

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MIKAELE MONIK RODRIGUES INÁCIO DA SILVA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TLR1*, *TLR4*,
TLR7, *TLR8*, *TLR9* E *TIRAP* NA SEVERIDADE DE INFECÇÕES POR *Plasmodium*
vivax.**

MACEIÓ
2024

MIKAELE MONIK RODRIGUES INÁCIO DA SILVA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TLR1*, *TLR4*,
TLR7, *TLR8*, *TLR9* E *TIRAP* NA SEVERIDADE DE INFECÇÕES POR *Plasmodium*
vivax.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Albuquerque Sortica

MACEIÓ

2024

**Catálogo na Fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586a Silva, Mikaele Monik Rodrigues Inácio da.

Análise da influência de polimorfismos nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* na severidade de infecções por *Plasmodium vivax* / Mikaele Monik Rodrigues Inácio da Silva. – 2024.

63 f. : il.

Orientador: Vinicius de Albuquerque Sortica.

Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 40-45.

Anexos: f. 46-63.

1. Malária. 2. Variação genética. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único.
4. Receptores Toll Like. 5. Proteína adaptadora TIR. I. Título.

CDU: 575.2:616.936

Folha de Aprovação

AUTOR: MIKAELE MONIK RODRIGUES INÁCIO DA SILVA

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*,
TLR8, *TLR9* E *TIRAP* NA SEVERIDADE DE INFECÇÕES POR *Plasmodium vivax*.

Dissertação de Mestrado submetida ao
corpo docente do Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Alagoas e
aprovada em 26 de julho de 2024.



Documento assinado digitalmente

VINICIUS DE ALBUQUERQUE SORTICA

Data: 13/08/2024 19:47:28-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Vinicius de Albuquerque Sortica - UFAL (Orientador)

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

LEONARDO BARBOSA LEIRIA

Data: 14/08/2024 07:59:22-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Leonardo Barbosa Leiria – UFFS (Examinador Externo)



Documento assinado digitalmente

CAROLINNE DE SALES MARQUES

Data: 15/08/2024 12:39:37-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Carolinne de Sales Marques – UFAL (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

Nessa etapa de finalização do mestrado, momento este envolvido por turbilhões de emoções, mas tendo a certeza no coração de trabalho concluído, onde pude ampliar meus conhecimentos e oferecer minha singela capacidade de desenvolver projeto de pesquisa, vivenciei experiências imensuráveis. Nesta trajetória, agradeço em primeiro lugar a Deus, por nunca ter desistido de mim e ter possibilitado viver esse sonho de pesquisadora, mesmo quando a vida proporcionou vários obstáculos impedindo de alcançar. Aos meus pais, Eliane e Clemilson por ser minha base e fonte de inspiração, por sempre acreditar e incentivar meus sonhos. Ao meu marido Leivys, pelo companheirismo e apoio nos estudos, por motivar e encorajar na busca de melhorias, incentivando a cada dia a ser a minha melhor versão. As minhas irmãs, Michele e Elisangela por viver este projeto junto comigo, pelo apoio, amizade e cumplicidade que permitiu chegar até a conclusão do mestrado. Ao meu orientador, Prof. Dr. Vinicius Sortica, pelo seu compromisso e dedicação com a pesquisa, por ser esse facilitador admirável que acrescentou nesse processo de aprendizagem, enriquecendo de maneira significativa a minha prática profissional, proporcionando uma nova visão de fazer saúde.

RESUMO

SILVA, M. M. R. I.; SORTICA, V. A. **ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* E *TIRAP* NA SEVERIDADE DE INFECÇÕES POR *Plasmodium vivax***. 33 f. Projeto de Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2024.

A malária é uma doença infecciosa amplamente disseminada causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium*. O parasita é transmitido ao hospedeiro humano pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. A malária causada por *P. vivax*, é caracterizada por sintomas iniciais brandos que se iniciam entre 07 a 10 dias após a transmissão vetorial. A resposta imune à infecção por esse patógeno libera citocinas pró-inflamatórias durante a fase sanguínea da infecção no hospedeiro. A liberação dessas citocinas no início da doença é importante para o controle e eliminação do parasito. Os receptores do tipo Toll (*TLRs*: toll-like receptors) são proteínas transmembranas presentes em células epiteliais, endoteliais, natural killers, monócitos, macrófagos, neutrófilos e dendríticas. Os *TLRs* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias pela ativação do fator de transcrição NF- κ B nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*. O objetivo do estudo foi avaliar a associação entre os polimorfismos rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* do sistema imune e as manifestações clínicas da malária causada pelo *P. vivax* em uma população da região amazônica do estado do Pará, Brasil. O estudo foi constituído por amostras de 148 indivíduos infectados por *P. vivax*. Os participantes da pesquisa foram diagnosticados pela técnica de microscopia em lâmina com esfregaço de sangue, sendo estimados os níveis de parasitemia e gametocitemia. Os sintomas clínicos dos indivíduos foram avaliados pelos médicos e registrados. Amostras de DNA dos pacientes foram genotipadas por discriminação alélica através por sondas TaqMan™ em um termociclador de PCR em tempo real Applied Biosystems StepOne™. Os indivíduos foram genotipados por um conjunto validado de 48 marcadores moleculares informativos de ancestralidade para controle genômico nas análises estatísticas. O pacote estatístico SPSS 21.0 para Windows® foi utilizado para as análises estatísticas. A significância estatística foi definida como um valor p bicaudal < 0,05. Uma análise de componentes principais foi realizada para agrupar os sintomas dos pacientes em um índice clínico de gravidade. Os genótipos dos *TLRs* foram analisados quanto à associação, aos níveis de parasitemia e gametocitemia, e ao índice clínico, em Modelos lineares

generalizados. A análise considerou o sexo, a idade, as ancestralidades genéticas africana e europeia, o período de exposição, o passado nosológico e a parasitemia como covariáveis. Os indivíduos homozigotos para o alelo T do polimorfismo rs352140 do gene *TLR9* apresentaram o nível médio de parasitemia aumentado em comparação com os portadores do alelo C (TC+CC) ($p = 0,034$). Os homozigotos GG para o SNP rs1927911 no gene *TLR4* apresentaram o maior índice clínico, quando comparado aos portadores do alelo A ($p = 0,030$). Não foi observada uma associação dos polimorfismos estudados com os níveis de gametocitemia. Os polimorfismos rs352140 do gene *TLR9* e rs1927911 no gene *TLR4* podem ser marcadores moleculares da malária causada por *P. vivax* na população amazônica. Novos estudos replicando nossos resultados são necessários para confirmar o potencial desses marcadores.

Palavras-chave: malária, variabilidade genética, SNPs, Toll Like Receptor, TIR Domain Containing Adaptor Protein.

ABSTRACT

SILVA, M. M. R. I.; SORTICA, V. A. **ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN THE *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, AND *TIRAP* GENES ON THE SEVERITY OF INFECTIONS BY *Plasmodium vivax***. 33f. Dissertation Project (Master's Degree in Health Sciences) - Postgraduate Program in Health Sciences, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, 2024.

Malaria is a widespread infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. The parasite is transmitted to the human host through the bite of a female *Anopheles* mosquito. Malaria caused by *P. vivax* is characterized by mild initial symptoms that begin between 7 and 10 days after vector transmission. The immune response to infection by this pathogen releases pro-inflammatory cytokines during the blood phase of infection in the host. The release of these cytokines at the beginning of the disease is essential for controlling and eliminating the parasite. Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins present in epithelial, endothelial, natural killer, monocyte, macrophage, neutrophil, and dendritic cells. TLRs induce the production of pro-inflammatory cytokines by activating the transcription factor NF- κ B in individuals infected with *P. vivax*. The study aimed to evaluate the association between the rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, and rs8177374 polymorphisms in the *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, and *TIRAP* genes of the immune system and the clinical manifestations of malaria caused by *P. vivax* in a population from the Amazon region of the state of Pará, Brazil. The study consisted of samples from 148 individuals infected with *P. vivax*. The study participants were diagnosed using the blood smear microscopy technique, and the levels of parasitemia and gametocytaemia were estimated. The clinical symptoms of the individuals were assessed by the doctors and recorded. DNA samples from the patients were genotyped by allelic discrimination using TaqMan™ probes in an Applied Biosystems StepOne™ real-time PCR thermal cycler. Individuals were genotyped by a validated set of 48 ancestry-informative molecular markers for genomic control in statistical analyses. The SPSS 21.0 statistical package for Windows® was used for statistical analyses. Statistical significance was defined as a two-tailed p value < 0.05. A principal component analysis was performed to group the patients' symptoms into a clinical severity index. TLR genotypes were analyzed for association with parasitemia levels, gametocytaemia, and clinical index in generalized linear models, considering sex, age, African and European genetic ancestry, exposure period, infections history, and parasitemia as covariates. Individuals homozygous for the T allele of the rs352140

polymorphism of the TLR9 gene had an increased average level of parasitemia compared to those with the C allele (TC+CC) ($p = 0.034$). The GG homozygotes for SNP rs1927911 in the TLR4 gene had the highest clinical index compared to A allele carriers ($p = 0.030$). There was no association between the polymorphisms studied and gametocytaemia levels in individuals with malaria caused by *P. vivax*. The polymorphisms rs352140 in the TLR9 gene and rs1927911 in the TLR4 gene may be molecular markers of malaria caused by *P. vivax* in the Amazonian population. Further studies replicating our results are needed to confirm the potential of these markers.

Keywords: malaria, genetic variability, SNPs, Toll Like Receptor, TIR Domain Containing Adaptor Protein.

LISTA DE FIGURAS

(utilizada apenas na existência de figuras)

Figura 1 – Ciclo de vida <i>Plasmodium spp</i>	13
Figura 2 – Estratificação dos municípios segundo a Incidência Parasitária Anual – Brasil, 2022.....	17
Figura 3 – Série histórica de casos de malária autóctones segundo a espécie parasitária – Brasil, 2003-2022.....	18
Figura 4 – Série de internações por malária de acordo com a região – Brasil, 2003 a 2022.....	19
Figura 5 – Óbitos por malária nas regiões amazônica e extra-amazônica – 2007 a 2022.....	19
Figura 6 - Resposta imune inata à infecção do estágio sanguíneo do <i>Plasmodium spp.</i> (Dunst, et al., 2017).....	21
Figura 7 – Modulação da resposta imune a partir da ativação da cascata de sinalização dos receptores do tipo Toll (<i>TLRs</i>) em resposta as infecções por parasitas da malária (He et al., 2020).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos polimorfismos estudados.....	29
Tabela 2 - Características clínicas dos indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	31
Tabela 3 - Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos localizados nos cromossomos autossomos.....	32
Tabela 4 - Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos localizados no cromossomo X.....	32
Tabela 5 - Níveis de parasitemia de acordo com os genótipos dos <i>TLRs</i> e <i>TIRAP</i>	33
Tabela 6 - Associação entre os níveis de gametocitemia dos pacientes e as variantes genéticas dos <i>TLRs</i> e <i>TIRAP</i>	34
Tabela 7 - Índice clínico de acordo com os genótipos dos genes <i>TLRs</i> e <i>TIRAP</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNCM - O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária

IPA - Incidência Parasitária Anual

IL - Interleucina

TNF α - Fator de necrose tumoral

APRIL - Ligante indutor de proliferação

TLRs - Receptores do tipo Toll

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões

NLRs - Receptores do tipo Nod

RLRs - Receptores do tipo RIG-I

SNPs - Polimorfismos de nucleotídeo único

TIRAP - Receptor Toll-interleucina-1

MyD88 - Fator de diferenciação mieloide 88

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

LPS – Lipopolissacarídeos

TRIF - Do inglês, TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β

Indels - Inserção/deleção

GLM - Modelos lineares gerais

IC - Média geométrica

SUMÁRIO	Pg.
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 Malária e Plasmodium.....	12
1.3 Apresentação Clínica.....	13
1.4 Epidemiologia da Malária.....	14
1.5 Malária no Brasil.....	15
1.6 Resposta imune à Plasmodium sp.....	20
1.7 Receptores do tipo Toll (TLRs: toll-like receptors) e a resposta imune a malária.....	22
1.7.1 Polimorfismos dos receptores do tipo Toll e malária.....	24
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 PROBLEMA.....	26
4 HIPÓTESE.....	27
5 OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo Geral.....	27
5.2 Objetivos Específicos.....	27
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
6.1 Amostra.....	28
6.2 Análises Moleculares.....	29
6.3 Análise Estatística.....	29
7 RESULTADOS.....	30
7.1 Características do grupo de estudo.....	30
7.2 Associação de variantes de <i>TLR</i> com a parasitemia.....	32
7.3 Associação de variantes de <i>TLR</i> com a gametocitemia.....	33
7.4 Associação de variantes de <i>TLR</i> com índice clínico de severidade.....	34
8 DISCUSSÃO.....	36
9 CONCLUSÃO.....	39
10 REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A – Manuscrito à ser submetido à “Genetics and Molecular Biology”.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.2 MALÁRIA e *Plasmodium*

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, amplamente disseminada nos continentes da América, África, Ásia e Oceania. Essa doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que são transmitidos ao hospedeiro pela picada de mosquitos fêmeas infectadas que pertencem à família Culicidae do Gênero *Anopheles* (WHO, 2021).

Em humanos, cinco espécies são responsáveis por essas infecções: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi*. Dessas espécies, o *Plasmodium knowlesi* encontra-se restrito ao Sudeste Asiático, além de infectar humanos, tem como hospedeiro natural outros primatas. O *Plasmodium ovale* é associado a casos importados de malária no Brasil sendo mais comum em determinadas regiões do continente africano (Brasil, 2022a).

O ciclo parasitário inicia com a picada do mosquito no hospedeiro humano. Pela picada, os esporozoítos, que são as formas infectantes do plasmodium que ficam acumulados nas glândulas salivares do mosquito, são injetados diretamente na circulação sanguínea do hospedeiro. Nos minutos seguintes, em geral quinze (15) a quarenta e cinco (45) minutos, os parasitos migram para o fígado e invadem os hepatócitos. No fígado, os esporozoítos podem permanecer inativos como hipnozoítos, o que ocorre frequentemente nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. Entretanto, na maioria das espécies, os esporozoítos se transformam em estruturas arredondadas denominadas criptozoítas e iniciam um ciclo de reprodução assexuada (ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica) gerando milhares de elementos filhos, chamados de merozoítas. A duração da fase de esquizogonia pré-eritrocítica, varia de acordo com as espécies: *P. falciparum* seis dias, *P. vivax* oito dias, *P. ovale* nove dias, *P. malariae* de doze a dezesseis dias. Com o rompimento dos hepatócitos, os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, iniciando o ciclo hemático ou eritrocitário. O ciclo esquizogônico de reprodução assexuada, no sangue, depende da característica de cada espécie, repetindo-se em prazos bastante regulares que coincidem com os ciclos de febre da malária: *P. falciparum* 36 a 48 horas, *P. vivax* e *P. ovale* 48 horas e para o *P. malariae* 72 horas. Posteriormente, alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuadas denominadas gamontes ou gametócitos, que se concentram nos capilares da pele e podem infectar novos mosquitos que se alimentam do sangue do humano infectado. No mosquito, os gametócitos masculinos e femininos se tornam gametas ativos e se fundem, originando o oocineto. Esse oocineto migra

para a parede intestinal, onde se transforma em oocisto. Durante esse processo, ocorre a esporogonia, resultando na formação de esporozoítos através de divisões meióticas. Esses esporozoítos são liberados na hemolinfa do inseto e migram para a glândula salivar do mosquito. Quando o oocisto se rompe, os esporozoítos podem ser inoculados em um novo hospedeiro (Figura 01) (Revisões em Rey, 2008, Winzeler, 2008; Phillips et al. 2017).

