

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

MARIA EDUARDA PEREIRA VIVONE DA SILVA

**POLIMORFISMO NO GENE DE IL6 RELACIONADO A RESPOSTA IMUNE
E SEUS DESFECHOS CLÍNICOS PARA MALÁRIA EM POPULAÇÕES DO
MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS.**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

MARIA EDUARDA PEREIRA VIVONE DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Simone Silva Santos
Thalita Vasconcelos Santos

RIO DE JANEIRO

2025

MARIA EDUARDA PEREIRA VIVONE DA SILVA

**POLIMORFISMOS NO GENE DE IL6 RELACIONADOS A RESPOSTA
IMUNE E SEUS DESFECHOS CLÍNICOS PARA MALÁRIA EM
POPULAÇÕES DA REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS**

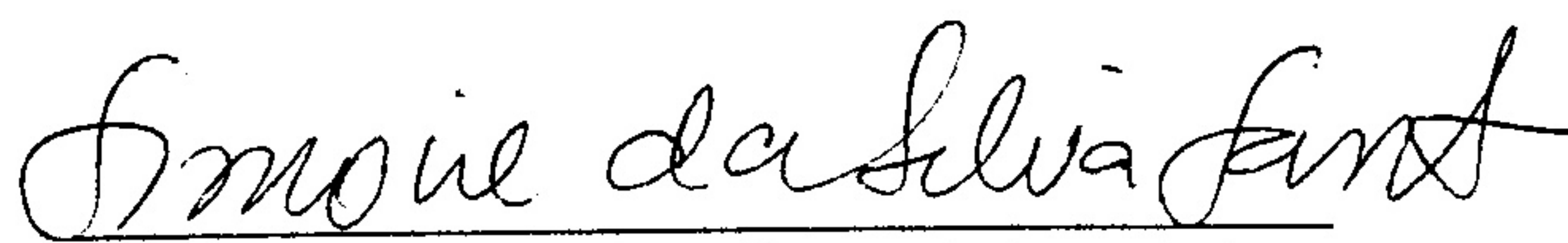
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza
Herdy", como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

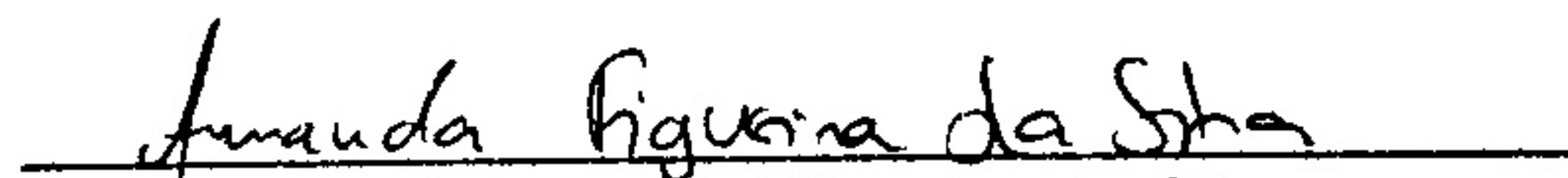
Orientador: Simone Silva Santos.
Thalita Vasconcelos Santos

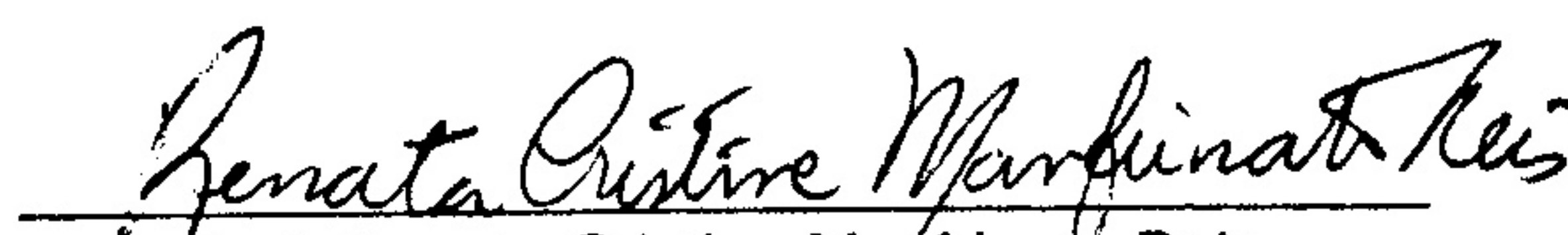
Aprovada em:

Duque de Caxias, 25 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Simone da Silva Santos (orientador)


Prof. Amanda Figueira da Silva


Prof. Renata Cristine Marfrinato Reis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e aos Orixás por me guiarem até aqui. Em todos os momentos em que pensei em desistir, quando o cansaço e a incerteza me visitavam, foram eles que me iluminaram com paz, sabedoria e serenidade para seguir em frente. Sou profundamente grata pela força espiritual que me sustentou e pela luz que me conduziu até a realização deste sonho.

Agradeço à minha família, meu alicerce e porto seguro, por todo o amor, carinho e apoio incondicional. Aos meus pais, por me proporcionarem o privilégio de sonhar e a liberdade de trilhar meu próprio caminho.

À minha mãe, Bárbara, devo absolutamente tudo. Mulher de uma força incomparável, que sempre lutou muito para me criar e me proporcionar tudo o que precisei. Foi ela quem acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava, quem enxugou minhas lágrimas, celebrou minhas pequenas vitórias e me ensinou o verdadeiro significado de amor, coragem e entrega. A criação que recebi dela é o maior presente da minha vida, feita de princípios, sonhos e um amor que me guia todos os dias.

Ao meu pai, Israel, agradeço por me motivar a sempre dar o melhor de mim, por me ensinar o valor da persistência e por me inspirar a lutar pelos meus sonhos, mesmo diante das dificuldades.

À minha avó, Celeste, minha segunda mãe, dedico um agradecimento repleto de amor e admiração. Foi ela quem me ensinou o poder da tranquilidade e da compaixão, quem me mostrou que a força também habita na calma e que o amor se manifesta em gestos simples, mas profundos. Agradeço por cada palavra doce, por cada olhar acolhedor e por ser um exemplo vivo de serenidade e generosidade.

Ao meu avô Atílio, agradeço por todo carinho, apoio e torcida constante, por sempre acreditar em mim e me incentivar a seguir com confiança.

Às minhas madrinhas e tias, agradeço por cada conselho, cada abraço e por sempre me acolherem com tanto amor.

Aos meus amigos, minha segunda família, deixo minha eterna gratidão. Obrigada por iluminarem meus dias, por me encorajarem a seguir, por me ouvirem com paciência e por tornarem cada momento compartilhado algo leve, verdadeiro e inesquecível.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da Fiocruz, expresso minha mais sincera gratidão pela acolhida, aprendizado e convivência. À minha orientadora, Dra. Simone, agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos valiosos, pela paciência e pelo carinho em cada orientação, que foram essenciais para meu crescimento acadêmico e pessoal. À minha coorientadora, Thalita, sou grata por toda a ajuda, por me ensinar com tanta dedicação e por caminhar ao meu lado com leveza e parceria em cada etapa deste trabalho. À Dra. Martha, agradeço pelos ensinamentos, pela confiança e pela oportunidade de fazer parte dessa equipe. E aos meus colegas de laboratório, deixo meu carinho por toda a parceria, amizade e pelas conversas alegres que tornaram a rotina de pesquisa muito mais leve e especial.

