed by cure, and one presented severe pulmonary hemorrhage and dyed at the seventh day of treatment.

The average age was 37 ± 1.8 years. Twenty six patients were women (31%) and 57 (69%) males. The average time of illness was 9.57 ± 0.55 days. The average parasitemia at D0 was 9254.82 ± 1009.05 parasites /mm³, with gradual reduction till becoming negative at D3, in all patients. There was significant reduction on the clinical scores from D0 to D7 ($p < 0.0001$). The average TNF- α reached 50.91 ± 10.06 pg/ml at D0 and 9.08 ± 0.41 pg/ml at D7 ($p < 0.0001$). The severe cases presented an average TNF- α level of 275.06 ± 111.33 pg/ml at D0.

The parasitic density did not correlate with the clinical score at D0, D1, D2 and D3, but correlated significantly and positively with TNF- α level ($r_s = 0.33$, $p < 0.01$). The TNF- α level correlated positively with the clinical score ($r_s = 0.48$, $p = 0.0001$). These results are demonstrated at figure 1 and 2.

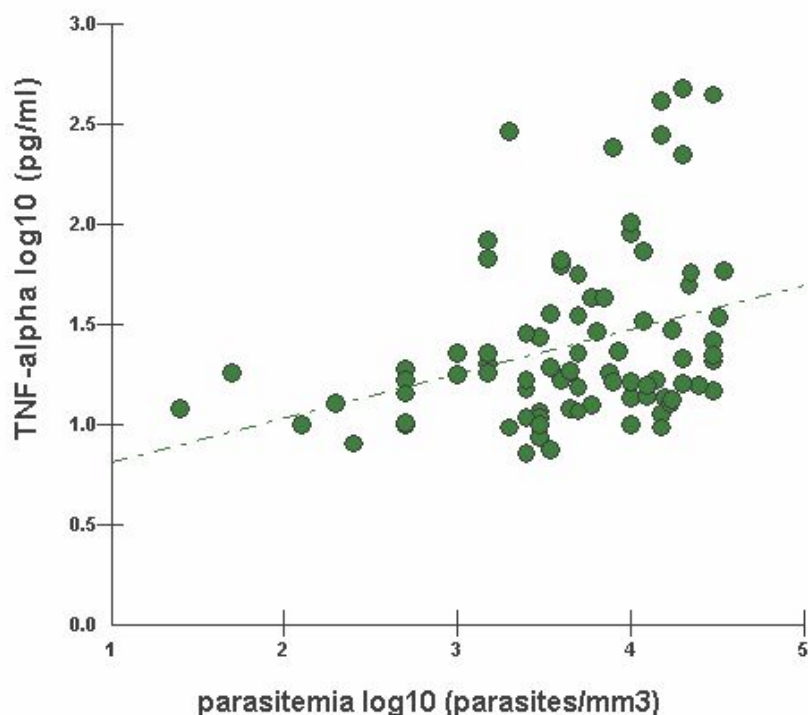


Figura 1 - Gráfico mostrando correlação significativa e positiva ($r_s = 0,33$, $p < 0,01$) entre parasitemia e FNT- α , em pacientes com malária *vivax* ($n = 83$), em D0, atendidos no IEC, de fevereiro/2002 a março/2003.

Figure 1 - Graphic showing significant positive linear correlation ($r_s = 0.33$, $p < 0.01$) between parasitemia and TNF- α level, in malaria *vivax* patients ($n = 83$), at D0, attended at IEC, from february/2002 to march/2003.