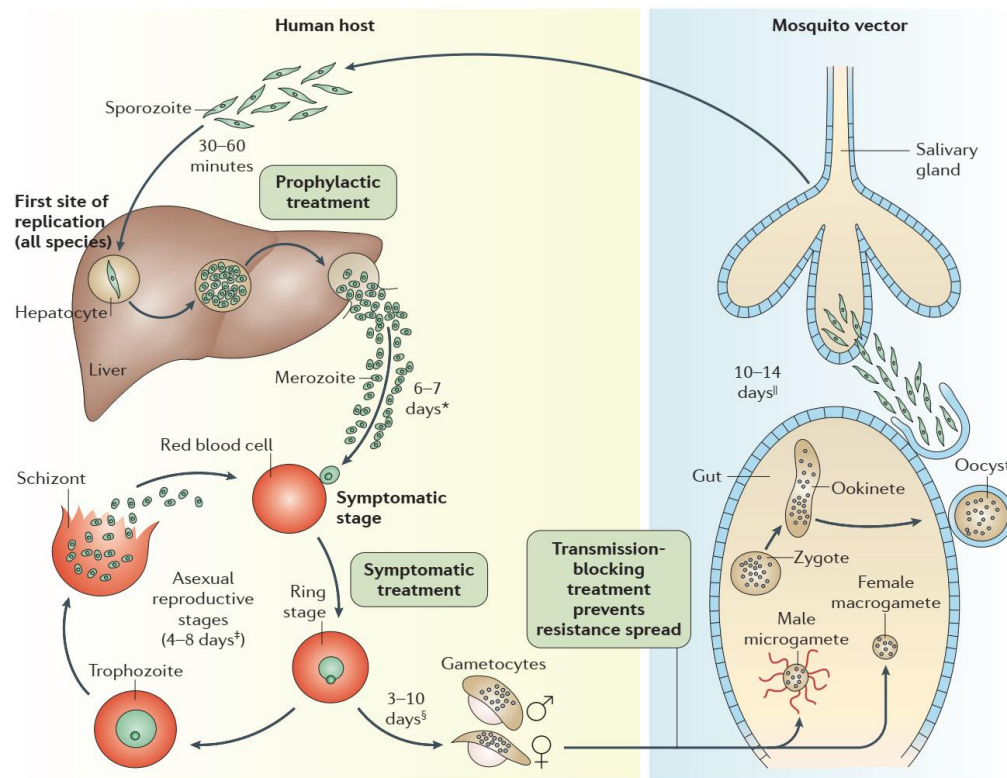


Figura 1- Ciclo de vida *Plasmodium* spp. (Phillips et al. 2017).

1.3 Apresentação clínica

Após ser infectado com esporozoítos, o paciente pode ficar assintomático por aproximadamente uma semana ou apresentar sintomas leves, irregulares e não característicos. Posteriormente, quando começa a fase eritrocitária, os indivíduos começam a apresentar os sintomas mais característicos da malária como a anemia, esplenomegalia, febre alta, calafrios e sudorese (paroxismo). Outros sintomas como dores pelo corpo (mialgias, artralgias, lombalgias) anorexia, icterícia, náusea, vômitos, diarreia e cefaleia são comuns no curso da doença. A apresentação dos sintomas e a gravidade da doença variariam dependendo da espécie de plasmódio, da imunidade prévia do hospedeiro aos parasitas, da idade e do estado de saúde do paciente (Anstey et al., 2024).

Ao contrário do *P. falciparum*, que invade os eritrócitos e a parasitemia pode exceder 20-30%, o *P. vivax* apresenta uma especificidade exclusiva para invadir os reticulócitos. Essa característica do *P. vivax* resulta numa biomassa parasitária mais baixa, raramente excedendo 2-3% de parasitemia, mesmo perante infecções que causam doenças graves. Apesar de ter um limiar pirogênico mais baixo do que o *P. falciparum*, a produção de citocinas, a ativação endotelial e as respostas inflamatórias pulmonares são mais elevadas na infecção por *P. vivax* do que na infecção por *P. falciparum*. Acredita-se que a razão para este fenômeno acontecer é teor mais elevado de GC do genoma do *P. vivax*, aproximadamente duas vezes superior ao do *P. falciparum*, e, por conseguinte, um teor mais elevado de motivos CpG estimuladores do receptor do tipo Toll 9 (Dayananda et al., 2018).

As infecções por *P. vivax*, podem apresentar casos severos e fatais tão frequentes quanto os causados por *P. falciparum* em algumas regiões, com complicações como a ruptura do baço, convulsões, icterícia, problemas renais, anemia severa, coma e síndrome de dificuldade respiratória (Pyo et al., 2022; Anstey et al., 2024). Várias condições clínicas observadas na malária por *P. vivax* devem-se a um desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, que são mais pronunciadas que nas infecções por *P. falciparum*. Demonstrou-se que as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ estão diretamente relacionadas com a gravidade da doença, ao passo que as concentrações plasmáticas de IL-10 se mostraram inversamente relacionadas com a gravidade da doença. Além disso, a concentração plasmática de superóxido dismutase, uma enzima produzida durante o stress oxidativo, também foi associada à gravidade da doença causada por *P. vivax* (Dayananda et al., 2018; Pyo et al., 2022; Anstey et al., 2024).

1.4 Epidemiologia da Malária

A malária é considerada um grave problema de saúde pública, uma vez que esta é evitável e tratável. Todavia, apesar das iniciativas internacionais para o combate e a erradicação dessa doença, existe novamente uma tendência de aumento dos casos dessa doença a partir do ano de 2020. Um agravante para o controle dessa doença é a possível subnotificação de casos nos países acometidos pela malária em decorrência da sobrecarga dos sistemas de vigilância em saúde em decorrência da pandemia de COVID-19 que iniciou no ano de 2020 (WHO, 2022). Estima-se que dois terços das mortes descritas no World Malaria Report de 2021, estão relacionadas a pandemia de COVID-19 que causou a interrupção de serviços de saúde, inerentes

à prevenção, diagnóstico e tratamento da malária (WHO, 2021). Esses dados representam a sobrecarga e a fragilidade dos sistemas de saúde de diversos países desafiados pela pandemia de COVID-19, tendo como consequência maiores dificuldades para o enfrentamento de muitas doenças crônicas e infecciosas, incluindo a malária. Em decorrência da pandemia, foram relatados o aumento da pobreza, a subnutrição e a instabilidade social no continente africano, tendo implicações importantes no combate à malária (Smith et al., 2020; Monroe et al., 2022).

Mundialmente, no ano de 2019, no período pré-pandêmico, houve um registro de 233 milhões de casos de malária, enquanto no ano de 2022 foi observado um aumento para 249 milhões de casos (WHO, 2023). Ao compararmos os dados de notificação obtidos entre os anos 2019 e 2020, observa-se aumento em cerca de 12% em relação ao ano de 2019. No ano de 2020, ocorreram 241 milhões de casos de malária e 627.000 mortes em 85 países. Em 2021, foram registradas 610.000 mortes por malária e cerca de 244 milhões de casos, enquanto em 2022 houve o número estimado de 608.000 mortes em um total de 249 milhões de casos (WHO, 2023).

Nas infecções em humanos, o *P. falciparum* apresenta a maior taxa de mortalidade, possuindo uma alta incidência no continente Africano (WHO, 2023). No ano de 2021, observou-se que 95% de todos os casos de malária e 96% das mortes ocorreram na região africana, sendo que dois terços das mortes acometeram crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2020; WHO, 2022).

Nas Américas, nos anos de 2015 e 2021 foram observados 482.000 e 520.000 novos casos respectivamente, dos quais, 74% foram ocasionados por *P. vivax*, e 26% foram causados por *P. falciparum*. (WHO 2021)

Muitos desafios ainda são encontrados globalmente para o combate e a erradicação da malária como: a vulnerabilidade dos sistemas de vigilância e de saúde, os custeios insuficientes entre os diferentes países, as múltiplas doenças infecciosas endêmicas e as coinfeções, resistência aos fármacos antimaláricos e o uso de inseticidas que causam resistência dos mosquitos vetores (Smith et al., 2020; WHO, 2021).

1.5 Malária no Brasil

No Brasil, a malária ocorre pela infecção dos protozoários *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*, e as primeiras descrições de casos autóctones dessa infecção datam do século XVI, com o início da colonização europeia (Costa, 2009; Brasil, 2022a). As infecções por *P. vivax* representaram cerca de 90% dos casos de malária no Brasil, e dos casos notificados no

continente americano, o território brasileiro é responsável por um terço (Costa, 2009; Brasil, 2022a). Cerca de 99,9% da transmissão da malária no Brasil ocorre na região amazônica, com 33 municípios concentrando 80,0% do total de casos autóctones de malária em 2021.

Essas infecções concentram-se nos municípios da Amazônia Legal, que compreendem os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, entretanto, os casos extra-amazônicos vêm aumentando nos últimos anos (Costa, 2009; Brasil, 2021; Brasil, 2022b).

Entre janeiro de 2020 a junho de 2021 ocorreram 462 novos casos na região extra-amazônica. Nesse período, do total de 4.762 municípios da região extra-amazônica, 33 registraram pelo menos um caso autóctone de malária e 138 notificaram pelo menos 1 caso de malária, sendo ele autóctone ou importado (Brasil, 2021).

Considerando o período entre os anos de 2015 e 2021, o estado da Bahia foi o que apresentou mais casos notificados de malária na região extra-amazônica, com um total de 156 casos (cerca de 28,4% do total). Dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde de 2021, mostram que dos 81 casos importados da região extra-amazônica, São Paulo registrou 19 (23,5%) casos, sendo este o estado que mais recebeu casos importados de outros estados, seguido da Bahia com 17 casos notificados, enquanto Pernambuco notificou 7 casos de malária (Neto et al., 2022; Brasil 2021, Brasil, 2022b). O aumento na incidência fortalece a necessidade de medidas preventivas para que o diagnóstico não se torne tardio e dificulte o tratamento nessas regiões (Costa, 2009; Brasil, 2021; Brasil, 2022b).

O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) utiliza a Incidência Parasitária Anual (IPA) de malária para estimar o risco de adoecer por malária em cada município. Os municípios do Brasil são classificados em: muito baixo risco (IPA for de <1 caso/1.000 habitantes), baixo risco (IPA entre 1 e <10 casos/1.000 habitantes), médio risco (IPA entre 10 e <50 casos/1.000 habitantes), e alto risco (IPA de ≥ 50 casos/1.000 habitantes); considerando que este indicador considera apenas novos casos, excluindo recaídas e recrudescências (Brasil, 2022b).

Em 2022, na região amazônica, dos 808 municípios, 159 (19,7%) apresentaram muito baixo risco para transmissão de malária, seguidos por 51 municípios com baixo risco (6,3%), 40 (5,0%) com médio risco e outros 26 (3,2%) com alto risco. Os demais 532 (65,8%) municípios não registraram transmissão autóctone de malária (Figura 2).

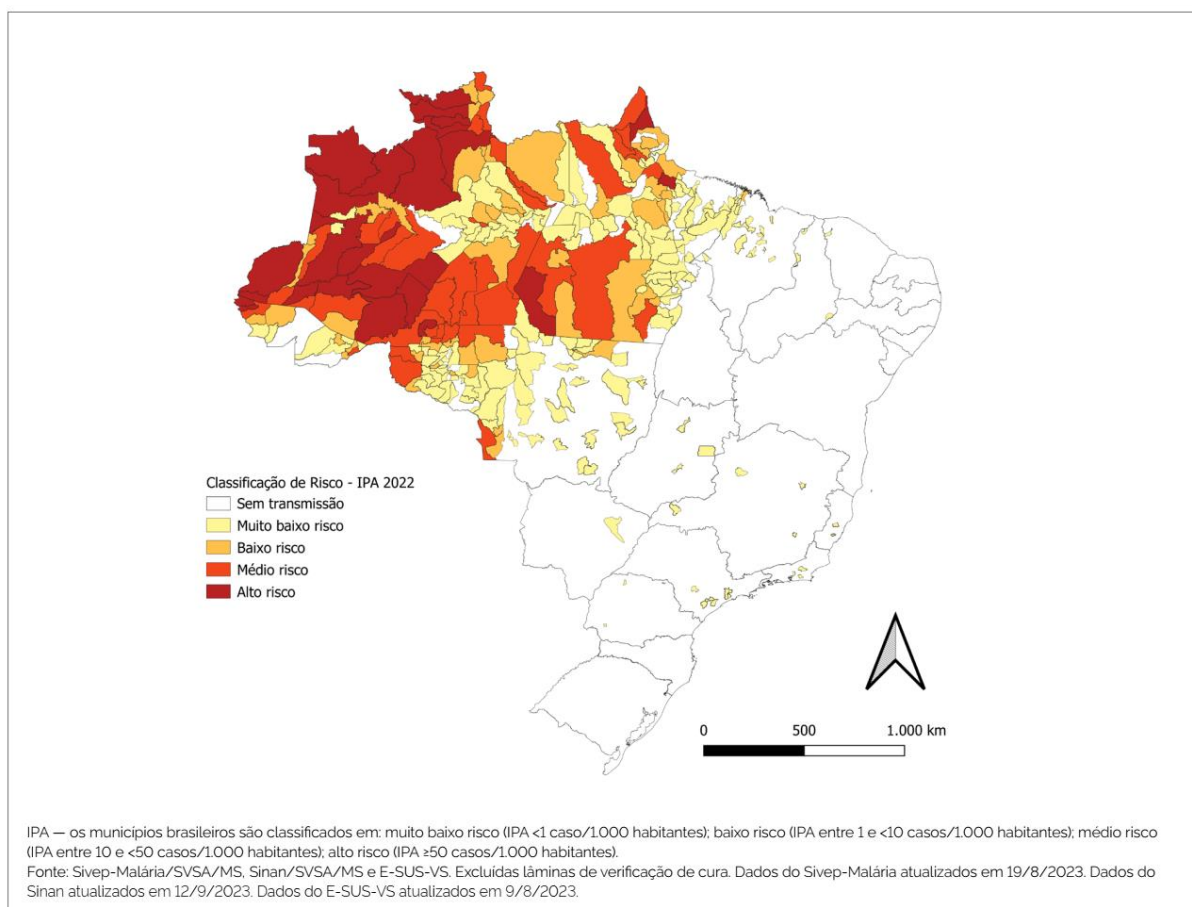


Figura 2- Estratificação dos municípios segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA) – Brasil, 2022 (Brasil, 2024)

No ano de 2022 foram registrados 131.224 casos de malária no Brasil, em comparação com 140.488 casos no ano de 2021, com 145.205 casos o ano de 2020, e 157.475 casos em 2019. Entre os últimos anos, observa-se uma redução do número de casos no país: 6,6% entre 2022 e 2021; 3,2% entre 2021 e 2020; e 7,8 entre 2020 e 2019 (Figura 03) (Brasil, 2021; Brasil, 2024).