E, por fim, um agradecimento especial aos que amo, mas que já não estão mais aqui. Sei que, de algum lugar, continuam me acompanhando, sorrindo e torcendo por mim. Cada lembrança, cada ensinamento e cada gesto de amor permanecem vivos em mim, me dando força para continuar e me lembrando que o amor verdadeiro nunca se despede, pois “pra quem tem fé, a vida nunca tem fim”.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Países e áreas com casos autóctones de malária em 2000 e seu status em 2023.....	2
Figura 2-Ciclo da Malária	3
Figura 3-Mapa de Incidência Parasitária Anual	4
Figura 4-Localização do município de Barcelos, no médio rio Negro, estado de Amazonas.....	8
Figura 5-Tabela de lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária referente à Portaria Interministerial N° 60, de 24 de março de 2015, e à Portaria N°1, de 13 de janeiro de 2014 Ano de referência: 2023, atualizado em 05/07/2024.....	9
Figura 6-Eletroforese do produto de PCR para amplificação da região promotora do gene il6.	15
Figura 7-Eletroforese do produto de PCR purificado.....	15
Figura 8-Identificação do polimorfismo na região promotora do gene que codifica a IL6 na posição após a análise dos alinhamentos no SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems).....	16

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
Figura 1- Países e áreas com casos autóctones de malária em 2000 e seu status em 2023.....	2
Figura 2-Ciclo da Malária	3
Figura 3-Mapa de Incidência Parasitária Anual	4
2 METODOLOGIA	8
Figura 4-Localização do município de Barcelos, no médio rio Negro, estado de Amazonas.....	8
Figura 5-Tabela de lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária referente à Portaria Interministerial N° 60, de 24 de março de 2015, e à Portaria N°1, de 13 de janeiro de 2014 Ano de referência: 2023, atualizado em 05/07/2024.....	9
Tabela 1-Iniciadores usadas para a realização da primeira reação da PCR diagnóstica.	11
Tabela 2-Reagentes e concentrações usadas para realização da primeira reação da PCR diagnóstica.	11
Tabela 3-Perfil térmico usado para a primeira reação da PCR.	11
Tabela 4-Sequência de primers para segunda reação.	11
Tabela 5-Reagentes e concentrações finais usada para realização da segunda reação da PCR nested.	12
Tabela 6-Perfil térmico da segunda reação do PCR diagnóstico.	12
Tabela 7-Sequência de primers para reação de PCR para amplificar a região promotora do gene il6.	12
Tabela 8-Reagentes e concentração usada para realização da PCR para amplificação de parte da região promotora do gene que codifica a IL6.	12
Tabela 9-Perfil térmico do PCR para amplificação do gene il6.	13
3 RESULTADOS	13
Tabela 10 - Relação de sexo, status clínico, espécie parasitária e quantidade de episódios prévios de malária nos indivíduos estudados.	14
Figura 6-Eletroforese do produto de PCR para amplificação da região promotora do gene il6.	15
Figura 7-Eletroforese do produto de PCR purificado.	15
Figura 8-Identificação do polimorfismo na região promotora do gene que codifica a IL6 na posição após a análise dos alinhamentos no SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems).....	16
Tabela 11- Frequência Genotípica e Alélica do SNP rs1800795 de IL6 nas amostras estudadas	18
Tabela 12-Distribuição dos Genótipos de il6 com Variáveis Clínicas e Epidemiológicas	18
4 DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS	22

POLIMORFISMO NO GENE DE IL6 RELACIONADO A RESPOSTA IMUNE E SEUS DESFECHOS CLÍNICOS PARA MALÁRIA EM POPULAÇÕES DA REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS

Maria Eduarda Pereira Vivone da Silva¹

Thalita Vasconcelos Santos²

Martha Cecília Suarez Mutis²

Simone da Silva Santos²

RESUMO

A malária, uma das doenças parasitárias de maior relevância mundial, está concentrada na região amazônica que concentra mais de 99% dos casos autóctones. O estudo teve como objetivo investigar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único na região promotora do gene *il6* e suas possíveis associações com o perfil clínico da malária em indivíduos residentes em Barcelos, um município de alto risco epidemiológico na Amazônia. Foram analisadas 110 amostras de sangue de indivíduos com diferentes históricos de exposição ao *Plasmodium* spp., coletadas entre 2002 e 2019 e armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). A extração do DNA genômico foi realizada pelo método Wizard® Genomic Purification (Promega®), e a detecção molecular do *Plasmodium* spp. foi conduzida por PCR nested. A amplificação de - parte da região promotora do gene *il6* foi seguida de sequenciamento automático de Sanger, permitindo a identificação do polimorfismo -174 G>C (rs1800795). Entre os indivíduos analisados, observou-se predominância do genótipo GG (98,1%) e baixa frequência do genótipo CC (1,8%). O genótipo GG apresentou maior prevalência entre indivíduos nunca malária e com histórico de malária prévia, sugerindo uma possível associação com resposta imune mais eficiente ou controle da infecção, e a presença de sintomas. Esses achados reforçam o papel do *il6* como modulador da resposta inflamatória na malária e a importância de compreender fatores genéticos associados à resistência e susceptibilidade em populações amazônicas, visando aprimorar estratégias de controle e vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: Malária. Infecção assintomática. IL6. Polimorfismo genético. Amazônia

ABSTRACT

Malaria, one of the most significant parasitic diseases worldwide, is largely concentrated in the Amazon region, which accounts for more than 99% of autochthonous cases in Brazil. This study aimed to investigate the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of the *IL6* gene and their possible associations with the clinical profile of malaria in individuals from Barcelos, a municipality classified as a high epidemiological risk area in the Amazon. A total of 110 blood samples from individuals with different histories of exposure to *Plasmodium* spp.

¹Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

were analyzed. Samples were collected between 2002 and 2019 and stored in the biorepository of the Laboratory of Parasitic Diseases at the Oswaldo Cruz Institute (IOC). Genomic DNA extraction was performed using the Wizard® Genomic Purification Kit (Promega®), and molecular detection of *Plasmodium spp.* was carried out through nested PCR. Amplification of part of the *IL6* gene promoter region was followed by Sanger automatic sequencing, allowing the identification of the –174 G>C (rs1800795) polymorphism. Among the analyzed individuals, the GG genotype was predominant (98.1%), while the CC genotype was infrequent (1.8%). The GG genotype showed higher prevalence among individuals with previous or no history of malaria, suggesting a possible association with a more efficient immune response or infection control and symptom modulation. These findings reinforce the role of *IL6* as a key modulator of the inflammatory response in malaria and highlight the importance of understanding genetic factors associated with resistance and susceptibility in Amazonian populations, aiming to improve control strategies and epidemiological surveillance.

Keywords: Malaria. Asymptomatic infection. IL6. Genetic polymorphism. Amazon.