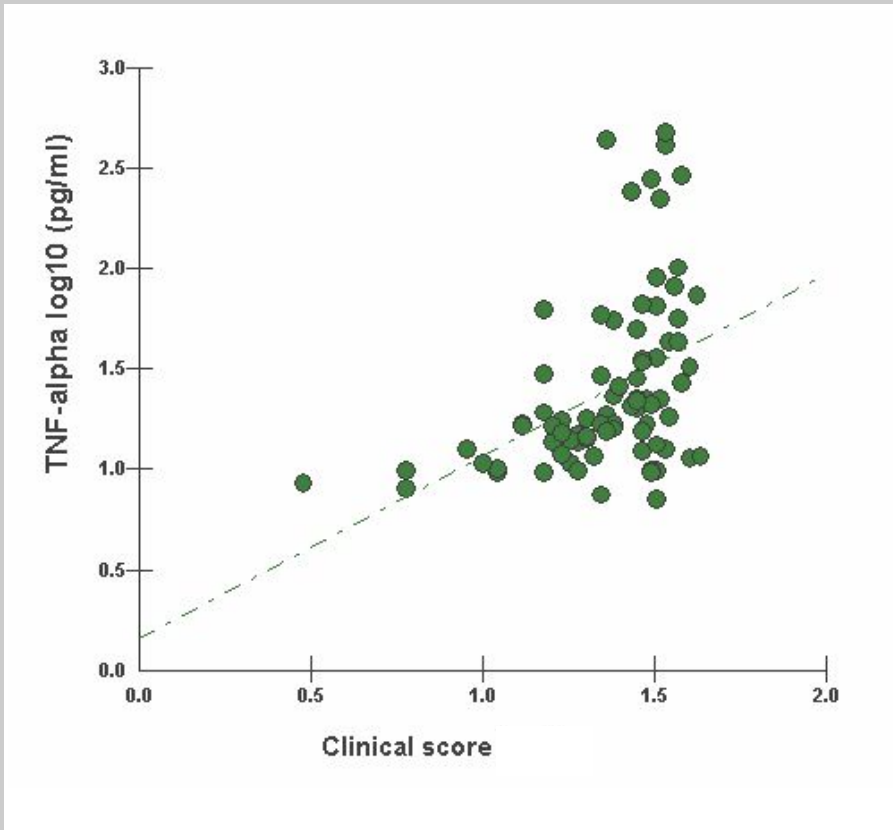


Figura 2 - Gráfico mostrando correlação significativa e positiva ($r_s = 0,48$, $p = 0,0001$) entre FNT- α e escore clínico, em pacientes com malária *vivax* ($n = 83$) em D0, atendidos no IEC, de fevereiro/2002 a março/2003.

Figure 2 - Graphic showing significant positive linear correlation ($r_s = 0.48$, $p = 0.0001$) between TNF- α level and clinical score, in malaria *vivax* patients ($n = 83$) at D0, attended at IEC, from february/2002 to march/2003.

Não se observou diferença significativa na taxa da hemoglobina entre D0 e D7; os leucócitos tinham valor médio abaixo de 3500 células/mm³ em D0 e aumentaram significativamente em D7 ($p < 0,005$), quando normalizaram; as plaquetas alcançaram média abaixo de 150.000 células/mm³ em D0 e aumentaram significativamente ($p < 0,0001$) em D7, quando apresentaram nível normal; a BI, a AST e a GGT se encontravam significativamente altas em D0 em relação a D7 ($p < 0,0001$, $p = 0,0004$, $p < 0,0001$, respectivamente), mas a ALT não se alterou. Esses resultados estão demonstrados na Tabela 1.

Os leucócitos, a BI, a AST e a GGT não se correlacionaram com os níveis do FNT- α em D0. Porém, uma correlação negativa e significativa entre os níveis de FNT- α e as plaquetas foi observada ($r_s = -0,48$; $p < 0,001$), conforme demonstrada na Figura 3. Cinco pacientes (6%) apresentaram sinais hemorrágicos: dois desenvolveram petéquias nas pernas, um apresentou epistaxe, uma teve hemoptóicos e a paciente que faleceu desenvolveu hemorragia pulmonar grave.

It wasn't observed significant difference on the hemoglobin value from D0 to D7; the leukocytes reached an average level above 3500 cells/mm³ at D0 and was significantly reduced in relation to D7 ($p < 0.005$), when normalized; the platelets reached average level lower than 150000 cells/mm³ at D0 and was diminished significantly in relation to D7 ($p < 0.0001$), when it normalized; the BI, AST and GGT elevated significantly at D0 in relation to D7 ($p < 0.0001$, $p = 0.0004$, $p < 0.0001$, respectively), but the ALT did not change. All these results are demonstrated at the Table 1.

The leukocytes, the IB, the AST and the GGT levels did not correlated with TNF- α at D0. However, a significant negative correlation between TNF- α level and platelets was observed ($r_s = -0.48$, $p < 0.001$), showed at Figure 3. Five patients (6%) presented hemorrhagic episodes: two developed legs petechiae, one developed epistaxis, another patient presented hemorrhagic expectoration and the fatal case developed severe pulmonary hemorrhage.

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos (média \pm erro padrão) e nível de significância (p) em D0 e D7, de pacientes primoinfectados pelo *P. vivax* ($n = 83$), atendidos no PECM/IEC, no período de fevereiro/2002 a março/2003, Belém, PA, Brazil.

Table 1 - Hematological and biochemical parameters (average \pm standard error) and significant level (p) at D0 and D7, from malaria *vivax* prime infected patients ($n = 83$), attended at PECM/IEC, from february/2002 to march/2003, Belém, PA, Brazil.

Parâmetro laboratorial Laboratorial parameter	Dia do Tratamento / Treatment Day		p
	D0	D7	
Hemoglobina (g/dl) / Hemoglobin (g/dl)	12.54 \pm 0,20	12.27 \pm 0,15	NS
Plaquetas (células/mm ³) / Platelets (cells/mm ³)	106.087,50 \pm 8.028,50	368.937,50 \pm 14.126,40	$p < 0,0001$
Leucócitos (células/mm ³) / Leukocytes (cells/mm ³)	3129.2 \pm 297,27	6.749,18 \pm 313,43	$p < 0,01$
AST (U/l) / AST (U/l)	47,20 \pm 9,5	35,90 \pm 2,5	$p = 0,0004$
ALT (U/l) / ALT (U/l)	54,60 \pm 4,9	51,50 \pm 4,7	NS
BI (mg/dl) / IB (mg/dl)	0,94 \pm 0,07	0,55 \pm 0,06	$p < 0,0001$
GGT (U/l) / GGT (U/l)	120,10 \pm 12,3	77,10 \pm 6,7	$p < 0,0001$
FNT- α (pg/ml) / TNF- α (pg/ml)	50,91 \pm 10,06	9,08 \pm 0,41	$p < 0,0001$