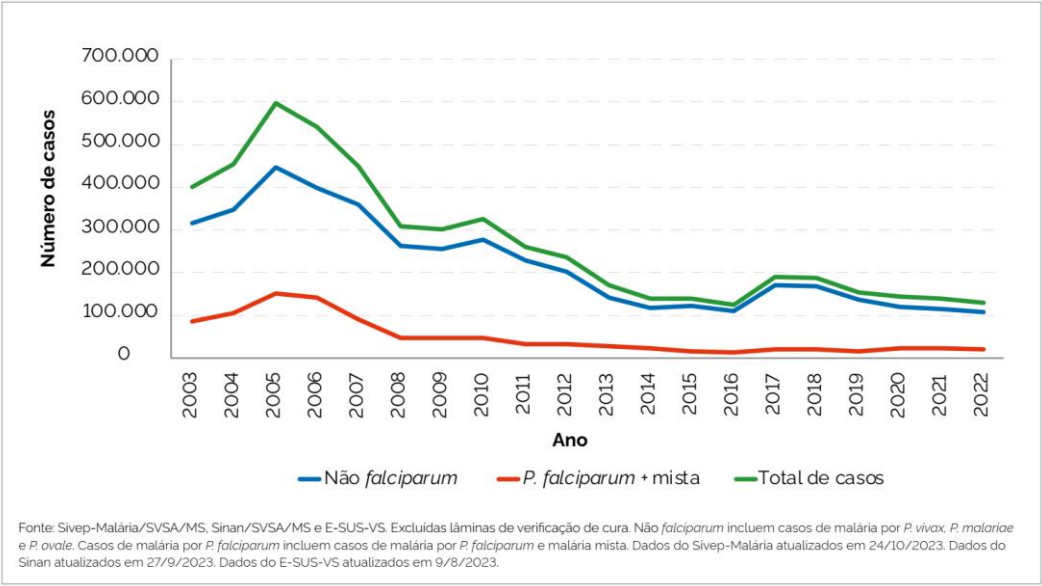


Figura 3 - Série histórica de casos de malária autóctones segundo a espécie parasitária – Brasil, 2003-2022 (Brasil, 2024).

Dos casos de malária notificados em 2022, os casos autóctones (transmissão dentro do país) representaram 98,3% dos casos, e os casos importados representaram apenas 1,7% (2.256 casos) das notificações, sendo importados principalmente do Peru, Guiana, Venezuela e Bolívia. Dos casos autóctones nesse ano, 84,2% (108.594) foram causados por *P. vivax*, 13,9% (17.981 casos) por *P. falciparum*, 1,8% (2.344 casos) por infecções mistas e <0,1% (38 casos) de *P. malariae* (Brasil, 2024).

Apesar da queda no número de casos, houve um aumento de 18,1% nas internações por malária no ano de 2022 (2.114) em relação ao ano de 2021 (1.790). O aumento nos últimos anos tem ocorrido tanto na região amazônica quanto na região extra-amazônica segundo o boletim epidemiológico mais recente do Ministério da Saúde (Figura 4) (Brasil 2024).

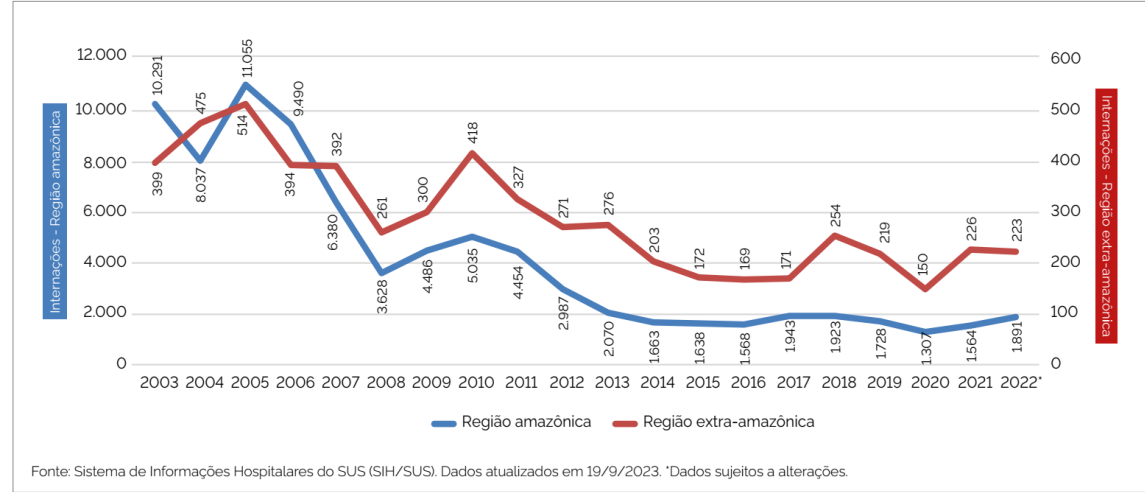


Figura 4 - Série de internações por malária de acordo com a região – Brasil, 2003 a 2022 (Brasil, 2024).

Após uma série de reduções nos óbitos por malária, observa-se uma tendência de crescimento nesses óbitos a partir de 2020 (Figura 5).

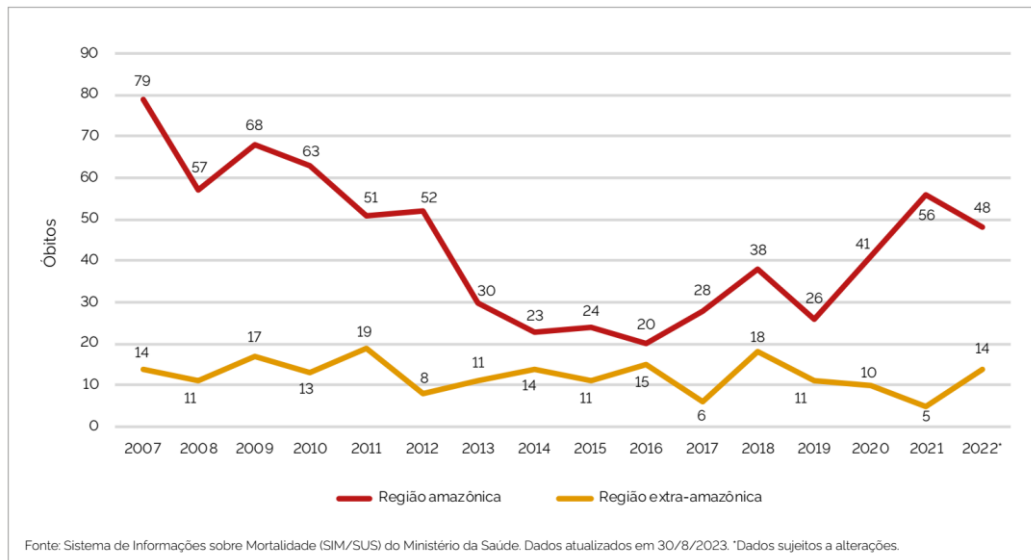


Figura 5 - Óbitos por malária nas regiões amazônica e extra-amazônica – 2007 a 2022 (Brasil 2024).

Em 2020 foram registrados 51 óbitos por malária, o que representou um aumento de 37,8% em relação a 2019. Os anos de 2021 e 2022 registraram 61 e 62 óbitos respectivamente, representando aumentos de 19,6% e 1,6% comparados aos anos anteriores. O aumento no número de óbitos na região amazônica foi de 36,6% em 2021 em comparação ao ano de 2020 e de 180% na região extra-amazônica no ano de 2022 em comparação ao ano de 2021 (Brasil, 2024).

A ocorrência de óbitos pela doença, no Brasil, está fortemente associada ao atraso no diagnóstico e no tratamento da doença. Na região extra-amazônica, o que se observa é a demora na suspeição por malária, devido à baixa prevalência da doença nessa região. Essas condições foram agravadas a partir da pandemia de COVI-19 que sobrecarregou o sistema de vigilância e saúde do país, e dificultou o atendimento médico no sistema público de saúde. O aumento de óbitos observado a partir de 2020 é reflexo direto desses fatores (Brasil, 2021; Brasil, 2024).

1.6 Resposta imune à *Plasmodium* sp.

A malária causada por *P. vivax*, por um longo período, foi relacionada com casos leves quanto a sua gravidade em comparação com a malária causada por *P. falciparum*, porém no Sudeste Asiático e na América do Sul, a doença emergiu de tal maneira, que se tornou potencialmente grave e negligenciada, sendo responsável por índices elevados de adoecimento e mortalidade nessas regiões (Recht et al., 2017). A malária causada por *P. vivax*, é caracterizada por sintomas iniciais brandos que aparecem após o início da picada do mosquito em um período entre 07 e 10 dias. Esse *Plasmodium* pode apresentar formas hipnozoítas, que ficam latentes e podem reincidir se não forem tratados da maneira adequada, uma vez que anos após a infecção inicial pode emergir do fígado. (Phillips et al., 2017).

O *P. vivax*, de maneira predominante, invade os reticulócitos que são menos abundantes comparados aos eritrócitos. O *P. falciparum* apresenta a capacidade de replicar e invadir tanto os reticulócitos quanto os eritrócitos (Phillips et al., 2017). Contudo, nos processos envolvidos na resposta imune da malária, o que comumente ocorre é o sistema imune liberando citocinas pró-inflamatórias em resposta à ação do parasita, durante a infecção na fase sanguínea do hospedeiro. A presença dessas citocinas é essencial para conter o parasita em sua proliferação e posteriormente sua eliminação. A regulação entre citocinas pró e anti-inflamatórias mantém o sistema imune em equilíbrio (Ramírez et al., 2023).

As citocinas são proteínas imunomoduladoras produzidas por diferentes células do sistema imune e desempenham diversas funções biológicas. Uma complexa rede de interações entre as citocinas e as células de defesa do organismo representa o cerne de uma resposta imunológica efetiva contra as infecções. Variantes alélicas nos genes relacionados com a regulação, expressão e função das citocinas têm sido objeto de estudos relacionados à suscetibilidade de diversas doenças infecciosas (Kariuki e Williams, 2020).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias, no início da doença é imprescindível para que o parasita seja eliminado. Entretanto uma resposta inflamatória descontrolada e exacerbada, entre outros fatores, pode desencadear as formas mais graves da malária (Ramirez et al., 2022). Todavia, os níveis de produção de citocinas circulantes pró e anti-inflamatórias em indivíduos assintomáticos infectados por *P. vivax* não aumentam significativamente, não sendo observado a presença de uma tempestade de citocinas, que pode ser observada em casos severos dessa infecção (Antonelli et al., 2020).

No plasma ou soro de pacientes sintomáticos infectados por *P. vivax*, diferentes estudos citam a presença de níveis elevados de citocinas pró inflamatória, como a interleucina (IL)-8,

IL-1 β , IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF α), assim como o ligante indutor de proliferação (APRIL). Todavia, a citocina anti-inflamatória IL-10 também é expressa em níveis extremamente altos (Antonelli et al., 2020). Portanto, tanto a patologia da infecção quanto o seu progresso, são influenciados pelo tempo e a intensidade entre as respostas pró e anti-inflamatórias, que são mediadas por citocinas e a autorregulação do sistema imune (Ramírez et. al, 2023).

O controle da parasitemia e das manifestações clínicas da doença podem ser influenciadas por alterações na produção dessas citocinas. Os receptores do tipo Toll (*TLRs*: toll-like receptors) são proteínas transmembranas presentes em células epiteliais, endoteliais, natural killers, monócitos, macrófagos, neutrófilos e dendríticas, com o a capacidade de reconhecer proteínas exógenas ao organismo e ativar a cascata de sinalização do sistema imune inato. Ou seja, esses receptores celulares são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos, podendo detectar ligantes de *Plasmodium* e ativar as células apresentadoras de antígenos, auxiliando a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, interferons e quimiocinas (Ramirez et al., 2022; Ramirez et al., 2023) (Figura 6). Estudos demonstram que a expressão de citocinas sofre impactos importantes através da influência de polimorfismos nos genes dos *TLRs* na malária causada por *P. vivax*. Foram observadas variações nos níveis de citocinas, alteração na suscetibilidade e nas manifestações clinicas leves e graves dessas infecções (Costa et al., 2017; Penha, 2019; Ramírez et al., 2023).

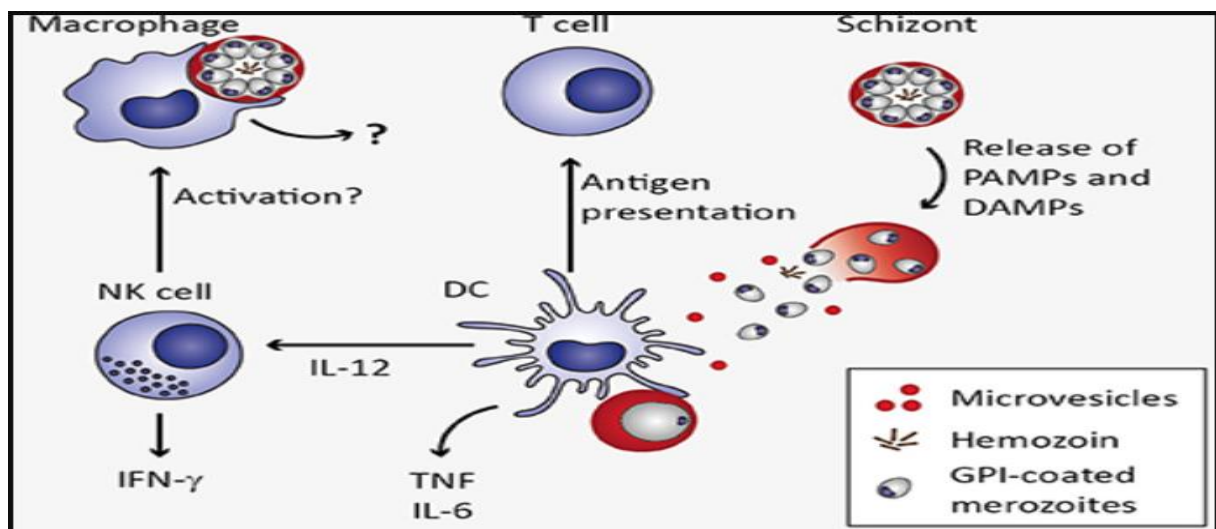


Figura 6 – Resposta imune inata à infecção do estágio sanguíneo do *Plasmodium* spp. (Dunst, et al., 2017). Os macrófagos, bem como as células dendríticas (DC), removem os eritrócitos infectados da circulação por fagocitose. Nos macrófagos, a absorção de eritrócitos infectados pode levar à secreção de diferentes citocinas como IL-12, (TNF) e IL-6. A IL-12 derivada de

DC pode ativar células natural killer (NK), que por sua vez segregam interferon γ (IFN- γ) ativando novos macrófagos.

1.7 Receptores do tipo Toll (*TLRs*: toll-like receptors) e a resposta imune a malária

Os *TLRs* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias pela ativação do fator de transcrição NF- κ B, realizando a ponte entre a imunidade inata e adaptativa. O estudo de receptores celulares como os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os *TLRs*, os receptores do tipo Nod (NLRs), os receptores do tipo RIG-I (RLRs) e os receptores scavenger vem contribuindo para a compreensão da interação entre patógeno e hospedeiro de algumas doenças infecciosas (Costa et al., 2017). Variantes genéticas podem impactar a expressão desses receptores e/ ou a sua capacidade de ligação alterando a sua função e a regulação da resposta a diferentes patógenos.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de alguns *TLRs* e da proteína adaptadora que contém o domínio do receptor Toll-interleucina-1 (*TIRAP*), estão sendo relacionados à suscetibilidade e gravidade da malária (Costa et al., 2017).