1 INTRODUÇÃO

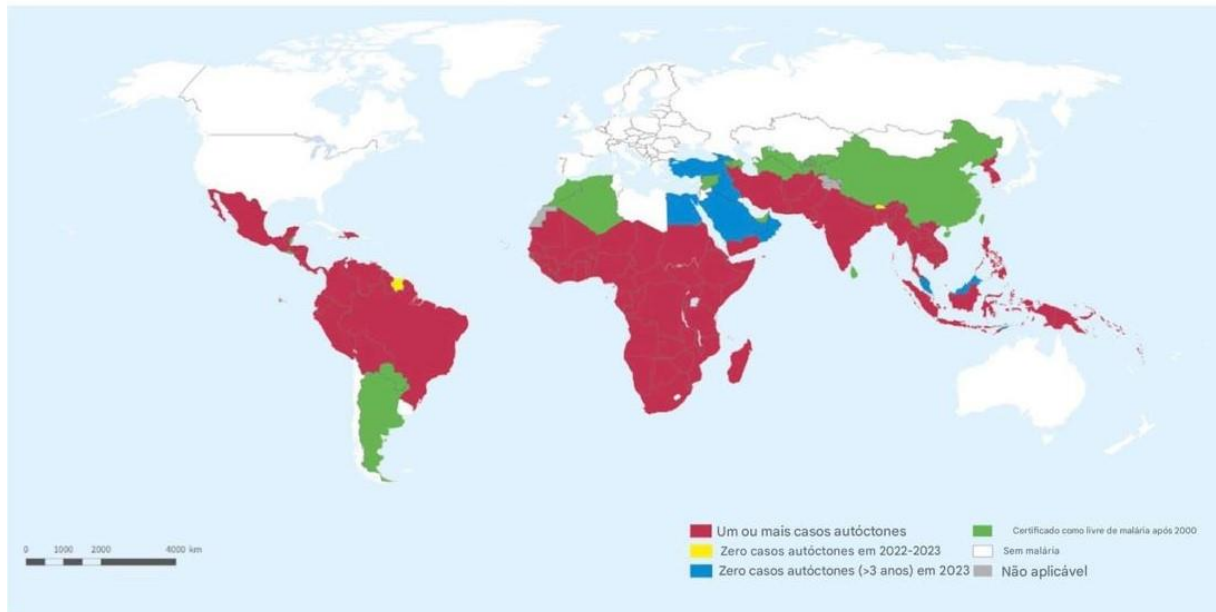
A malária é uma das doenças parasitárias de maior impacto global, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Gomes et al., 2011). Sua transmissão para humanos se dá por meio da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles spp.* infectada com protozoários do gênero *Plasmodium spp.* As espécies mais relevantes do parasito incluem *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* (Rey, 2008). Enquanto o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies mais relevantes do ponto de vista de saúde pública, o *P. malariae* é considerado amplamente subnotificado, particularmente, pela dificuldade de diferenciação com o *P. vivax* no diagnóstico de rotina (Recht et al., 2017). Recentemente foi descrito que o *P. knowlesi*, apesar de ser parasito natural de primatas não humanos, tem causado infecções graves em humanos, principalmente no sudeste asiático (ONG et al., 2009). Da mesma forma, no Brasil também foi encontrado o *P. simium*, outro plasmódio de macacos, causando casos autóctones de malária humana no Rio de Janeiro (Brasil, et al 2017).

A malária é considerada um grave problema de saúde pública e está presente em 83 países (WHO, 2023). A OMS estimou que em 2023 ocorreram 263 milhões de casos de malária globalmente e 619 mil óbitos por conta da infecção. 94% desses casos ocorreram no continente africano, sendo a região mais endêmica para malária no mundo. Em 2023, a região das Américas reportou aproximadamente 505.600 casos de malária, dos quais aproximadamente 92% ocorreram na América do Sul. Brasil, Colômbia e Venezuela registraram, juntos, 76,8% dos casos autóctones (originados na região) no continente sul-americano, com destaque para a região amazônica, que concentra 70% dos casos no continente (WHO, 2023).

No Brasil, a região amazônica é responsável por mais de 99% dos casos autóctones de malária. Em 2023, foram registrados 140.265 casos autóctones no país, representando um aumento de 8,8% em comparação ao ano anterior. Desses, 82,7% foram causados por *Plasmodium vivax*, enquanto 17,3% foram atribuídos a *P. falciparum* e infecções mistas (MS, 2024).

O mapa publicado pela revista world malária report de 2024 mostra como está o status em 2023 dos países e áreas com casos autóctones no ano de 2000. Pode-se observar que os continentes Africano, da América do sul e o sudeste asiático permanecem como os mais endêmicos para malária no mundo (World Health Organization, 2024) (figura1).

Figura 1- Países e áreas com casos autóctones de malária em 2000 e seu status em 2023.



(WORLD MALÁRIA REPORT\OMS, 2024)

A combinação de fatores como grandes áreas de floresta que favorecem a umidade, presença de comunidades mais vulneráveis como comunidades ribeirinhas e indígenas, e atividades econômicas como pesca, agricultura e o garimpo ilegal, contribuem para a manutenção da transmissão da doença na região. A vigilância epidemiológica é fundamental para a eliminação da doença, principalmente na Amazônia, onde a mobilidade populacional pelas fronteiras dificulta esse controle (da Cruz Franco et al., 2019).