AST = aspartato aminotransferase / AST = aspartate aminotransferase

ALT = alanino aminotransferase / ALT = alanine aminotransferase

BI = bilirrubina indireta / IB = indirect bilirubin

GGT = γ -glutamiltanspeptidase / GGT = γ -glutamiltanspeptidase

FNT- α = fator de necrose tumoral alfa / TNF- α = tumor necrosis factor alpha

NS = não significante / NS = not significant

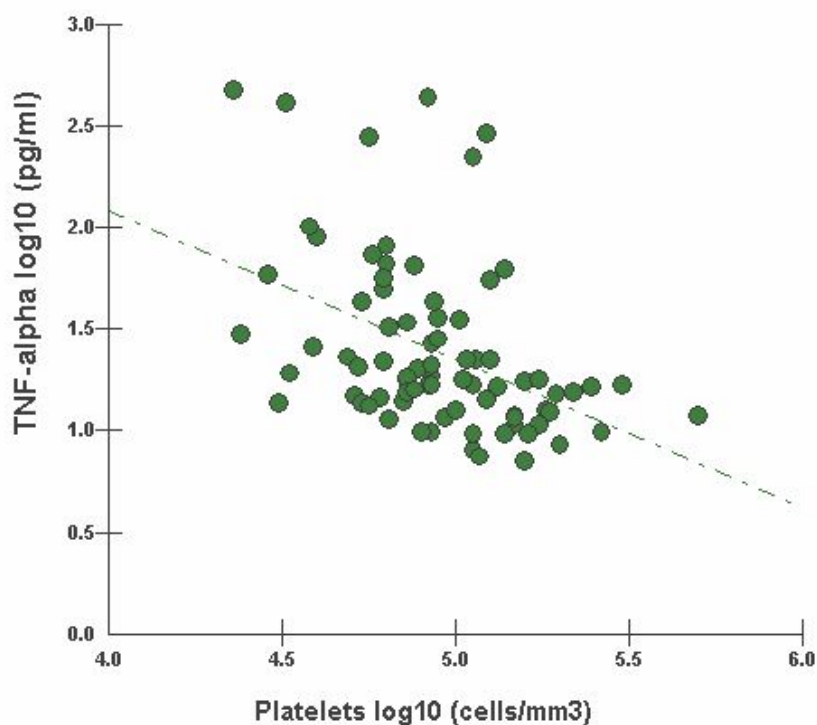


Figura 3 - Gráfico mostrando correlação negativa e significativa ($r_s = -0,48$, $p < 0,001$) entre FNT- α e plaquetas em pacientes com malária *vivax* ($n = 80$), em D0, atendidos no IEC, de fevereiro/2002 a março/2003.

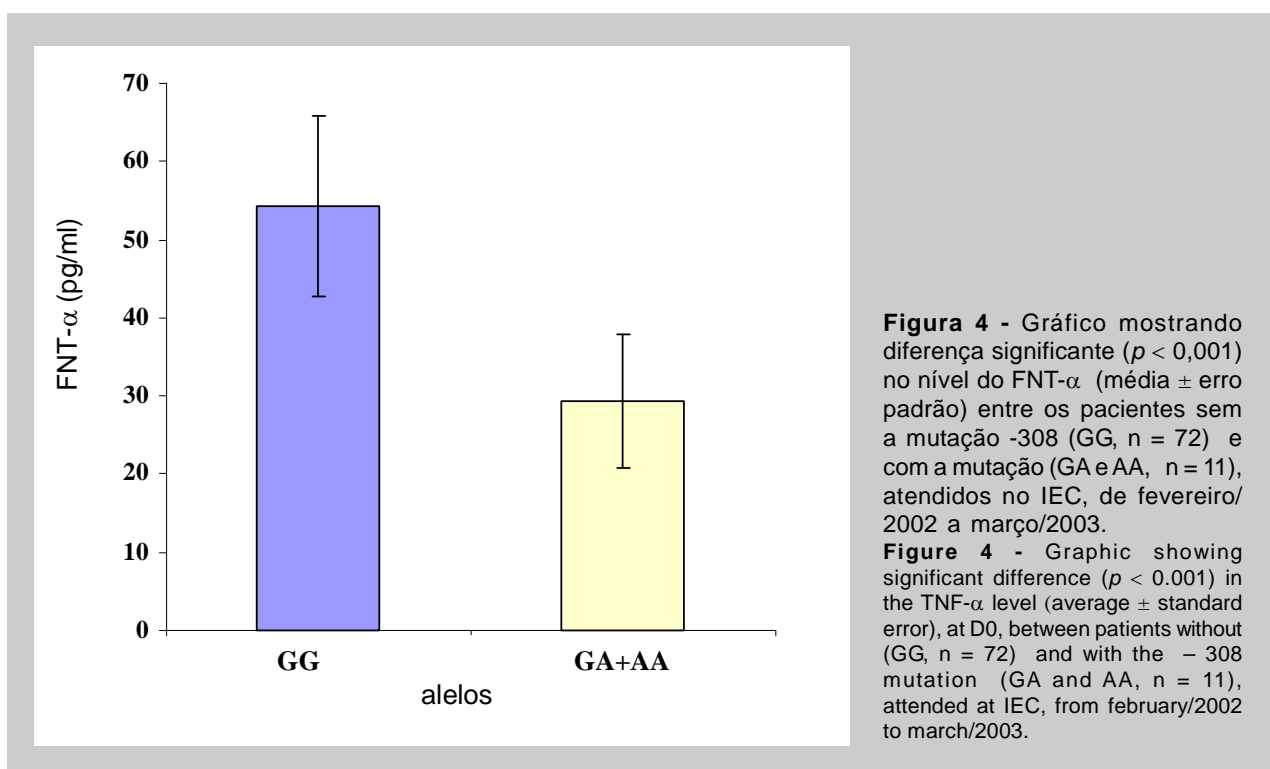
Figure 3 - Graphic showing significant negative linear correlation ($r_s = -0.48$, $p < 0.001$) between TNF- α level and platelets in malaria *vivax* patients ($n = 80$), at D0, attended at IEC, from february/2002 to march/2003.