A proteína adaptadora que contém o domínio do receptor Toll-interleucina-1 (*TIRAP*) representa uma molécula de sinalização intracelular fundamental que regula diversas respostas imunes. A sua capacidade de funcionar como molécula adaptadora tem sido amplamente investigada em relação à sinalização imune inata mediada por receptores do tipo Toll (*TLR*). Estudos iniciais concentraram-se principalmente no *TIRAP* como proteína adaptadora que associa o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) aos *TLR*, para ativar a sinalização dos *TLRs* dependente de MyD88. Estudos subsequentes delinearam o papel do *TIRAP* como transdutor de eventos de sinalização através da sua interação com mediadores de sinalização não-*TLR*. De fato, a capacidade do *TIRAP* para interagir com uma série de mediadores de sinalização intracelular sugere o seu papel central em várias respostas imunes (Rajpoot et al., 2021).

Os *TLRs* 1, 2, 4, 5 e 6. reconhecem diferentes Padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs no ambiente extracelular, pois são expressos na membrana plasmática das células. Os *TLRs* 4 e 2 reconhecem lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano e o ácido lipoteicóico, induzindo a resposta imune inata contra bactérias (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019). Os *TLRs* 3, 7, 8 e 9 detectam ácidos nucleicos microbianos diferentes, por se expressarem principalmente dentro das células, no retículo endoplasmático e nas membranas endossômicas. O RNA de fita simples, se liga ao *TLR7* e *TLR8*, enquanto os RNA de fita dupla se ligam ao *TLR3*, e o *TLR9*

Figura 7 – Modulação da resposta imune a partir da ativação da cascata de sinalização dos receptores do tipo Toll (*TLRs*) em resposta as infecções por parasitas da malária (He et al., 2020). Os padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (PAMPs) dos parasitas, como o DNA e o RNA, são reconhecidos por receptores do tipo Toll (*TLRs*) na membrana dos endossomas, incluindo *TLR7*, *TLR9* e possivelmente *TLR8*, e ativam a cascata de sinalização MYD88-TRAF6-IRF7 para estimular a produção de IFN-Is.

1.7.1 Polimorfismos dos receptores do tipo Toll e malária

Estudos demonstram que o polimorfismo rs817737 do gene *TIRAP*, desempenha um papel importante na suscetibilidade da malária (Rani et al., 2017, Rani et al., 2023). Indivíduos homozigotos CC apresentaram um risco diminuído para a infecção por *P. vivax* (OR = 0,426; 95% CI = 0,2:0,6) e os heterozigotos demonstraram um risco aumentado para essas infecções (OR = 3,616, 95% CI = 2,219:5,894) em uma população do Paquistão (Rani et al., 2017). Esse polimorfismo também está associado à modulação dos níveis de TNF- α , INF- γ e IL-10 na malária leve e severa causada por *P. vivax* e *P. falciparum* na mesma população (Rani et al., 2023). Entretanto, em estudos realizados nas populações do Burundi e da população Amazônica, o polimorfismo rs8177374 no gene *TIRAP* não foi associado com a suscetibilidade ou gravidade da malária causada pelos *P. falciparum* e *P. vivax* (Esposito et al., 2012).

Estudos também demonstraram que polimorfismos nos genes dos *TLRs* estão associados aos níveis de citocinas, suscetibilidade, severidade e parasitemia da malária em diferentes populações. Em uma população do sudeste da Ásia (Mianmar e Tailândia), foi observado que os portadores do alelo T do polimorfismo rs5743551 do gene *TLR1* apresentaram níveis mais elevados de parasitemia quando infectados por *P. falciparum* (Hahn et al., 2016). Entretanto, esse polimorfismo não foi associado à infecção por *P. Vivax* em uma população amazônica (Costa et al., 2017).

Em uma população de Gana, foi demonstrado que haplótipos do *TLR4* estão associados à modulação dos níveis de IL-10 em pacientes com malária, entretanto esses haplótipos não foram associados a mortalidade por malária (May et al., 2010). Em um coorte realizado em Moçambique os SNPs rs4986790 e rs5030719 do *TLR4* foram associados a incidência de casos clínicos primários de malária (Ariff et al., 2023). Outro estudo demonstrou que o polimorfismo rs4986790 do *TLR4* está associado à susceptibilidade à malária causada por *P. vivax* em uma população do Paquistão. Os homozigotos AA apresentaram um menor risco para a infecção (OR = 0,5, 95%; CI = 0,285:0,876) (Rani et al., 2018). Entretanto, polimorfismos nesse gene

não foram associados a suscetibilidade à malária em uma população brasileira do Amazonas (Soares et al., 2008). Um estudo recente demonstrou que o polimorfismo A299G do gene *TLR4* está associado aos níveis de parasitemia em uma população amazônica da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa (Ramírez et al., 2023).

Em um estudo realizado na população amazônica do Brasil, com uma amostra de 137 pacientes infectados por *P. vivax*, foi observado que os indivíduos com os genótipos AG (*TLR4* A299G), CC (*TLR6* S249P) e TT (*TLR9* -1486CT) produzem, em média, níveis menores de IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 comparados aos portadores dos outros genótipos (Costa et al., (2018). Na mesma população, os genótipos CT do *TLR5* (R392StopCodon) e TT do *TLR9* (-1486CT) foram associados à suscetibilidade das infecções por *P. vivax* e o genótipo CC do *TLR9* (-1237C/T) com os níveis aumentados de parasitemia nessas infecções (Costa et al., 2017). Em outra população brasileira, vivendo em uma região de mata atlântica do estado de São Paulo, foi observado que polimorfismos do gene *TLR9* foram associados à suscetibilidade da malária por *P. vivax* (Guimarães et al., 2018).

Estudos de meta-análise reforçaram que polimorfismos dos genes *TLR2*, *TLR6* e *TLR9* estão associados a severidade da malária e polimorfismos dos genes *TLR1*, *TLR9* e *TLR4* estão associados a parasitemia da malária, considerando diferentes populações, e espécies de *Plasmodium* (Dhangadamajhi et al., 2017; Ramirez, 2022; Naing, Wong, Aung, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, os estudos de suscetibilidade à malária realizados demonstram resultados divergentes dependendo da região geográfica e da espécie endêmica do parasita, refletindo a possível influência tanto da composição genética nas diferentes populações quanto das diferentes características das infecções. Estudos realizados em grupos étnicos distintos que compartilham o mesmo ambiente no continente africano, demonstram que as frequências alélicas de genes do sistema imune são influenciadas pela estruturação dessa população, portanto a importância desses alelos na suscetibilidade à malária pode ser distinta nos diferentes grupos étnicos (Eid et al., 2011; Israelsson et al., 2011).

A população brasileira foi formada a partir de três grupos ancestrais principais, os ameríndios, os europeus e os africanos, e, atualmente, apresenta diferentes graus de miscigenação nas populações que habitam diferentes regiões do país, decorrente da história de ocupação destas regiões (Pena et al., 2009; Santos et al., 2010; Pena et al., 2011). Portanto, os estudos realizados na população amazônica têm demonstrado alguns resultados divergentes sobre a importância das variantes genéticas nos genes dos *TLRs* e do *TIRAP* em comparação a outras populações mundiais. Polimorfismos nos genes nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* podem modular a intensidade da resposta imune inflamatória e influenciar as manifestações clínicas da malária. O Brasil compreende a maioria dos casos de malária causada por *P. vivax* do continente americano, portanto estudar variantes genéticas dos *TLRs* nessa população, considerando a estruturação populacional nas análises, pode auxiliar na compreensão da patofisiologia dessa doença e na busca de estratégias de diagnóstico e prevenção dessa doença.

3. PROBLEMA

Os polimorfismos rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* do sistema imune estão associadas às manifestações clínicas da malária causada por *P. vivax* em uma população da região amazônica do Brasil?

4. HIPÓTESE

Os receptores do tipo Toll (*TLRs*: toll-like receptors) são proteínas transmembranas responsáveis pelo reconhecimento de proteínas exógenas ao organismo e ativação de cascatas de sinalização do sistema imune inato. Os polimorfismos nos genes dos receptores *TLRs* podem alterar a função dessas proteínas. Essas alterações podem influenciar a resposta imune à malária. Dessa forma, acredita-se que esses polimorfismos possam estar associados com manifestações clínicas mais severas durante o curso da malária e possam servir de marcadores moleculares para o prognóstico da doença.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar se os polimorfismos rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* do sistema imune estão associadas às manifestações clínicas da malária causada por *P. vivax* em uma população da região amazônica do Brasil.

5.2 Objetivos Específicos

- 1) Investigar a associação dos polimorfismos rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 com o nível de parasitemia dos pacientes sintomáticos diagnosticados com malária causada por *P. vivax*.
- 2) Verificar a associação dos mesmos polimorfismos com os níveis de gametocitemia nesses pacientes.
- 3) Identificar se os polimorfismos estão associados com a gravidade dos sintomas apresentados pelos pacientes com malária causada por *P. vivax*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Amostra

O estudo foi constituído por amostras coletadas na região amazônica de 148 indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*, oriunda do estado do Pará (Sortica et al., 2012; Sortica et al., 2013).

Os critérios para inclusão no estudo foram indivíduos nascidos no estado do Pará, diagnosticados com a infecção por *P. vivax*, com malária sintomática não complicada. Foram excluídos da amostra pacientes diagnosticados com *P. falciparum* ou infecções mistas, pacientes com co-infecções, ou tratados com fármacos que pudessem explicar ou minimizar os sintomas dos pacientes quando avaliados.

Os pacientes foram diagnosticados pela técnica de microscopia em lâmina com esfregaço de sangue e os níveis de parasitemia e gametocitemia foram estimados (Brasil, 2022a).

Os pacientes sintomáticos não apresentaram complicações e foram considerados pacientes com malária não complicada. Os pacientes foram avaliados por médicos especialistas e os seus sintomas avaliados e registrados em seus prontuários como escores numéricos de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (severo) e 4 (muito severo). Os pacientes apresentaram sintomas como: febre, calafrio, cefaleia, artralgia, lombalgia, astenia, mialgia, tonteira, zumbidos, surdez, insônia, náuseas, vômitos, dor abdominal, eructação, flatos, diarreia, colúria, oligúria, anúria, palidez, icterícia, prurido, alergia, tosse, dispneia, anorexia, esplenomegalia, hepatomegalia. Os sintomas mais comuns na malária não complicada são febre náuseas, vômitos, astenia, fadiga e anorexia que pode acontecer vários dias antes dos paroxismos da doença e os episódios agudos de calafrio, febre e sudorese, com temperatura igual ou superior a 40 C° e tendo duração variável de até 12 horas (Brasil, 2022a).

Todos os pacientes receberam o tratamento gratuito recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2022a) de 1500 mg de cloroquina associado a 210 mg de primaquina em sete dias.

Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram um formulário de consentimento informado e permitiram a coleta de sangue para análises moleculares.

Esse projeto foi aprovado pelos comitês de ética do Instituto Evandro Chagas (CEP/IEC-0035) e da Universidade Federal do Pará (061/07 CEP-CCS/UFGA).

6.2 Análises moleculares

As amostras de DNA dos pacientes foram genotipadas por discriminação alélica através da técnica de PCR em tempo real para polimorfismos rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 relacionados à modulação de expressão nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* anteriormente estudados na resposta imune a infecções em diferentes populações continentais. As genotipagens foram realizadas por conjuntos de genotipagem TaqMan® SNP da Applied Biosystem validados (Tabela 1). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Os indivíduos foram genotipados por um conjunto validado de 48 marcadores moleculares informativos de ancestralidade. A genotipagem desses marcadores bi-alélicos do tipo inserção/deleção (indels) foi realizada por três reações multiplex como descrita anteriormente (Sortica et al., 2012). Essas informações serão utilizadas para realizar o controle genômico de ancestralidade nas análises estatísticas.

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos estudados

Gene	db SNP id	Posição (GRCh38)	Alelos	Ensaio	Consequência
<i>TLR1</i>	rs4833095	chr04:38798089	C>T	C__44103606_10	sentido trocado
<i>TLR4</i>	rs1927911	chr09:117707776	A>G	C__11722141_10	íntron
<i>TLR7</i>	rs179008	chrX:12885540	A>T	C__2259574_10	sentido trocado
<i>TLR8</i>	rs3764880	chrX:12906707	A>G	C__2183830_10	5 Prime UTR
<i>TLR9</i>	rs352140	chr03:52222681	C>T	C__2301954_20	sinônima
<i>TIRAP</i>	rs8177374	chr11:126292948	C>T	C__25983622_10	sentido trocado

6.3 Análises Estatísticas:

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos investigados foram estimadas por contagem direta, e o desvio dessas frequências do equilíbrio de Hard-Weinberg foi investigado pelo teste do Qui-quadrado. Uma análise de componentes principais foi realizada para agrupar os sintomas apresentados pelos pacientes no momento do diagnóstico e avaliados em escores numéricos de 0 a 4 (ausente, leve, moderado, severo e muito severo, respectivamente). Dessa forma, foi possível agrupar os sintomas mais representativos da população estudada em um índice clínico de severidade. Os genótipos dos *TLRs* foram

analisados quanto a associação aos níveis de parasitemia, gametocitemia e ao índice clínico através de Modelos lineares gerais (GLM). Os níveis de Parasitemia e gametocitemia foram transformados em uma escala logarítmica por não possuírem uma distribuição normal, entretanto os valores transformados novamente para escala normal são apresentados nos resultados como médias geométricas. Nos GLMs, as covariáveis sexo, idade, ancestralidades genéticas africana e europeia, período de exposição e passado nosológico foram incluídas por terem associações descritas na literatura com a malária, ou estarem correlacionadas com os níveis de parasitemia ou gametocitemia, diminuindo o viés de confusão da análise.

O pacote estatístico SPSS 21.0 para Windows® foi utilizado para as análises estatísticas. A significância estatística foi definida como um valor p bicaudal $< 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Características do grupo de estudo

As características clínicas dos participantes do estudo estão descritas na Tabela 2. Os indivíduos apresentaram idades entre 12 e 88 anos com mediana igual a 32 anos. O sexo masculino foi predominante no estudo com 66,2%. O grupo estudado apresentou uma ancestralidade genética média na proporção de 22,8% de ancestralidade Africana, 41,0% ancestralidade europeia, e 32,4% de ancestralidade nativo americana (Tabela 2). Os resultados estão de acordo com o observados para outros estudos realizados no Brasil (Pena et al., 2009; Pena et al, 2011).

Sobre o período de exposição dos pacientes nessas regiões endêmicas de malária, nota-se uma variabilidade, em que 53,4 % da população permaneceu no local de 1 a 25 dias, 20,3% permaneceram no local por mais de 25 dias e 22,3% eram os residentes do local de infecção (Tabela 2).