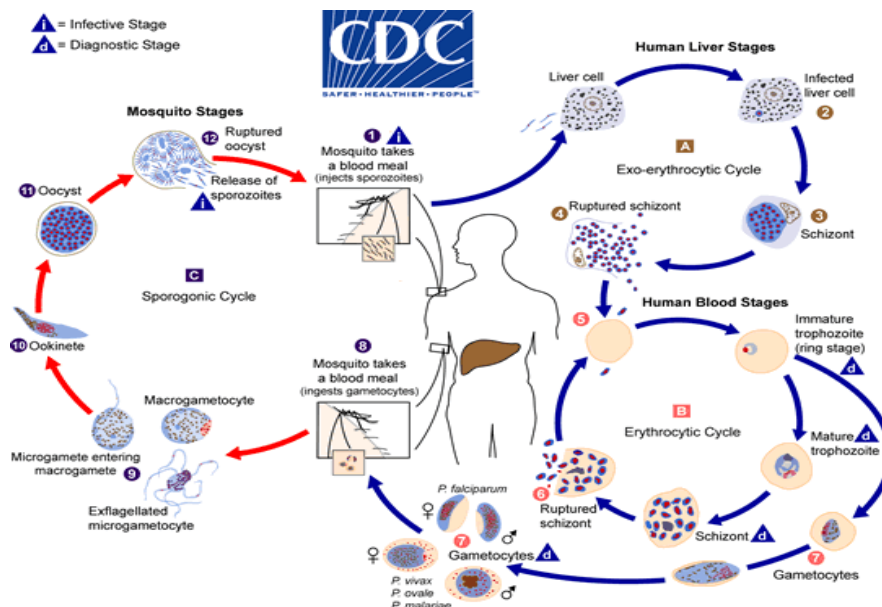
Embora casos graves de *P. vivax* estejam se tornando mais comuns, a maior parte dos casos graves e óbitos ainda é causada por *P. falciparum* (Gomes et al., 2011). Apesar desse fato, nesta região, o número de casos por *P. vivax* é consideravelmente maior e, em muitos casos, de alta complexidade, podendo inclusive levar o indivíduo a óbito. Esse aumento na gravidade dos casos por *P. vivax* tem sido associado ao uso indevido de antimaláricos, como a cloroquina, o que favorece a seleção de parasitas resistentes e dificulta a erradicação do ciclo do parasita no organismo. Essa prática compromete a eficácia do tratamento e contribui

para reinfecções mais frequentes, recaídas e desenvolvimento de formas mais grave da malária (Silva et al., 2020).

O ciclo assexuado do *Plasmodium spp.*, chamado esquizogônico, inicia-se quando o mosquito *Anopheles spp.* injeta esporozoítos no sangue humano. Estes migram rapidamente para o fígado, onde invadem os hepatócitos e dão início à esquizogonia tecidual (fase pré-eritrocítica), que dura cerca de seis dias para *P. falciparum*, oito dias para *P. vivax* e até 15 dias para *P. malariae*. Nessa fase, *P. vivax* e *P. ovale* podem formar hipnozoítos, responsáveis por recaídas da doença. Ao final do ciclo hepático, os esquizontes rompem os hepatócitos, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea. (MS, 2005).

Os merozoítos invadem as hemácias, iniciando o ciclo eritrocitário. *P. malariae* infecta hemácias envelhecidas, *P. vivax* prefere hemácias jovens e *P. falciparum* invade hemácias em qualquer estágio. Dentro das hemácias, o parasito evolui até a forma de esquizonte, quando ocorre a multiplicação e a liberação de novos merozoítos. A ruptura das hemácias causa os sintomas do paroxismo malárico, com periodicidade de 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax*, e 72 horas para *P. malariae* (MS, 2005).