Os alelos do FNT- α apresentaram a seguinte distribuição: onze pacientes tinham o alelo FNT2 ($f = 13\%$): nove eram heterozigotos GA ($f = 11\%$) e dois eram homozigotos AA ($f = 2\%$); setenta e dois não tinham a mutação: eram homozigotos GG ($f = 87\%$). Não houve diferença significativa entre as proporções genotípicas ($\chi^2 = 1,68$; $p = 0,71$).

A Figura 4 mostra que os pacientes com o alelo FNT2 apresentaram nível de FNT- α significativamente inferior ao nível dos pacientes sem a mutação em D0 ($p < 0,001$). O mesmo comportamento foi observado após o tratamento, em D7.

The TNF- α alleles presented the following distributions: 11 patients had the mutation ($f = 13\%$): nine were GA heterozygote ($f = 11\%$) and two AA homozygote ($f = 2\%$); 72 patients were GG homozygote ($f = 87\%$). There was no significant difference between the genotypic proportion ($\chi^2 = 1.68$, $p = 0.71$).

Figure 4 showed that TNF2 patients presented TNF- α level significantly inferior to the patients without the mutation at D0 ($p < 0.001$). The same behavior was observed after the treatment (D7).



DISCUSSÃO

O paroxismo da malária, caracterizado por febre, calafrios e cefaléia, em primoinfectados pelo *P. vivax*, é intenso e breve quando comparado ao paroxismo da malária *falciparum* (De SOUZA *et al.*, 1997; KARUNAWEERA *et al.*, 1992a; KARUNAWEERA *et al.*, 1992b; KARUNAWEERA *et al.*, 2003). Todos os pacientes desse estudo relataram paroxismos intensos na primeira consulta, independente do nível da parasitemia. A ausência de correlação entre parasitemia e apresentação clínica também foi observada por outros autores (CLARK, 1989; KWIATKOWSKI, 1995;

DISCUSSION

The paroxism of *vivax* malaria, characterized by fever, chills and headache, in prime infected by *P. vivax*, is intense and brief when compared with the paroxysm observed in *falciparum* malaria (De SOUZA *et al.*, 1987; KARUNAWEERA *et al.*, 1992a; KARUNAWEERA *et al.*, 1992b; KARUNAWEERA *et al.*, 2003). All patients of this study related intense paroxysms at the first consultation, independent of the parasite blood level. The absence of correlation between parasite level and clinical presentation was observed by others authors (CLARK, 1989; KWIATKOWSKI, 1995; PRYBYLSKI *et al.*, 1999), and

PRYBYLSKI *et al.*, 1999). Uma das explicações refere-se à capacidade do *P. vivax* em provocar uma resposta imunológica rápida e precoce, promovendo, assim, maior controle do parasitismo (KARUNAWEEERA *et al.*, 2003).

Devido ao *P. vivax* ter uma ancestralidade maior do que o *P. falciparum*, este parasito vem interagindo com a espécie humana há mais tempo, favorecendo o desenvolvimento de mecanismos de defesa e adaptação, para não dizer uma busca de um estado simbiótico. Tal contato possibilita a minimização dos efeitos deletérios de um sobre o outro (FERREIRA, 1973; WATERS *et al.*, 1991; VOLKMAN *et al.*, 2001; TOSTA, 2001).

Neste estudo, a parasitemia se correlacionou com o FNT- α e este com a apresentação clínica (escore clínico), dando-se a entender que um dos fatores mais importantes para o estímulo imunológico, nestes pacientes com malária *vivax*, foi a citocina FNT- α que, ao atuar como mediador entre o parasita e o hospedeiro, provocou as manifestações clínicas, aspecto também demonstrado por outros pesquisadores (KARUNAWEEERA *et al.*, 1992a; KARUNAWEEERA *et al.*, 1992b, KARUNAWEEERA *et al.*, 2003).