Foi observado que 67,6% dos indivíduos foram acometidos por malária pela primeira vez, 11,5% estavam infectados pela segunda vez e 20,3% dos pacientes já tinham sido infectados por mais de duas vezes. Indivíduos apresentaram infecções com níveis parasitemia que variaram de 50 parasitas/ul a 75.000 parasitas/ul no momento do diagnóstico e mediana igual a 5.500 parasitas/ul. As formas sexuais do *P. vivax* foram observadas em apenas 70 indivíduos no momento do diagnóstico com uma variação de 15 gametócitos/ul a 4500 gametócitos/ul com mediana igual a 100 (Tabela 2).

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes foram: febre (83,5%), dor de cabeça (83,3%) e calafrios (80,5%) (tabela 2). Nenhum participante precisou internação durante o tratamento, ou evolui para malária complicada ou severa.

Tabela 2. Características clínicas dos indivíduos infectados por *P. vivax*

Características	N
N	148 (100)
Sexo	
Feminino	50 (33,8)
Masculino	98 (66,2)
Idade	32 (12:88)
Ancestralidade	
Ameríndio	0,320 (0,109:0,695)
Europeu	0,411 (0,199:0,708)
Africano	0,220 (0,094:0,516)
Parasitemia	5.500 (50:75.000)
Gametocitemia	100 (15:4.500)
Dias local infecção	
1 a 25	79 (53,4)
26 ou mais	30 (20,3)
Residentes	33 (22,3)
Sem informação	6 (4,1)
Passado Nosológico	
Primeira infecção	100 (67,6)
Duas infecções	17 (11,5)
Três Infecções	30 (20,3)
Sem informação	1 (0,7)
Sintomas frequentes*	
Febre	123 (83,5)
Cefaleia	122 (83,3)
Calafrio	118 (80,5)
Mialgia	92 (62,8)
Artralgia	100 (68,0)
Lombalgia	109 (74,0)
Dor abdominal	91 (62,0)
Astenia	121 (82,9)
Tonteira	93 (63,0)
Dispneia	45 (30,5)
Tosse	65 (44,0)
Náuseas	76 (51,5)
Vômito	43 (29,0)
Anorexia	27 (18,1)

A idade, os níveis de paracitemia, os níveis de gametocitemia e as ancestralidades genéticas são apresentadas como mediana (mínimo:máximo). O sexo, dias no local da infecção e passado nosológico são apresentados como contagem direta (frequência relativa em %). *Os indivíduos podem apresentar mais do que um sintoma descrito.

As frequências alélicas e genotípicas dos 148 indivíduos que compreendem o presente estudo estão descritas nas Tabelas 3 e 4 e todos os polimorfismos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos localizados nos cromossomos autossomos

Gene	db SNP id	Alelos		Genótipos		
<i>TLR1</i>	rs4833095	C	T	CC	CT	TT
		147 (0,50)	147 (0,50)	38 (25,9)	71 (48,3)	38 (25,9)
<i>TLR4</i>	rs1927911	A	G	AA	AG	GG
		127 (0,43)	169 (0,57)	32 (21,6)	64 (43,2)	52 (35,1)
<i>TLR9</i>	rs352140	C	T	CC	CT	TT
		154 (0,52)	142 (0,48)	45 (30,8)	62 (42,5)	39 (26,7)
<i>TIRAP</i>	rs8177374	C	T	CC	CT	TT
		263 (0,89)	33 (0,11)	118 (80,3)	26 (17,7)	3 (2,0)

Dados apresentados como frequência absoluta (frequência relativa em %).

As frequências genotípicas dos polimorfismos rs3764880 e rs352140 dos genes *TLR7* e *TLR8*, que se localizam no cromossomo X, são apresentados separados por sexo (Tabela 4). Não houve diferença estatística nas frequências alélicas desses polimorfismos entre os sexos. Da mesma forma, não houve diferença estatística entre as frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR9* e *TIRAP* entre os sexos.

Tabela 4. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos localizados no cromossomo X

Gene	db SNP id	Alelos		Genótipos				
				Feminino			Masculino	
<i>TLR7</i>	rs179008	A	T	AA	AT	TT	A	T
		238	56	36	13	1	76	21
		(0,81)	(0,19)	(72,0)	(26,0)	(2,0)	(78,4)	(21,6)
<i>TLR8</i>	rs3764880	A	G	AA	AG	GG	A	G
		161	131	19	21	9	51	46
		(0,55)	(0,45)	(38,8)	(42,9)	(18,4)	(52,6)	(47,4)

Dados apresentados como frequência absoluta (frequência relativa em %)

7.2 Associação de variantes de *TLR* com a parasitemia

Uma análise utilizando os Modelos lineares gerais (GLM) foi realizada para verificar se existe associação entre as variantes genéticas e os níveis observados de parasitemia dos pacientes no momento do diagnóstico. Os modelos foram ajustados por sexo, idade, ancestralidades genéticas africana e europeia período de exposição e passado nosológico.

Os homozigotos para o alelo T do polimorfismo rs352140 do gene *TLR9* apresentaram um nível médio de parasitemia em comparação com os portadores do alelo C (TC+CC) 7.762,47 parasitos/uL contra 4.207,27 parasitos/uL ($p = 0,034$), respectivamente (Tabela 5). Os demais polimorfismos não apresentaram associação estatisticamente significativa com os níveis de parasitemia na análise.

Tabela 5. Níveis de parasitemia de acordo com os genótipos dos *TLRs* e *TIRAP*

Polimorfismo	Genótipos	N	Parasitemia média		Valor p
<i>TLR1</i>	CC	35	6266,14	(3564,51:11040,79)	0,704
	CT	66	4345,10	(2798,98:6760,83)	
	TT	38	5223,96	(2999,16:9078,21)	
	CC	35	6266,14	(3564,51:11015,39)	0,307
	CT+TT	104	4634,47	(3140,51:6823,39)	
<i>TLR4</i>	AA	29	5533,50	(3019,95:10115,79)	0,645
	AG	61	4325,14	(2691,53:6934,26)	
	GG	49	5482,77	(3349,65:8974,29)	
	GG	49	5533,50	(3388,44:9057,33)	0,546
	AA+AG	90	4709,77	(3118,89:7095,78)	
<i>TLR9</i>	CC	43	4560,37	(2703,96:7709,03)	0,095
	CT	57	3971,92	(2506,11:6309,57)	
	TT	38	7762,47	(4528,98:13335,21)	
	TT	38	7762,47	(4528,98:13304,54)	0,034
	CC+TC	100	4207,27	(2851,02:6208,69)	
<i>TIRAP</i>	CC	111	4920,40	(3296,10:7345,14)	0,175
	CT	12	5662,39	(2958,01:10814,34)	
	TT	22	3427,68	(623,73:18793,17)	
	CC	111	4897,79	(3280,95:7311,39)	0,057
	CT+TT	28	5296,63	(2904,02:9660,51)	
<i>TLR7</i>	AA	105	4487,45	(3047,89:6591,74)	0,140
	AT+TT	34	6982,32	(3944,57:12359,47)	
<i>TLR8</i>	AA	68	4385,31	(2747,89:6998,42)	0,483
	AG+GG	70	5260,17	(3419,79:8072,35)	

Modelos lineares gerais utilizando sexo, idade, ancestralidades genéticas africana e europeia, período de exposição e passado nosológico como covariáveis. Níveis de parasitemia são apresentados como média geométrica (IC 95%).

7.3 Associação de variantes de *TLR* com a gametocitemia

A associação entre os níveis de gametocitemia dos pacientes e as variantes genéticas dos *TLRs* e *TIRAP* foi testada através da análise de Modelos lineares gerais (GLM) controlados por sexo, idade, ancestralidades genéticas africana e europeia, período de exposição e passado nosológico (Tabela 6). Não foi observada a associação dos polimorfismos estudados com os

níveis de gametocitemia dos indivíduos com malária causada por *P. vivax* controlando para todas as outras variáveis do modelo (Tabela 6).

Tabela 6. Associação entre os níveis de gametocitemia dos pacientes e as variantes genéticas dos *TLRs* e *TIRAP*

Polimorfismo	Genótipos	N	Gametocitemia média		Valor p
<i>TLR1</i>	CC	22	155,71	(86,92:278,66)	0,794
	CT	32	169,86	(97,13:297,08)	
	TT	15	203,16	(96,35:428,38)	
	CC	22	154,78	(86,75:275,89)	0,635
	CT+TT	47	178,39	(106,27:299,47)	
<i>TLR4</i>	AA	9	144,03	(57,28:362,13)	0,817
	AG	30	184,01	(105,85:319,90)	
	GG	30	156,96	(89,75:274,51)	
	GG	30	159,33	(91,74:277,00)	0,725
	AA+AG	39	176,09	(104,17:297,67)	
<i>TLR9</i>	CC	21	282,59	(148,41:538,61)	0,092
	CT	25	149,90	(82,02:273,69)	
	TT	22	136,87	(77,71:241,05)	
	TT	22	136,18	(76,48:242,74)	0,232
	CC+TC	46	198,54	(116,75:337,65)	
<i>TIRAP</i>	CC	52	170,72	(103,34:282,31)	0,891
	CT	17	162,23	(80,48:327,01)	
<i>TLR7</i>	AA	52	169,52	(104,48:275,34)	0,926
	AT+TT	17	164,51	(84,35:321,18)	
<i>TLR8</i>	AA	36	148,56	(85,03:259,82)	0,982
	AG+GG	32	149,61	(90,92:245,92)	

Modelos lineares gerais utilizando sexo, idade, ancestralidades genéticas africana e europeia, período de exposição e passado nosológico como covariáveis. Níveis de gametocitemia são apresentados como média geométrica (IC 95%).

7.4 Associação de variantes de *TLR* com índice clínico de severidade.

Uma análise de componentes principais foi realizada para agrupar os sintomas apresentados pelos pacientes no momento do diagnóstico e avaliados em escores numéricos de 0 a 4 (ausente, leve, moderado, severo e muito severo, respectivamente). Nessa análise, o primeiro componente explica 39,3% da variabilidade dos sintomas dos pacientes. O primeiro componente obtido identificou os maiores pesos para os sintomas de febre, cefaleia, calafrio, mialgia, artralgia, lombalgia, dor abdominal, astenia, tonteira, náuseas e anorexia apresentados pelos indivíduos.

Sendo assim este primeiro componente foi utilizado como índice clínico no modelo linear geral de análise de covariância para investigar a associação dos genótipos com a severidade da malária sintomática não complicada causada por *P. vivax*. A Idade, o sexo, o período de exposição, o passado nosológico, as ancestralidades genéticas europeia e africana e a parasitemia foram incluídos como covariáveis no modelo linear geral (Tabela 7).

Os homozigotos GG para o SNP rs1927911 no gene *TLR4* apresentaram maior índice clínico em relação aos portadores do alelo A ($p = 0,030$), controlando para todas as outras variáveis do modelo (Tabela 7). Os polimorfismos nos genes *TLR1*, *TLR9*, *TLR7*, *TLR8* e *TIRAP* não foram associados ao índice clínico apresentado pelos indivíduos infectados por *P. vivax* (Tabela 7).

Tabela 7. Índice clínico de acordo com os genótipos dos genes *TLRs* e *TIRAP*

Polimorfismo	Genótipos	N	Índice Clínico		Valor p
<i>TLR1</i>	CC	34	-0,193	(-0,550:0,164)	0,312
	CT	66	0,044	(-0,228:0,316)	
	TT	36	-0,198	(-0,550:0,154)	
	CC	34	-0,190	(-0,548:0,168)	0,404
	CT+TT	102	-0,034	(-0,279:0,211)	
<i>TLR4</i>	AA	28	-0,042	(-0,414:0,329)	0,030
	AG	61	-0,297	(-0,583:-0,011)	
	GG	47	0,175	(-0,133:0,483)	
	GG	47	0,184	(-0,124:0,492)	0,018
	AA+AG	89	-0,211	(-0,462:0,039)	
<i>TLR9</i>	CC	41	-0,119	(-0,458:0,220)	0,771
	CT	57	-0,099	(-0,390:0,192)	
	TT	37	0,025	(-0,326:0,377)	
	TT	37	0,026	(-0,324:0,375)	0,475
	CC+TC	98	-0,107	(-0,356:0,143)	
<i>TIRAP</i>	CC	109	-0,089	(-0,340:0,162)	0,946
	CT	24	-0,044	(-0,455:0,367)	
	TT	3	0,060	(-0,990:1,110)	
	CC	109	-0,087	(-0,337:0,162)	0,779
	CT+TT	27	-0,030	(-0,408:0,349)	
<i>TLR7</i>	AA	103	-0,056	(-0,301:0,189)	0,720
	AT+TT	33	-0,124	(-0,486:0,238)	
<i>TLR8</i>	AA	67	0,004	(-286:0,293)	0,401
	AG+GG	69	-0,132	(-0,398:0,134)	

Modelos lineares gerais utilizando sexo, idade, ancestralidades genéticas africana e europeia, período de exposição, passado nosológico e parasitemia como covariáveis. Índice clínico foi apresentado como média geométrica (IC 95%).

8. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observado que os polimorfismos rs352140 do gene *TLR9* e rs1927911 no gene *TLR4* estão associados com a parasitemia e a apresentação clínica da malária na população miscigenada do estado do Pará, respectivamente.

Dentre os *TLRs* humanos, os *TLR4* e o *TLR9*, apresentam diversas associações com a suscetibilidade, apresentação clínica e severidade da malária. Apesar de se apresentarem como possíveis marcadores moleculares para essa doença, existem muitos trabalhos com resultados divergentes entre regiões endêmicas estudadas (Dhangadamajhi et al., 2017).

O gene do *TLR4* é localizado na região do braço longo 9q32–q33 do cromossomo 9. O gene possui 4 exóons e apresenta uma alta expressão em células como linfócitos, monócitos, neutrófilos e esplenócitos. O *TLR4* interage com ligantes intra e extracelulares por estar localizado na superfície de células e de endossomos. Polimorfismos no gene que expressa essa proteína são descritos alterando sua função e modulando a resposta a diferentes infecções (Dhangadamajhi et al., 2017; Rani et al., 2018).

Polimorfismos no gene do *TLR4* (rs4986790, rs4986791 e rs5030719) foram associados com a modulação da expressão da cascata de citocinas na malária causada por *Plasmodium ssp.*, com a susceptibilidade de casos sintomáticos malária causada por *P. vivax* clínica (May et al., 2010; Rani et al., 2018; Sirisabhabhorn et al., 2021), e com os níveis de parasitemia nessas infecções (Ramírez et al., 2023). Em nosso trabalho, estudamos o polimorfismo rs1927911 do gene *TLR4* que ainda não tinha sido estudado na associação com a malária, mas com outras doenças inflamatórias (Vawda et al., 2014; Xie et al., 2017; Moura et al., 2022). O nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a associação do rs1927911 com os níveis do índice clínico da malária. O rs1927911 se encontra no intron 1 do gene *TLR4* e está ao risco de asma, aterosclerose e diferentes tipos de câncer (Vawda et al., 2014; Xie et al., 2017; Moura et al., 2022). O efeito desse polimorfismo na expressão e na função do *TLR4* ainda não está determinada. Estudos funcionais podem ajudar a esclarecer o papel dessa variante na modulação do sistema imune na resposta as doenças infecciosas.

O gene do *TLR9* é localizado na região 3p21.3 do braço curto do cromossomo 3 e possui dois éxons. O *TLR9* interage apenas com ligantes intracelulares em função a sua localização nos endossomos (Krishnegowda et al., 2005). Polimorfismos na região promotora desse gene estão associados a alterações na expressão dessa proteína com diferentes consequências para a modulação de citocinas e resposta imune (Dhangadamajhi et al., 2017).