A redução dos leucócitos pode ser atribuída à infiltração dessas células nos tecidos, influenciada pelo FNT- α que, ao agir sobre o endotélio vascular, aumenta a permeabilidade capilar e favorece a saída dessas células para o interstício. Este mecanismo é acompanhado por sequestro líquido do espaço intravascular para o extravascular e formação de edema (DINARELLO e MIER, 1987; MANTOVANI e DEJANA, 1989). Os pulmões são mais susceptíveis, tanto que os três casos graves do presente estudo e aqueles relatados na literatura apresentaram insuficiência pulmonar aguda (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1998; CARLINI *et al.*, 1999; CURLIN *et al.*, 1999, MODEBE e JAIN, 1999; Da SILVA *et al.*, 2003; Da SILVA *et al.*, 2004).

A relação entre a trombocitopenia e os níveis de FNT- α foi demonstrada pela primeira vez neste estudo. Além de constituir aspecto importante em pacientes primoinfectados pelo *P. vivax*, caracteriza um fator de risco para as apresentações graves e chama a atenção para a contra-indicação de medicamentos que possam causar plaquetopenia nestes pacientes, como a aspirina.

Provavelmente o mecanismo da trombocitopenia é causado pela indução de processo oxidativo e produção excessiva de peróxido (EREL *et al.*, 2001) e/ou apoptose dessas células (ROBAYE *et al.*, 1991;

one explication is attributed to the capacity of *P. vivax* to provoke an early and fast immune response, promoting better control of the parasitism (KARUNAWEEERA *et al.*, 2003).

The *P. vivax* is a more ancient parasite than the *P. falciparum*. Such condition favored a more time of contact with the human being and the development of defense and adaptation mechanisms between the parasite and the man, probably a way to obtain a symbiosis status. Such contact contributed to a minimization of the deleterious effects between them (FERREIRA, 1973, WATERS *et al.*, 1991; VOLKMAN *et al.*, 2001; TOSTA, 2001).

In this study, the parasitemia correlated significantly with the TNF- α and this with the clinical presentation (clinical score). It means that one of the most important factors to the immunological stimulation, in these malaria *vivax* patients, was the TNF- α , which acting as mediator between the parasite and the host, provoked the clinical findings, aspect also demonstrated by other researchers (KARUNAWEEERA *et al.*, 1992a; KARUNAWEEERA *et al.*, 1992b, KARUNAWEEERA *et al.*, 2003).

The reducing of leukocytes can be attributed to infiltration of these cells in tissues, influenced by TNF- α that acts over the endothelium capillary permeability, favoring the exit of these cells to the interstice. This mechanism is accompanied by liquid sequestration from the intravascular space to the extra vascular, and edema formation (DINARELLO and MIER, 1987; MANTOVANI and DEJANA, 1989). The lungs are more susceptible, as much as the three severe cases of this study and literature presented acute respiratory insufficiency (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1998; CARLINI *et al.*, 1999; CURLIN *et al.*, 1999, MODEBE and JAIN, 1999; Da SILVA *et al.*, 2003; Da SILVA *et al.*, 2004).

The thrombocytopenia relationship with TNF- α level was demonstrated by the first time in this study. Besides it constitutes important aspect in prime infected malaria *vivax* patients, characterizes a risk factor for severe presentations, and calls attention to the prohibited use of drugs that can cause thrombocytopenia, like aspirin.

Probably, the mechanism of thrombocytopenia is caused by induction of oxidative process and excessive production of peroxide (EREL *et al.*, 2001) and/or apoptosis of these cells (ROBAYE *et al.*, 1991; FIGUET *et al.*, 2002). The three severe cases of this

FIGUET *et al.*, 2002). Os casos graves apresentaram média de 47000 ± 12333 plaquetas/mm³, sendo que duas pacientes apresentaram hemoptóicos e o caso grave hemorragia pulmonar grave e óbito.

O FNT2, apontado como responsável por altos níveis de transcrição de FNT- α (WILSON *et al.*, 1997), apresentou a mesma frequência encontrada numa pesquisa que comparou indivíduos saudáveis com pacientes com hanseníase, da cidade de Belém (FUCHSHUBER-MORAES *et al.*, 2003). Esses pesquisadores observaram que pacientes com hanseníase tinham frequência alta do alelo FNT2 (26.6%), quando comparados a indivíduos controles saudáveis (0,13%).

No presente estudo, os pacientes que não tinham a mutação produziram mais FNT- α do que aqueles que tinham o alelo FNT2, diferentemente de outros estudos desenvolvidos com a malária na África, onde os indivíduos com a mutação FNT2 tiveram títulos altos dessa citocina e complicações graves (GRAU *et al.* 1989; KWIATKOWSKI *et al.*, 1990).

Uma vez que não houve relação entre a presença da mutação e os níveis de FNT- α , foi assumido que outro ou outros fatores influenciaram sua produção nesta amostra. Uma hipótese seria a ocorrência de interferência genética do HLA, haja vista que o gene do FNT- α está localizado no mesmo cromossomo e é susceptível ao desequilíbrio de ligação com esses genes (SPIES *et al.*, 1986; WILSON *et al.*, 1993; WEATHERALL, 1996; GARCIA *et al.*, 1998).