Homozigotos TT da variante rs352140 do gene *TLR9* foi associada a um maior nível de parasitemia nas infecções por *P. vivax* em nosso estudo. Esses achados estão de acordo com o estudo de Omar et al., (2012), que em uma população de Gana, com uma amostra de 429 crianças com idades entre 3 e 11 anos demonstrou a associação desse SNP a um risco aumentado para a malária sintomática e a maiores níveis de parasitemia nas infecções por *P. falciparum*.

Outro estudo, realizado em uma população litorânea da colômbia, com amostra de 736 indivíduos, demonstrou que os homozigotos CC do SNP rs352140 apresentam proteção contra as infecções de malária (Mario-Vásquez et al., 2021). Esse resultado vai de acordo com a os resultados dos homozigotos TT serem mais suscetíveis a malária e apresentarem níveis mais elevados de parasitemia.

Em nosso estudo não foram encontradas associações entre os polimorfismos rs4833095, rs179008, rs3764880, rs8177374 nos genes *TLR1*, *TLR7*, *TLR8*, e *TIRAP* com os níveis de parasitemia, gametocitemia ou com o índice clínico da malária. Esses dados estão de acordo com os achados de Costa et al. (2017) que estudou uma amostra de 325 pacientes infectados com *P. vivax* e 274 indivíduos saudáveis população amazônica brasileira. Entretanto, divergem dos achados em outros estudos realizados nas populações dos continentes Africano e Asiático (Dhangadamajhi et al., 2017; Ramirez, 2022; Naing, Wong, Aung, 2021). Esses resultados em conjunto indicam que a modulação genética da resposta imune à malária varia nas diferentes populações, e reforça a necessidade da replicação dos estudos genéticos nas diversas populações endêmicas para essa doença.

Os resultados do nosso estudo reforçam a importância de polimorfismos nos genes *TLR4* e *TLR9* na modulação do sistema imune de forma a influenciar a apresentação clínica da malária causada por *P. vivax*. Entretanto temos que ressaltar que os resultados devem considerar algumas limitações do trabalho como: reduzido o número amostral, impossibilitando análises de interação gene-gene; devido ao congelamento das amostras de sangue antes da genotipagem, não foi possível medir outros marcadores biológicos, como os níveis de citocinas para corroborar os achados das análises com os genótipos; amostra é composta apenas por casos de malária sintomática não complicada, e os resultados podem não representar o mesmo significado em indivíduos assintomáticos ou com malária complicada. Apesar dessas limitações indicamos que variantes dos genes *TLR4* e *TLR9* podem ser marcadores moleculares para a apresentação clínica da malária causada por *P. vivax* na população amazônica miscigenada brasileira.

Estudos complementares com novas amostras e novas variáveis biológicas deverão ser realizados para replicar os nossos achados e auxiliar na compreensão da variação da apresentação das infecções sintomática de *P. vivax*, elucidando a patogênese da doença, através da identificação de genes envolvidos com a resposta da malária por *Plasmodium vivax*, corroborando assim para a criação de ferramentas que permitam o controle e sua eliminação.

9. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o polimorfismo rs352140 do gene *TLR9* está associado com os níveis médios de parasitemia dos indivíduos infectados por *P. vivax* na população miscigenada do estado do Pará.

Foi demonstrado, também, que o SNP rs1927911 no gene *TLR4* está associado com a apresentação clínica da malária na mesma população.

Os polimorfismos rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 nos genes *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *TIRAP* do sistema imune não foram associados aos níveis médios de gametocitemia na população estudada.

Os polimorfismos rs352140 do gene *TLR9* e rs1927911 no gene *TLR4* podem ser marcadores moleculares da malária causada por *P. vivax* na população amazônica, entretanto novos estudos são necessários para replicar os achados.

10. REFERÊNCIAS

Anstey NM, Tham WH, Shanks GD, Poespoprodjo JR, Russell BM, Kho S. The biology and pathogenesis of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 2024 Jul;40(7):573-590.

Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of Plasmodium vivax malaria. *Immunol Rev.* 2020 Jan;293(1):163-189. doi: 10.1111/imr.12816. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31642531.

Ariff, A., Song, Y., Aguilar, R. et al. Variantes genéticas de TLR4, incluindo a nova variante rs5030719, e genes relacionados estão associados à suscetibilidade à malária clínica em crianças africanas. *Malar J* 22, 177 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04549-8>.

Abbas, Lichtman, Pillai. *Imunologia celular e molécula*. 9. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. rev. e atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022a. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf. Acesso em: 19 Dez. 2023.

Brasil. Boletim Epidemiológico. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Volume 53, N.º 17, maio 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria/boletins-epidemiologicos-de-malaria/boletim-epidemiologico-vol-53-no17-2022-panorama-epidemiologico-da-malaria-em-2021-buscando-o-caminho-para-a-eliminacao-da-malaria-no-brasil>. Acesso em: 19 Dez. 2023.

Brasil. Boletim Epidemiológico. Malária |2021. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Número Especial. Nov. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_epidemiologico_especial_malaria_2021.pdf. Acesso em: 19 Dez. 2023.

Brasil 2024. Boletim Epidemiológico - Volume 55 - nº 1 - 2023 | Dia da Malária nas Américas: um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023 Dia da Malária nas Américas: um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023. Disponível em: www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-01/ Acesso: 02 de julho 2024.

Costa, K. M. M. **MALÁRIA E PISCICULTURA EM CRUZEIRO DO SUL (AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA): ANÁLISE DE SÉRIE HISTÓRICA, 1998-2008**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas-Fundação de Medicina Tropical do Amazonas). Manaus, p. 33. 2009. Disponível em: <https://pos.uea.edu.br/data/area/dissertacao/download/13-5.pdf>. Acesso em: 19 Dez. 2023.

Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, Sampaio VS, Xábregas LA, Brasil LW, Tarragô AM, Almeida ACG, Kuehn A, Vitor-Silva S, Melo GC, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Malheiro A. Association of TLR variants with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria and parasitemia in the Amazon region of Brazil. *PLoS One*. 2017 Aug 29;12(8):e0183840. doi: 10.1371/journal.pone.0183840. PMID: 28850598; PMCID: PMC5574562.

Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis*. 2018 Jan-Mar;55(1):1-8.

Dhangadamajhi G, Kar A, Rout R, Dhangadamajhi P. A meta-analysis of TLR4 and TLR9 SNPs implicated in severe malaria. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017 Mar-Apr;50(2):153-160. doi: 10.1590/0037-8682-0475-2016. PMID: 28562749.

Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Jul 20;7:324. doi: 10.3389/fcimb.2017.00324. PMID: 28775960; PMCID: PMC5517394.

Esposito S, Molteni CG, Zampiero A, Baggi E, Lavizzari A, Semino M, Daleno C, Groppo M, Scala A, Terranova L, Miozzo M, Pelucchi C, Principi N. Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. *Malar J*. 2012 Jun 12; 11:196. doi: 10.1186/1475-2875-11-196. PMID: 22691414; PMCID: PMC3411399.

Eid NA, Hussein AA, Elzein AM, Mohamed HS, Rockett KA, Kwiatkowski DP, Ibrahim ME (2010) Candidate malaria susceptibility/protective SNPs in hospital and population-based studies: the effect of sub-structuring. *Malar J* 9:119.

Guimarães LO, Fernandes F, Monteiro EF, Curado I, Holcman MM, Wunderlich G, Santos SE, Soler JM, Kirchgatter K. Influence of polymorphisms in toll-like receptors (TLRs) on malaria susceptibility in low-endemic area of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. *Acta Trop*. 2018 Jun; 182:309-316. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.03.011. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29551393.

Hahn WO, Harju-Baker S, Erdman LK, Krudsood S, Kain KC, Wurfel MM, Liles WC. A common TLR1 polymorphism is associated with higher parasitaemia in a Southeast Asian population with *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2016 Jan 6; 15:12. doi: 10.1186/s12936-015-1071-y. PMID: 26738805; PMCID: PMC4704253.

Israelsson E, Maiga B, Kearsley S, Dolo A, Homann MV, Doumbo OK, Troye-Blomberg M, Tornvall P, Berzins K (2011) Cytokine gene haplotypes with a potential effect on susceptibility to malaria in sympatric ethnic groups in Mali. *Infect Genet Evol* 11:1608-1615.

He X, Xia L, Tumas KC, Wu J, Su XZ. Type I Interferons and Malaria: A Double-Edge Sword Against a Complex Parasitic Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Dec 2; 10:594621. doi: 10.3389/fcimb.2020.594621. PMID: 33344264; PMCID: PMC7738626.

Kariuki SN, Williams TN. Human genetics and malaria resistance. *Hum Genet*. 2020 Jun;139(6-7):801-811. doi: 10.1007/s00439-020-02142-6. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32130487;

PMCID: PMC7271956.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8606-16

Mario-Vásquez JE, Naranjo-González CA, Montiel J, Zuluaga LM, Vásquez AM, Tobón-Castaño A, Bedoya G, Segura C. Association of variants in IL1B, TLR9, TREM1, IL10RA, and CD3G and Native American ancestry on malaria susceptibility in Colombian populations. *Infect Genet Evol*. 2021 Jan; 87:104675.

May L, van Bodegom D, Frölich M, van Lieshout L, Slagboom PE, Westendorp RG, Kuningas M. Polymorphisms in TLR4 and TLR2 genes, cytokine production and survival in rural Ghana. *Eur J Hum Genet*. 2010 Apr;18(4):490-5. doi: 10.1038/ejhg.2009.182. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19844258; PMCID: PMC2987239.

Monroe, A., Williams, NA, Ogoma, S. et al. Reflexões sobre o Relatório Mundial sobre a Malária de 2021 e o futuro do controlo da malária. *Malar J* 21, 154 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04178-7>.

Moura EL, Santos IFD, Freitas PP, Silva DMD, Santos ACMD, Lira Neto AB, Silva ACPE, Barbosa NR, Nascimento CA, Balliano TL, Fraga CAC, Farias KF, Figueiredo EVMS. Polymorphisms in Toll-like receptors genes changes the host's immune response and is associated with cervical cancer. *Immunobiology*. 2022 Mar;227(2):152187. doi: 10.1016/j.imbio.2022.152187.

Naing C, Wong ST, Aung HH. Toll-like receptor 9 and 4 gene polymorphisms in susceptibility and severity of malaria: a meta-analysis of genetic association studies. *Malar J*. 2021 Jul 3;20(1):302. doi: 10.1186/s12936-021-03836-6. PMID: 34217314; PMCID: PMC8255014.

Neto, F. A. R. S. Perfil epidemiológico das notificações por malária no Nordeste do Brasil, entre 2015- 2021. *Rev: Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. 8, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/30091/26187/348327>. Acesso em: 19 Dez. 2023.

Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, Hirayama K. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study *Malar J*. 2012 May 17;11:168.

Penha-Gonçalves C. Genetics of Malaria Inflammatory Responses: A Pathogenesis Perspective. *Front Immunol*. 2019 Jul 30; 10:1771. doi: 10.3389/fimmu.2019.01771. PMID: 31417551; PMCID: PMC6682681.

Pena, S.D. J, Bastos, R. L., Pimenta, J. R, Bydlowski, S. P. Tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, n. 10, p. 870–876, 2009.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e17063.

Phillips, M., Burrows, J., Manyando, C. *et al.* Malária. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17050 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.

Phyo AP, Dahal P, Mayxay M, Ashley EA. Clinical impact of vivax malaria: A collection review. *PLoS Med*. 2022 Jan 18;19(1):e1003890.

Rajpoot S, Wary KK, Ibbott R, Liu D, Saqib U, Thurston TLM, Baig MS. TIRAP in the Mechanism of Inflammation. *Front Immunol*. 2021 Jul 8; 12:697588. doi: 10.3389/fimmu.2021.697588. PMID: 34305934; PMCID: PMC8297548.

Rani A, Nawaz SK, Irfan S, Arshad M, Bashir R, Shaheen N. Role of MyD88-adaptor-like gene polymorphism rs8177374 in modulation of malaria severity in the Pakistani population. *Braz J Infect Dis*. 2017 Jul-Aug;21(4):418-423. doi: 10.1016/j.bjid.2017.04.002. Epub 2017 May 6. PMID: 28482182; PMCID: PMC9428015.

Rani A, Nawaz SK, Arshad M, Irfan S. Role of rs4986790 Polymorphism of TLR4 Gene in Susceptibility towards Malaria Infection in the Pakistani Population. *Iran J Public Health*. 2018 May;47(5):735-741. PMID: 29922617; PMCID: PMC6005971.

Rani A, Nawaz SK, Arshad M, Arshad N. Role of MyD88-Adaptor-Like (MAL) Gene Polymorphism rs8177374 and Cytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β) Levels in Diverse Malaria Manifestations upon *P. falciparum* and *P. vivax* Infections. *Jpn J Infect Dis*. 2023 Nov 22;76(6):358-364. doi: 10.7883/yoken.JJID.2023.079. Epub 2023 Aug 31. PMID: 37648490.

Ramirez Ramirez AD, de Jesus MCS, Rossit J, Reis NF, Santos-Filho MC, Sudré AP, de Oliveira-Ferreira J, Baptista ARS, Storti-Melo LM, Machado RLD. Association of toll-like receptors in malaria susceptibility and immunopathogenesis: A meta-analysis. *Heliyon*. 2022 Apr 22;8(4): e09318. doi: 10.1016/j.heliyon. 2022.e09318. PMID: 35520620; PMCID: PMC9065626.

Ramírez ADR, de Jesus MCS, Menezes RAO, Santos-Filho MC, Gomes MSM, Pimenta TS, Barbosa VS, Rossit J, Reis NF, Brito SCP, Sampaio MP, Cassiano GC, Storti-Melo LM, Baptista ARS, Machado RLD. Polymorphisms in Toll-Like receptors genes and their associations with immunological parameters in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazil-French Guiana Border. *Cytokine*. 2023 Sep; 169:156278. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156278. Epub 2023 Jun 23. PMID: 37356261.

Rey, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4.ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017 Jul 4;16(1):273. doi: 10.1186/s12936-017-1925-6. PMID: 28676055; PMCID: PMC5496604.

Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):184-90. doi: 10.1002/humu.21159. PMID: 19953531.

Sirisabhabhorn K, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Genetic Diversity of Human Host Genes Involved in Immune Response and the Binding of Malaria Parasite in Patients Residing along the Thai-Myanmar border. *Trop Med Infect Dis.* 2021 Sep 24;6(4):174.

Soares SC, Abé-Sandes K, Nascimento Filho VB, Nunes FM, Silva WA Jr. Genetic polymorphisms in TLR4, CR1 and Duffy genes are not associated with malaria resistance in patients from Baixo Amazonas region, Brazil. *Genet Mol Res.* 2008 Oct 7;7(4):1011-9. doi: 10.4238/vol7-4gmr439. PMID: 19048480.

Sortica, VA, Cunha, MG, Ohnishi, MDO *et al.* Os polimorfismos dos genes *IL1B*, *IL4R*, *IL12RB1* e *TNF* estão associados à malária por *Plasmodium vivax* no Brasil. *Malar J* 11, 409 (2012). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-409>.