O fenótipo das doenças complexas é influenciado pela especificidade genética do indivíduo e do agente, e pela diversidade ambiental, como o tempo de interação parasita-hospedeiro (HILL *et al.*, 1991; BENNET *et al.*, 1993; BURT, 1999; PETZL-ERLER, 1999). Uniões consanguíneas são frequentes na África, comportamento social que limita a diversidade genética. A amostra desse estudo faz parte da população de Belém, que resulta, principalmente (70%), da união entre mulheres indígenas e homens portugueses (SANTOS *et al.*, 1999).

Finalmente, concluiu-se que o nível sérico elevado do FNT- α influenciou a intensidade das manifestações clínicas e as alterações laboratoriais nesta amostra estudada, principalmente nos casos que desenvolveram complicações pulmonares. Contudo, os efeitos benéficos dessa citocina prevaleceram, uma vez que a maior parte dos pacientes apresentou quadro clínico benigno e evolução satisfatória.

study developed an average thrombocytopenia of 47000 ± 12333 platelets/mm³: two presented hemorrhagic expectoration and the fatal one severe pulmonary hemorrhage followed by death.

The TNF2, aimed as responsible for high titers of TNF- α transcription (WILSON *et al.*, 1997), was present in the same frequency of a research realized with health individuals and patients with leprosy of Belém city (FUCHSHUBER-MORAES *et al.* (2003). These researchers demonstrated that leprosy patients had a high frequency of TNF2 (26.6%), when it was compared with the health control individuals (0.13%).

Contrary to the literature, in our study, the patients that did not the TNF2 allele produced significant high TNF- α level than the group of patients with this allele, differently from others studies developed with *P. falciparum* malaria, where the TNF2 individuals had high TNF- α titles and severe complications (GRAU *et al.* 1989; KWIATKOWSKI *et al.*, 1990).

Since there was no relationship between the presence of the mutation and the titers of TNF- α , we assumed that another(s) factor(s) influenced their high production in this sample. A hypothesis could be the existence of genetic interference at the HLA, since the TNF- α gene is localized at the same chromosome and is susceptible to linkage disequilibrium with them (SPIES *et al.*, 1986; WILSON *et al.*, 1993; WEATHERALL, 1996; GARCIA *et al.*, 1998).

The phenotype of complex diseases is influenced by the individual and the agent genetic specification, and by the environment factors, for example the time of agent-host interaction (HILL *et al.*, 1991; BENNET *et al.*, 1993; BURT *et al.*, 1999; PETZL-ERLER, 1999). Consanguinity coupling is frequent in Africa, a social factor that limits genetic diversification. The sample of this study came from Belém families, which results, mainly (70%), from the coupling between indigenous women and Portuguese men (SANTOS *et al.*, 1999).

Finally, we concluded that the high TNF- α serum level influenced the intensity of the clinical findings and laboratory parameters from this study sample, mainly from those patients that developed pulmonary complications and death. However, the benefic effects of this cytokine defeated the deleterious ones, since the majority of the patients had benign presentation and outcome.