SORTICA, V. A. **SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E FARMACOGENÉTICA DA MALÁRIA CAUSADA POR P. VIVAX NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS). Porto Alegre, p. 196. 2013. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143461/000880049.pdf;jsessionid=0960F21F572106D74C8BE901A5E1D3F5?sequence=1>. Acesso em: 19 Dez. 2023.

Sherrard-Smith, E., Hogan, AB, Hamlet, A. et al. As potenciais consequências da COVID-19 para a saúde pública na malária em África. *Nat Med* 26, 1411–1416 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1025-y>.

Wawda S, Mansour R, Takeda A, Funnell P, Kerry S, Mudway I, Jamaludin J, Shaheen S, Griffiths C, Walton R. Associations between inflammatory and immune response genes and adverse respiratory outcomes following exposure to outdoor air pollution: a HuGE systematic review *Am J Epidemiol.* 2014 Feb 15;179(4):432-42.

Winzeler EA. Malaria research in the post-genomic era. *Nature.* 2008 Oct 9;455(7214):751-6. doi: 10.1038/nature07361. PMID: 18843360; PMCID: PMC2705782.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World malaria report 2020. 20 years of global progress & challenges. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>. Acesso em: 19 Dez. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World malaria report 2021. Disponível em: https://reliefweb.int/report/world/world-malaria-report-2021?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAnLsBhBnEiwAJRGignx1BFkOnE3QmSFcaj1yMo7hkFjFKYpgINGuENKbnjs5yyd3IKqmghoCXSUQAvD_BwE. Acesso em: 19 Dez. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World malaria report 2022. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>. Acesso em: 19 Dez. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report 2023. Disponível em: https://reliefweb.int/report/world/world-malaria-report-2023-enarruzh?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA75itBhA6EiwAkho9e2jNAQ4Cusmgu66_m0zC0Tc-XqSgJwCd6pucbqaDOj1r7W0Ys6cJuhoCRocQAvD_BwE. Acesso em: 19 jan. 2023.

Xie X, Shi X, Liu M. The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317 Subjects. *Scand J Immunol*. 2017 Jul;86(1):50-5

ANEXO A

Title: Analysis of the influence of polymorphisms in the *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, and *TIRAP* genes on the severity of infections by *Plasmodium vivax*.

Authors Names: Mikaele M R I Silva¹; Juliana D Lindenau²; Maristela G Cunha³; Maria Deise O Ohnishi⁴; Ana Maria R S Ventura⁴; Ândrea Ribeiro-dos-Santos⁵; Mara H Hutz⁶; Vinicius A Sortica^{1*}.

Authors Affiliations:

¹Programa de pós-graduação em ciências médicas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil;

²Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;

³Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil;

⁴Programa de Ensaios Clínicos em Malária, Instituto Evandro Chagas, Sistema de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Belém, Brazil;

⁵Laboratorio de Genética Humana e Médica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil;

⁶Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

***Corresponding Author:** vsortica@hotmail.com

Running Title: *TLRs* SNPs and malaria severity

Keywords: malaria, genetic variability, Toll Like Receptor, Amazon region, Brazil.

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) induce the production of pro-inflammatory cytokines and regulate immune response to *P. vivax* infections. Genetic variants in *TLRs* are associated with malaria susceptibility and severity in different populations. The study aimed to evaluate the association between the *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, and *TIRAP* polymorphisms and clinical manifestations of malaria caused by *P. vivax* in a population from the Amazon region of the state of Pará, Brazil. A total of 148 individuals with symptomatic uncomplicated malaria were genotyped for rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, and rs8177374 polymorphisms and the association with parasitemia levels, gametocytaemia, and clinical index were analyzed by generalized linear models. Homozygotes TT of the *TLR9* rs352140 variant had an increased level of parasitemia compared with C allele carriers ($p = 0.034$). The GG homozygotes for *TLR4* rs1927911 variants have a higher clinical index than A allele carriers ($p = 0.018$). Our findings suggest that *TLR9* rs352140 and *TLR4* rs1927911 variants significantly modulate the immune response and clinical symptoms of the Brazilian Amazonian population infected with *P. vivax*.

INTRODUCTION

Malaria is an acute febrile infectious disease that is widespread on the continents of America, Africa, Asia, and Oceania, affecting more than 240 million people (WHO, 2023). This disease is caused by *P. falciparum*, *P. malariae*, and *P. vivax* infections in Brazil, transmitted to the human host by the bite of infected female mosquitoes belonging to the Culicidae family of the genus Anopheles. In Brazil, more than 84% of malaria cases were caused by *P. vivax* infections (Brasil, 2024).

The infection by Plasmodium triggers both innate and adaptative immune responses by the host in a complex immune network of cell receptors and interactions with cytokines, chemokines, and antibodies (Antonelli et al., 2020; Dobbs et al., 2020). Studies have shown that cytokine expression is significantly impacted by the influence of polymorphisms in TLR genes in malaria caused by *P. vivax*. Associations of TLR polymorphism with cytokine levels, susceptibility, and clinical manifestations of malaria have been reported (Costa et al., 2017; Costa et al., 2018; Penha, 2019; Ramírez et al., 2022; Ramírez et al., 2023).

TLRs play a pivotal role in inducing the production of pro-inflammatory cytokines, thereby activating the NF- κ B transcription factor and bridging the gap between innate and adaptive immunity. Genetic variants can significantly impact the expression of these receptors and their binding capacity, thereby altering their function and the regulation of the response to different pathogens. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of TLRs and the adaptor protein containing the Toll-interleukin-1 receptor domain (TIRAP) have been associated with malaria susceptibility and severity (Costa et al., 2017). Our study, which analyzes the potential influence of polymorphisms in the *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, and *TIRAP* genes on the clinical manifestations of malaria caused by *P. vivax* in the Amazon region of Brazil, holds promise in contributing to the understanding of the pathophysiology of this disease and in the development of effective diagnostic and prevention strategies.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The study included samples from 148 individuals infected with *Plasmodium vivax* in the Amazon region from Pará described elsewhere (Sortica et al., 2012). The individuals were born in Pará state, Brazil and diagnosed with uncomplicated symptomatic malaria. Diagnosis was done through blood smear microscopy and parasitemia and gametocytemia levels were estimated. All participants were evaluated by physicians and symptoms were recorded numerically as 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe) and 4 (very severe). The most

common symptoms presented were: fever, chills, headache, arthralgia, low back pain, asthenia, myalgia, dizziness, tinnitus, deafness, insomnia, nausea, vomiting, abdominal pain, eructation, flatus, diarrhea, choluria, oliguria, anuria, pallor, jaundice, pruritus, allergy, cough, dyspnea, anorexia, splenomegaly, hepatomegaly. All patients received the recommended treatment, 1500 mg of chloroquine combined with 210 mg of primaquine over seven days, recommended by the Ministry of Health (Brazil, 2009).

This project was approved by the ethics committees of the Evandro Chagas Institute (CEP/IEC-0035) and the Federal University of Pará (061/07 CEP-CCS/UFPA) and all the individuals included in the study signed an informed consent.

Molecular analyses

The patients' DNA samples were genotyped using real-time PCR for rs4833095, rs1927911, rs179008, rs3764880, rs352140, rs8177374 genetic variations in the *TLR1*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, and *TIRAP* genes (Table 1). Genotyping was carried out using Applied Biosystem TaqMan® SNP genotyping kits. Additionally, 48 ancestry-informative molecular markers information were used for genomic ancestry control in statistical analyses (Sortica et al., 2012).

Statistical analyses

The allelic and genotypic frequencies were estimated by direct counting, and the deviation from the Hard-Weinberg equilibrium was investigated using the Chi-square test. A principal component analysis was used to group the symptoms presented by the patients into a clinical severity index. The genotypes of the TLRs were analyzed for association with the levels of parasitemia, gametocytemia, and the clinical index using General Linear Models (GLM). Parasitemia and gametocytemia levels were transformed into a logarithmic scale because they skewed from a normal distribution. However, the values transformed back into a standard scale are presented in the results as geometric means. In the GLMs, the covariates sex, age, African and European genetic ancestry, period of exposure, and history of illness were included because they are associated with malaria or correlated with levels of parasitemia or gametocytemia.

The statistical package SPSS 21.0 for Windows® was used for the statistical analysis. Statistical significance was defined as a two-tailed p-value < 0.05.

RESULTS

Characteristics of the Study Group

Table 2 describes the clinical characteristics of the study participants. The individuals ranged in age from 12 to 88, with a median age of 32 and males represents 66.2% of the participants. The genetic ancestry of the group studied comprised an average proportion of 22.8% African ancestry, 41.0% European ancestry, and 32.4% Native American ancestry (Table 2). The period

of exposure of the patients in the infection regions was variable, with 53.4% of the population remaining in the area for between 1 and 25 days, 20.3% remaining in the area for more than 25 days, and 22.3% being residents of the endemic place of infection (Table 2).

It was observed that 67.6% of the individuals were infected by *P. vivax* for the first time, 11.5% were having malaria for the second time, and 20.3% of the patients had already have malaria more than twice. Individuals presented infections with parasitemia levels ranging from 50 parasites/ul to 75,000 parasites/ul at the time of diagnosis and a median of 5,500 parasites/ul. The sexual forms of *P. vivax* were observed in only 70 individuals at diagnosis, with a range of 15 gametocytes/ μ L to 4500 gametocytes/ μ L and a median of 100 (Table 2).

Tables 3 and 4 describe the allelic and genotypic frequencies of the 148 individuals included in this study. All the polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium. There was no statistical difference in the allele frequencies of these polymorphisms between the sexes.

Association of TLR variants with parasitemia and gametocytaemia

An analysis using general linear models (GLM) was carried out to test the association between genetic variants and the levels of parasitemia in patients. The models were adjusted for sex, age, African and European genetic ancestry, period of exposure, and history of disease.

Homozygotes for the T allele of the rs352140 polymorphism of the *TLR9* gene had high levels of parasitemia compared to carriers of the C allele ($p = 0.034$) (Table 5). No other variant showed statistically significant association with parasitemia levels in this analysis.

The association between the patients' gametocytemia levels and the genetic variants of the TLRs and TIRAP was tested by GLM controlled for sex, age, African and European genetic ancestry, period of exposure, and history of the disease. There was no association between the variants and gametocytaemia levels in individuals with malaria caused by *P. vivax*, (Table 6).

Association of *TLR* variants with clinical severity index

A principal component analysis was carried out to group the symptoms presented by the patients at the time of diagnosis. The symptoms were evaluated in numerical scores from 0 to 4 (absent, mild, moderate, severe, and very severe, respectively). In the principal component analysis, the first component explained 39.3% of the variability in patients' symptoms. The first component obtained identified the highest weights for the symptoms of fever, headache, chills, myalgia, arthralgia, low back pain, abdominal pain, asthenia, dizziness, nausea, and anorexia.

The first component was used as a clinical index in the GLM to investigate the association of genotypes with the severity of uncomplicated symptomatic malaria caused by *P. vivax*. Age, gender, exposure period, history of disease, European and African genetic ancestry, and parasitemia enter as covariates in the analysis (Table 7).

The GG homozygotes for the *TLR4* rs1927911 SNP presented a higher clinical index than carriers of the A allele ($p = 0.018$). Polymorphisms in the *TLR1*, *TLR9*, *TLR7*, *TLR8*, and *TIRAP* genes were not associated with the clinical index (Table 7).

DISCUSSION

This study found that the *TLR9* rs352140 polymorphism and the *TLR4* rs1927911 polymorphism are associated with parasitemia and the clinical presentation of malaria in the admixed population of the state of Pará.

TLRs variants show associations with malaria susceptibility, clinical presentation, and severity across different human populations. Despite being presented as possible molecular markers for this disease, many studies have divergent results between the endemic regions studied (Dhangadamajhi et al., 2017; Naing et al., 2021; Ramirez et al., 2022)

The *TLR4* gene is located in the 9q32-q33 extended arm region of chromosome 9. The gene has four exons and is highly expressed in lymphocytes, monocytes, neutrophils, and splenocytes. *TLR4* interacts with intra- and extracellular ligands as it is located on the surface of cells and endosomes. Polymorphisms in the gene that expresses this protein have been described, altering its function and modulating the response to different infections (Dhangadamajhi et al., 2017; Rani et al., 2018). Polymorphisms in the *TLR4* gene (rs4986790, rs4986791, and rs5030719) have been associated with modulation of the expression of the cytokine cascade in *Plasmodium* ssp. malaria, and with the susceptibility and parasitemia levels of symptomatic cases to clinical *P. vivax* malaria (May et al., 2010; Rani et al., 2018; Sirisabhabhorn et al., 2021; Ramírez et al., 2023). In our study, the *TLR4* rs1927911 variant was associated with the levels of the malaria clinical index. This variant had not previously been associated with clinical symptoms of malaria. The rs1927911 is found in intron 1 of the *TLR4* gene and is associated with the risk of asthma, atherosclerosis, and different types of cancer (Vawda et al., 2014; Xie et al., 2017; Moura et al., 2022). The effect of this polymorphism on *TLR4* expression and function has yet to be determined. Functional studies may help clarify this variant's role in modulating the immune system's response to infectious diseases.

The *TLR9* gene has two exons and is in the 3p21.3 region of the short arm of chromosome 3. Due to its location in the endosomes, *TLR9* only interacts with intracellular ligands (Krishnegowda et al., 2005). Polymorphisms in the promoter region of this gene are associated with changes in the expression of this protein, which have different consequences for the modulation of cytokines and immune response (Dhangadamajhi et al., 2017). In our study, *TLR9* rs352140 TT homozygotes were associated with a higher level of parasitemia in *P. vivax*

infections. These findings are in line with those of Omar et al. (2012), that associated this variant with an increased risk of symptomatic malaria and higher levels of parasitemia in *P. falciparum* in a Ghanaian population. Another study carried out in Colombia, showed that *TLR9* rs352140 CC homozygotes are protected against malaria infections (Mario-Vásquez et al., 2021). This result is in line with the findings that TT homozygotes are more susceptible to malaria and have higher levels of parasitemia.

In our study, no associations were found between the rs4833095, rs179008, rs3764880, and rs8177374 polymorphisms in the *TLR1*, *TLR7*, *TLR8*, and *TIRAP* genes with levels of parasitemia, gametocytaemia or the clinical index of malaria. These data align with the findings of Costa et al. (2017), who studied the genetic susceptibility of *P. vivax* in the Brazilian Amazon population.

The results of our study reinforce the importance of polymorphisms in the *TLR4* and *TLR9* genes in modulating the immune system response to malaria caused by *P. vivax*. However, we must emphasize that the results must take into account some of the limitations of the work, such as the small sample size, making it impossible to carry out gene-gene interaction analyses; due to the freezing of the blood samples before genotyping, it was not possible to measure other biological markers, such as cytokine levels to corroborate the findings of the analyses with the genotypes; the sample is made up only of cases of uncomplicated symptomatic malaria, and the results may not represent the same significance in asymptomatic individuals or those with complicated malaria. Despite these limitations, we indicate that variants of the *TLR4* and *TLR9* genes could be molecular markers for the clinical presentation of malaria caused by *P. vivax* in the admixed Brazilian Amazonian population. Complementary studies with new samples and new biological variables should be carried out to replicate our findings and help understand the variation in the presentation of symptomatic *P. vivax* infections.