REFERÊNCIAS

References

1. ANTUÑANO, FJL (1988a) Diagnostico microscopico de los parasitos de la malaria en la sangre. In: *Diagnostico de Malaria*. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 1988a, p 39-50.
2. ANTUÑANO, FJL. Diagnostico microscopico en la sangre – preparación de muestras en gota gruesa. In: *Diagnostico de Malaria*. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 1988b, p 78-86.
3. AYRES M, AYRES Jr M, AYRES DL et al. *BioEstat 2.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Brasília: CNPq, 2000, 272p.
4. BARNES PJ, KARIN M. Nuclear factor-B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* 336: 1066-1071, 1997.
5. BATE CAW, KWIATKOWSKI D. Inhibitory immunoglobulin M antibodies to tumor necrosis factor-inducing toxins in patients with malaria. *Infection and Immunity* 62: 3086-3091 (8), 1994.
6. BECK G, HABICHT GS. Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense. *Immunology Today* 12: 180-183, 1991.
7. BENNET S, ALLEN SJ, OLERUP O et al. Human leucocyte antigen (HLA) and malaria morbidity in a Gambian community. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 286-287, 1993.
8. BEUTLER B, CERAMI A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *New England Journal of Medicine*, 316: 379-385, 1987.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Terapêutica da Malária*. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
10. BURT RA. Genetics of host response to malaria. *International Journal of Parasitology* 29: 973-979, 1999.
11. BUTCHER GA, GARLAND T, AJDUKIEWICZ AB et al. Serum tumor necrosis factor associated with malaria in patients in the Solomon Islands. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 658-661, 1990.
12. CARLINI ME, WHITE Jr AC, ATMAR RL. Vivax malaria complicated by adult respiratory distress syndrome. *Clinical Infectious Diseases* 28: 1182-1183, 1999.
13. CHOUAIB S, BRANELLEC D, BUURMAN WA. More insights into the complex physiology of TNF. *Immunology Today* 12: 141-142, 1991.
14. CLARK IA, CHAUDHRI G, COWDEN WD. Roles of tumor necrosis factor in the illness and pathology of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 436-440, 1989.
15. CURLIN ME, BARAT LM, WALSH DK et al. Non cardiogenic pulmonary edema during vivax malaria. *Clinical Infectious Diseases* 28: 1166-1167, 1999.
16. DANIEL-RIBEIRO CT, CRUZ MFF. The new and the old in malaria immunopathology. *Ciência e Cultura-Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 52: 269-281, 2000.
17. Da SILVA IBA, ARAÚJO JRM, SILVA CA et al. Malária vivax grave com edema pulmonar não cardiogênico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 273, 2003.
18. Da SILVA IBA, CARNEIRO MS, ARAÚJO JR et al. Malária vivax e vasculite: caso com óbito. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 275, 2004.
19. DELVES PJ, ROITT IM. The Immune System. First of Two Parts. In: MACKAY I, ROSEN FS. *Advances in Immunology. New England Journal of Medicine* 343: 37-49, 2000a.
20. DELVES PJ, ROITT IM. The Immune System. Second of Two Parts. In: MACKAY I, ROSEN FS. *Advances in Immunology. New England Journal of Medicine* 343: 108-117, 2000b.
21. De SOUZA JM. Malária e Exames Laboratoriais. In: *O Plasmódio*. Belém: Instituto Evandro Chagas. Universidade Federal do Pará, 1996, p 1-2.
22. De SOUZA JM, COUTO AARA, SILVA EB et al. Malária. In: LEÃO RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora Graficentro Cejup Ltda, 1997, p 645-669.
23. DINARELLO CA, MIER JW. Limfocinas. *New England Journal of Medicine* 317: 940-945, 1987.
24. EREL O, VURAL H, AKSOU N et al. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clinical Biochemistry* 34: 341-344, 2001.
25. FERREIRA LF. O fenômeno parasitismo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* VII: 261-277, 1973.
26. FUCHSHUBER-MORAES M, FERNANDES DRS, SALGADO CG et al. Estudo do polimorfismo G(-308)A da região promotora do gene TNF- α humano como fator de susceptibilidade à hanseníase em um grupo de pacientes da população de Belém-PA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (SI): 123, 2003.
27. GARCIAA, COT M, CHIPPAUX JP et al. Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 480-488, 1998.
28. GRAU GE, TAYLOR TE, MOLYNEUX ME et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *New England Journal of Medicine* 320: 1586-1591, 1989.
29. HEDDINI A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. *International Journal for Parasitology* 32: 1587-1598, 2002.
30. HILL AVS, ALLSOPP CEM, KWIATKOWSKI D et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352: 595-600, 1991.
31. HILL II GJ, KNIGHT V. Trombocytopenia in vivax malaria. *Lancet* 1: 240-241, 1964.
32. JACOB O. Tumor necrosis factor a in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunology Today* 13: 122-125, 1992.
33. KARUNAWEERA ND, CARTER R, GRAU E et al. Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58(2):204-210, 1998.