Our findings reinforce the importance of investigating genetic variants in the susceptibility and severity of infectious and neglected diseases in the Brazilian admixed population. This will advance knowledge of the pathophysiology of these diseases and help develop diagnostic and prevention strategies.

The Acknowledgments: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), grant numbers: (455226/2014-8), (407025/2018-9). In different phases of the research. VS was supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq (104101/2020-2) and MS

was supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the study's design, data collection, analysis, interpretation, manuscript writing, or decision to publish the results.

Authors Contributions: Conceptualization: VS; methodology: VS, MC and JL; formal analysis: VS and MS; investigation: MS, VS, MC, MO, AMV, ARS, MH, JL; writing original draft preparation: MS; writing review and editing: VS; supervision: VS; project administration: VS; funding acquisition: VS, MC, ARS and MH. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

REFERENCES

Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol Rev.* 2020 Jan;293(1):163-189.

Brazil 2009. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária (2009). http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf (julho 2, 2024).

Brasil 2024. Boletim Epidemiológico - Volume 55 - nº 1 - 2023 | Dia da Malária nas Américas: um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023 Dia da Malária nas Américas: um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023. www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-01/ (julho 2, 2024).

Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, Sampaio VS, Xábregas LA, Brasil LW, Tarragô AM, Almeida ACG, Kuehn A, Vitor-Silva S, Melo GC, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Malheiro A. Association of TLR variants with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria and parasitemia in the Amazon region of Brazil. *PLoS One.* 2017 Aug 29;12(8):e0183840. doi: 10.1371/journal.pone.0183840.

Costa AG, Ramasawmy R, Val FFA, Ibiapina HNS, Oliveira AC, Tarragô AM, Garcia NP, Heckmann MIO, Monteiro WM, Malheiro A, Lacerda MVG. Polymorphisms in TLRs influence circulating cytokines production in *Plasmodium vivax* malaria: TLR polymorphisms influence cytokine productions in malaria-vivax. *Cytokine*. 2018 Oct;110:374-380. doi: 10.1016/j.cyto.2018.04.008.

Dhangadamajhi G, Kar A, Rout R, Dhangadamajhi P. A meta-analysis of TLR4 and TLR9 SNPs implicated in severe malaria. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017 Mar-Apr;50(2):153-160. doi: 10.1590/0037-8682-0475-2016. PMID: 28562749.

Dobbs KR, Crabtree JN, Dent AE. Innate immunity to malaria-The role of monocytes. *Immunol Rev*. 2020 Jan;293(1):8-24. doi: 10.1111/imr.12830.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8606-16

May L, van Bodegom D, Frölich M, van Lieshout L, Slagboom PE, Westendorp RG, Kuningas M. Polymorphisms in TLR4 and TLR2 genes, cytokine production and survival in rural Ghana. *Eur J Hum Genet*. 2010 Apr;18(4):490-5. doi: 10.1038/ejhg.2009.182. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19844258; PMCID: PMC2987239.

Mario-Vásquez JE, Naranjo-González CA, Montiel J, Zuluaga LM, Vásquez AM, Tobón-Castaño A, Bedoya G, Segura C. Association of variants in IL1B, TLR9, TREM1, IL10RA, and CD3G and Native American ancestry on malaria susceptibility in Colombian populations. *Infect Genet Evol*. 2021 Jan; 87:104675.

Moura EL, Santos IFD, Freitas PP, Silva DMD, Santos ACMD, Lira Neto AB, Silva ACPE, Barbosa NR, Nascimento CA, Balliano TL, Fraga CAC, Farias KF, Figueiredo EVMS. Polymorphisms in Toll-like receptors genes changes the host's immune response and is associated with cervical cancer. *Immunobiology*. 2022 Mar;227(2):152187. doi: 10.1016/j.imbio.2022.152187.

Naing C, Wong ST, Aung HH. Toll-like receptor 9 and 4 gene polymorphisms in susceptibility and severity of malaria: a meta-analysis of genetic association studies. *Malar J*. 2021 Jul 3;20(1):302. doi: 10.1186/s12936-021-03836-6. PMID: 34217314; PMCID: PMC8255014.

Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, Hirayama K. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study *Malar J*. 2012 May 17;11:168.

Penha-Gonçalves C. Genetics of Malaria Inflammatory Responses: A Pathogenesis Perspective. *Front Immunol*. 2019 Jul 30; 10:1771. doi: 10.3389/fimmu.2019.01771. PMID: 31417551; PMCID: PMC6682681.

Rani A, Nawaz SK, Arshad M, Irfan S. Role of rs4986790 Polymorphism of TLR4 Gene in Susceptibility towards Malaria Infection in the Pakistani Population. *Iran J Public Health*. 2018 May;47(5):735-741. PMID: 29922617; PMCID: PMC6005971.

Ramirez Ramirez AD, de Jesus MCS, Rossit J, Reis NF, Santos-Filho MC, Sudré AP, de Oliveira-Ferreira J, Baptista ARS, Storti-Melo LM, Machado RLD. Association of toll-like receptors in malaria susceptibility and immunopathogenesis: A meta-analysis. *Heliyon*. 2022 Apr 22;8(4): e09318. doi: 10.1016/j.heliyon. 2022.e09318. PMID: 35520620; PMCID: PMC9065626.

Ramírez ADR, de Jesus MCS, Menezes RAO, Santos-Filho MC, Gomes MSM, Pimenta TS, Barbosa VS, Rossit J, Reis NF, Brito SCP, Sampaio MP, Cassiano GC, Storti-Melo LM, Baptista ARS, Machado RLD. Polymorphisms in Toll-Like receptors genes and their associations with immunological parameters in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazil-French Guiana Border. *Cytokine*. 2023 Sep; 169:156278. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156278. Epub 2023 Jun 23. PMID: 37356261.

Sirisabhabhorn K, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Genetic Diversity of Human Host Genes Involved in Immune Response and the Binding of Malaria Parasite in Patients Residing along the Thai-Myanmar border. *Trop Med Infect Dis*. 2021 Sep 24;6(4):174.

Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MD, Souza JM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Santos NP, Callegari-Jacques SM, Santos SE, Hutz MH. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with Plasmodium vivax malaria in Brazil. Malar J. 2012 Dec 7;11:409. doi: 10.1186/1475-2875-11-409.

Vawda S, Mansour R, Takeda A, Funnell P, Kerry S, Mudway I, Jamaludin J, Shaheen S, Griffiths C, Walton R. Associations between inflammatory and immune response genes and adverse respiratory outcomes following exposure to outdoor air pollution: a HuGE systematic review Am J Epidemiol. 2014 Feb 15;179(4):432-42.

WHO 2023. World malaria report 2023. World Health Organization. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (julho 2, 2024)

Xie X, Shi X, Liu M. The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317 Subjects. Scand J Immunol. 2017 Jul;86(1):50-58.

Table1. Description of the polymorphisms

Gene	db SNP id	Position (GRCh38)	Alleles	Assay	Function
<i>TLR1</i>	rs4833095	chr04:38798089	C>T	C__44103606_10	missense
<i>TLR4</i>	rs1927911	chr09:117707776	A>G	C__11722141_10	intron
<i>TLR7</i>	rs179008	chrX:12885540	A>T	C__2259574_10	missense
<i>TLR8</i>	rs3764880	chrX:12906707	A>G	C__2183830_10	5 Prime UTR
<i>TLR9</i>	rs352140	chr03:52222681	C>T	C__2301954_20	synonym
<i>TIRAP</i>	rs8177374	chr11:126292948	C>T	C__25983622_10	missense

Table 2. Clinical characteristics of individuals infected with *P. vivax*

Characteristics	
N	148 (100)
Sex	
Female	50 (33.8)
Male	98 (66.2)
Age	32 (12:88)
Genetic Ancestry	
Amerindian	0.320 (0.109:0.695)
European	0.411 (0.199:0.708)
African	0.220 (0.094:0.516)
Parasitemia	5.500 (50:75.000)
Gametocytemia	100 (15:4.500)
Days in infection site	
1 a 25	79 (53.4)
26 or more	30 (20.3)
residents	33 (22.3)
missing	6 (4.1)
Infection history	
first infection	100 (67.6)
second infection	17 (11.5)
third infection	30 (20.3)
missing	1 (0.7)

Age, paracythemia levels, gametocythemia levels and genetic ancestry are presented as median (minimum:maximum). Sex, days at the infection site and infection history are presented as a direct count (relative frequency in %).

Table 3. Allelic and genotypic frequencies of *TLR1*, *TLR4*, *TLR9* and *TIRAP* polymorphisms.

Gene	db SNP id	Alleles		Genotypes		
<i>TLR1</i>	rs4833095	C	T	CC	CT	TT
		147 (0.50)	147 (0.50)	38 (25.9)	71 (48.3)	38 (25.9)
<i>TLR4</i>	rs1927911	A	G	AA	AG	GG
		127 (0.43)	169 (0.57)	32 (21.6)	64 (43.2)	52 (35.1)
<i>TLR9</i>	rs352140	C	T	CC	CT	TT
		154 (0.52)	142 (0.48)	45 (30.8)	62 (42.5)	39 (26.7)
<i>TIRAP</i>	rs8177374	C	T	CC	CT	TT
		263 (0.89)	33 (0.11)	118 (80.3)	26 (17.7)	3 (2.0)

Data presented as absolute frequency (relative frequency in %).

Table 4 - Allelic and genotypic frequencies of *TLR7* and *TLR* polymorphisms

Gene	db SNP id	Alleles		Genotypes				
				Female			Male	
<i>TLR7</i>	rs179008	A	T	AA	AT	TT	A	T
		238	56	36	13	1	76	21
		(0.81)	(0.19)	(72.0)	(26.0)	(2.0)	(78.4)	(21.6)
<i>TLR8</i>	rs3764880	A	G	AA	AG	GG	A	G
		161	131	19	21	9	51	46
		(0.55)	(0.45)	(38.8)	(42.9)	(18.4)	(52.6)	(47.4)

Data presented as absolute frequency (relative frequency in %).

Table 5. Parasitemia levels according to *TLR* and *TIRAP* genotypes.

Polymorphism	Genotypes	N	Mean Parasitemia		P value
<i>TLR1</i>	CC	35	6266.14	(3564.51:11040.79)	0.704
	CT	66	4345.10	(2798.98:6760.83)	
	TT	38	5223.96	(2999.16:9078.21)	
	CC	35	6266.14	(3564.51:11015.39)	0.307
	CT+TT	104	4634.47	(3140.51:6823.39)	
<i>TLR4</i>	AA	29	5533.50	(3019.95:10115.79)	0.645
	AG	61	4325.14	(2691.53:6934.26)	
	GG	49	5482.77	(3349.65:8974.29)	
	GG	49	5533.50	(3388.44:9057.33)	0.546
	AA+AG	90	4709.77	(3118.89:7095.78)	
<i>TLR9</i>	CC	43	4560.37	(2703.96:7709.03)	0.095
	CT	57	3971.92	(2506.11:6309.57)	
	TT	38	7762.47	(4528.98:13335.21)	
	TT	38	7762.47	(4528.98:13304.54)	0.034
	CC+TC	100	4207.27	(2851.02:6208.69)	
<i>TIRAP</i>	CC	111	4920.40	(3296.10:7345.14)	0.175
	CT	12	5662.39	(2958.01:10814.34)	
	TT	22	3427.68	(623.73:18793.17)	
	CC	111	4897.79	(3280.95:7311.39)	0.057
	CT+TT	28	5296.63	(2904.02:9660.51)	
<i>TLR7</i>	AA	105	4487.45	(3047.89:6591.74)	0.140
	AT+TT	34	6982.32	(3944.57:12359.47)	
<i>TLR8</i>	AA	68	4385.31	(2747.89:6998.42)	0.483
	AG+GG	70	5260.17	(3419.79:8072.35)	

General linear models using sex, age, African and European genetic ancestry, period of exposure and infection history as covariates. Parasitemia levels are presented as geometric mean (95% CI).

Table 6. Association between patients' gametocythemia levels and TLR and TIRAP genetic variants.

Polymorphism	Genotypes	N	Mean Gametocythemia		p value
<i>TLR1</i>	CC	22	155.71	(86.92:278.66)	0.794
	CT	32	169.86	(97.13:297.08)	
	TT	15	203.16	(96.35:428.38)	
	CC	22	154.78	(86.75:275.89)	0.635
	CT+TT	47	178.39	(106.27:299.47)	
<i>TLR4</i>	AA	9	144.03	(57.28:362.13)	0.817
	AG	30	184.01	(105.85:319.90)	
	GG	30	156.96	(89.75:274.51)	
	GG	30	159.33	(91.74:277.00)	0.725
	AA+AG	39	176.09	(104.17:297.67)	
<i>TLR9</i>	CC	21	282.59	(148.41:538.61)	0.092
	CT	25	149.90	(82.02:273.69)	
	TT	22	136.87	(77.71:241.05)	
	TT	22	136.18	(76.48:242.74)	0.232
	CC+TC	46	198.54	(116.75:337.65)	
<i>TIRAP</i>	CC	52	170.72	(103.34:282.31)	0.891
	CT	17	162.23	(80.48:327.01)	
<i>TLR7</i>	AA	52	169.52	(104.48:275.34)	0.926
	AT+TT	17	164.51	(84.35:321.18)	
<i>TLR8</i>	AA	36	148.56	(85.03:259.82)	0.982
	AG+GG	32	149.61	(90.92:245.92)	

General linear models using sex, age, African and European genetic ancestry, period of exposure and past medical history as covariates. Gametocythemia levels are presented as geometric mean (95% CI).

Table 7. Clinical index according to the genotypes of the *TLRs* and *TIRAP* genes.

Polymorphism	Genotypes	N	Clinical Index		P value
<i>TLR1</i>	CC	34	-0.193	(-0.550:0.164)	0.312
	CT	66	0.044	(-0.228:0.316)	
	TT	36	-0.198	(-0.550:0.154)	
	CC	34	-0.190	(-0.548:0.168)	0.404
	CT+TT	102	-0.034	(-0.279:0.211)	
<i>TLR4</i>	AA	28	-0.042	(-0.414:0.329)	0.030
	AG	61	-0.297	(-0.583:-0.011)	
	GG	47	0.175	(-0.133:0.483)	
	GG	47	0.184	(-0.124:0.492)	0.018
	AA+AG	89	-0.211	(-0.462:0.039)	
<i>TLR9</i>	CC	41	-0.119	(-0.458:0.220)	0.771
	CT	57	-0.099	(-0.390:0.192)	
	TT	37	0.025	(-0.326:0.377)	
	TT	37	0.026	(-0.324:0.375)	0.475
	CC+TC	98	-0.107	(-0.356:0.143)	
<i>TIRAP</i>	CC	109	-0.089	(-0.340:0.162)	0.946
	CT	24	-0.044	(-0.455:0.367)	
	TT	3	0.060	(-0.990:1.110)	
	CC	109	-0.087	(-0.337:0.162)	0.779
	CT+TT	27	-0.030	(-0.408:0.349)	
<i>TLR7</i>	AA	103	-0.056	(-0.301:0.189)	0.720
	AT+TT	33	-0.124	(-0.486:0.238)	
<i>TLR8</i>	AA	67	0.004	(-286:0.293)	0.401
	AG+GG	69	-0.132	(-0.398:0.134)	

General linear models using sex, age, African and European genetic ancestry, exposure period, nosological history and parasitemia as covariates. Clinical index was presented as geometric mean (95% CI).