34. KARUNAWEEERA ND, CARTER R, GRAU E *et al.* Tumor necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clinical and Experimental Immunology* 88: 499-505, 1992a.
35. KARUNAWEEERA ND, GRAU GE, GAMAGE P *et al.* Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89: 3200-3203, 1992b.
36. KARUNAWEEERA ND, WIJESEKERA SK, WANASEKERA D *et al.* The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in Parasitology* 19: 188-193, 2003.
37. KWIATKOWSKI D. Malarial toxins and the regulation of parasite density. *Parasitology Today* 11: 206-212, 1995.
38. KWIATKOWSKI D, BATE CAW, SCRAGG IG *et al.* The malarial fever response $\frac{3}{4}$ pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91(5): 533-542, 1997.
39. KWIATKOWSKI D, CANNON JG, MANOGUE KR *et al.* Tumor necrosis factor production in *falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clinical and Experimental Immunology* 77: 361-366, 1989.
40. KWIATKOWSKI D, HILL AVS, SAMBOU I *et al.* TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 336: 1201-1204, 1990.
41. LEUNG JY, McKENZIE FE, UGLIALORO AM *et al.* Identification of phylogenetic footprints in primate tumor necrosis factor- α promoters. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, 97: 6614-6618, 2000.
42. LIN Y, DEVIN A, RODRIGUES Y *et al.* Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & Development* 13: 2514-2526, 1999.
43. LIU ZG, HSU H, GOEDEL DV *et al.* Dissection of TNF receptor 1 effectors functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-576, 1996.
44. MANTOVANIA, DEJANA E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunology Today* 10: 370-375, 1989.
45. MCGUIRE W, HILL AVS, ALLSOPP CE *et al.* Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371: 509-511, 1994.
46. MICHIE HR, MANOGUE KR, SPRIGGS DR *et al.* Detection of circulation tumor necrosis factor after endotoxin administration. *New England Journal of Medicine* 318(23): 1481-1486, 1988.
47. MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K *et al.* The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679, 2002.
48. MILLER SA, DYKES DD, POLESKY H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3): 1215, 1988.
49. MODEBE O, JAIN S. Multi-system failure in *Plasmodium vivax* malaria: report of a case. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 93(4): 409-412, 1999.
50. MOURAACL, BALBO BEP, CANCELALE. Óbito por *P. vivax* em área não-endêmica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(SI): 369, 2002.
51. MUNIZ-JUNQUEIRAMI, SANTOS-NETO LL, TOSTACE. Influence of tumor necrosis factor- α on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cellular Immunology* 208: 73-79, 2001.
52. MUNIZ-JUNQUEIRA MI, TOSTA CE. Imunopatologia da malária: mecanismos de imunidade. In: *5ª Reunião Nacional de Pesquisadores em Malária*. Belém, 1996.
53. NATORI S, RUST C, STADHEIM LM *et al.* Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *Journal of Hepatology* 34: 248-253, 2001.
54. NEDWIN GE, NAYLOR SL, SAKAGUCHIAY *et al.* Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Research* 13: 6361-6373, 1985.
55. NEVES JJO, PINTOAYN, VENTURAAMRS *et al.* Malária no Pará: estudo do quadro clínico e laboratorial nas infecções causadas pelo *Plasmodium vivax*, na atualidade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 57 2003.
56. OLD LJ. Tumor necrosis factor. *Science* 230(s.n.):630-632, 1985.
57. PARK CHL, FERREIRACB, FAZIO FS *et al.* Plaquetopenia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(SI): 370, 2002.
58. PETZL-ERLER M L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. *Ciência e Cultura-Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 51(3-4): 199-211, 1999.
59. PIGUET PF, VESIN C, Da KAN C *et al.* Activation of platelet caspases by TNF- α and its consequences for kinetics. *Cytokine* 18: 222-230, 2002.
60. PRYBYLSKI D, KHALIQ A, FOX E, SARWARI AR, STRICKLAND GT. Parasite density and malaria morbidity in the Pakistani Punjab. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61: 791-801, 1999.
61. PUKRITTAYAKAMEE S, CHANTRAA, VANIJANONTA S *et al.* Pulmonary oedema in *vivax* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 421-422, 1998.
62. ROBAYE B, MOSSELMANS R, FIERS W *et al.* Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells *in vitro*. *American Journal of Pathology* 138(2): 447-453, 1991.
63. SANTOS SEB, RODRIGUES JD, RIBEIRO-dos-SANTOS AKC *et al.* Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. *American Journal of Physical Anthropology* 109: 175-180, 1999.
64. SCUDERI P, LAM KS, RYAN KJ *et al.* Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 13: 1364-1365, 1986.
65. SHAFFER N, GRAU GG, HEDBERG K *et al.* Tumor necrosis factor and severe malaria. *Journal of Infectious Diseases* 163: 96-101, 1991.
66. SHAM PC, CURTIS D (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals of Human Genetics* 59: 97-105, 1995.

67. SILVA SL, FILHO FSS, ARCANJO ARL *et al.* Perfil clínico e hematológico dos pacientes internados com malária por *Plasmodium vivax* e plaquetopenia na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, no período de janeiro de 1997 a setembro de 1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(s.n.):348, 2000.
68. SPIES T, MORTON CC, NEDOSPASOV SA *et al.* Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83(s.n.):8699-8702, 1986.
69. TOSTA CE Coevolutionary networks and infectious agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3), 415-425, 2001.
70. TOSTA CE, SANTOS-NETO LL. Citocinas, integrinas e patogenia da malária. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 22(4):167-170, 1989.
71. VAN DER LINDEN MW, HUIZING TW, STOEKEN DJ *et al.* Determination of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. *Journal of Immunologic Methods* 218(s.n.):63-71, 1998.
72. VOLKMAN SK, BARRU AE, LYONS EJ *et al.* Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science* 293(s.n.):482-484, 2001.
73. WATERS AP, HIGGINS DG, McCUTCHAN TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88(s.n.):3140-3144, 1991.
74. WHITE NJ, HO M. The pathophysiology of malaria. *Advances in Parasitology* 31(s.n.):83-173, 1992.
75. WEATHERALL DJ Host genetics and infectious disease. *Parasitology* 112(s.n.):S23-S29, 1996.
76. WILSON AG, DE VRIES N, POCIOT F *et al.* An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *Journal of Experimental Medicine* 177(s.n.):557-560, 1993.
77. WILSON AG, DI GIOVINE FS, BLAKEMORE AIF *et al.* Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene detectable by *NcoI* restriction of PCR product. *Human Molecular Genetics* 1(s.n.):353, 1992.
78. WILSON AG, SYMONS JA, McDOWELL TL *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94(s.n.):3195-3199, 1997.
79. YAMADA-TANAKA MS, CRUZ MFF, ALECRIM MG *et al.* Tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and macrophage stimulating factor in relation to the severity of *Plasmodium falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. *Tropical and Geographical Medicine* 47(s.n.):282-285, 1995.

CORRESPONDÊNCIA Correspondence

Isabel Barroso Augusto da Silva
Avenida Almirante Tamandaré, 832 - Tambaú
58039-010 João Pessoa - Paraíba - Brasil

E-mail
isab10@hotmail.com
rebrasa@ccs.ufpb.br