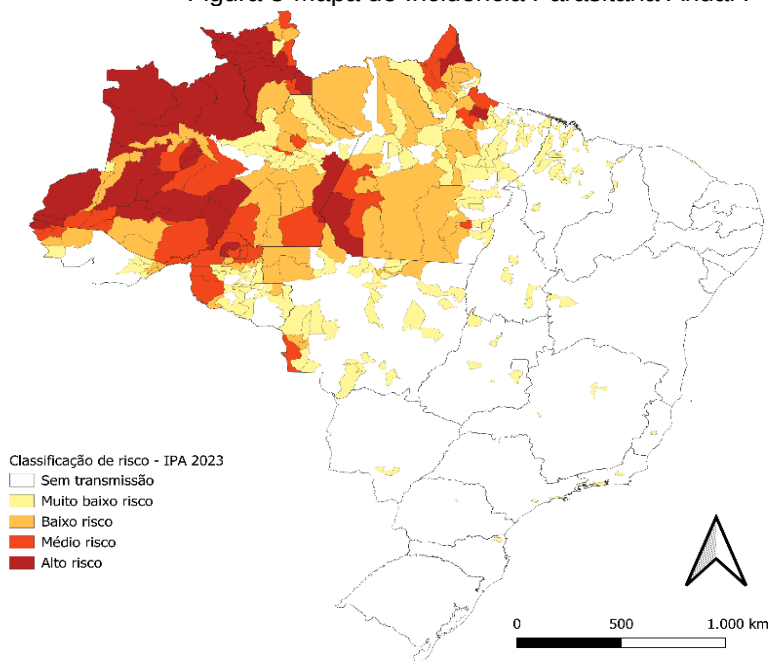
Figura 2-Ciclo da Malária



(CDC, 2020.)

Em pessoas sem imunidade prévia, os sintomas geralmente surgem de 10 a 15 dias após a infecção. Os sinais iniciais como febre, dor de cabeça e calafrios, são inespecíficos, o que pode atrasar o diagnóstico. Quando não tratada nas primeiras 24 horas, a infecção por *P. falciparum* pode evoluir rapidamente para formas graves com risco elevado de morte. Em crianças, as manifestações severas incluem anemia intensa, dificuldade respiratória e malária cerebral; em adultos, há maior risco de comprometimento sistêmico. Em regiões endêmicas, a exposição frequente ao parasita pode induzir imunidade parcial nos indivíduos, levando a infecções assintomáticas (OPAS/OMS, 2023).

Figura 3-Mapa de Incidência Parasitária Anual .



Classificação de Incidência Parasitária Anual (IPA): Sem transmissão- 0 casos autóctones; Muito baixo risco- IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA<10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA<50 casos/1.000 habitantes; Alto risco- IPA≥ 50 casos/1.000 habitantes. Data de atualização de dados: 01 de outubro de 2024. Fonte: Adaptado de Sivep-Malária e Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS, 2024.

A patogênese da malária é complexa e a apresentação clínica é caracterizada por um amplo espectro que vai desde as formas assintomáticas até a doença grave, podendo chegar à morte. Todo indivíduo está sujeito à infecção, e alguns chegam a apresentar vários episódios da doença, o que pode causar um estado de imunidade

parcial, denominado de imunidade clínica, que causa quadros oligossintomáticos, subclínicos ou assintomáticos. Entretanto, os fatores que fazem com que um indivíduo tenha infecção assintomática ou desenvolva a doença grave, ainda não estão totalmente esclarecidos (MS, 2021).

Os fatores genéticos influenciam muito a variação clínica e epidemiológica da malária. Fatores relacionados tanto ao parasita como variação antigênica, citoaderência e resistência a medicamentos, quanto ao hospedeiro como a produção de citocinas inflamatórias, moldam a resposta imune (Min-Oo & Gros, 2005). A suscetibilidade à doença envolve componentes hereditários e adquiridos, e diversos polimorfismos genéticos em humanos já foram associados à patogênese e à resposta clínica à infecção (Kwiatkowski, 2005). A malária foi uma das primeiras doenças a ser amplamente estudada do ponto de vista genético, revelando diversos loci associados à resistência, muitos deles em genes que codificam citocinas (McGuire et al., 1994; Kwiatkowski et al., 1993; Stirnadel et al., 1999; Dodo et al., 2002; MalariaGen, 2008).

Em regiões de alta endemicidade, como a África Subsaariana, a pressão seletiva exercida pelo *Plasmodium falciparum* ao longo de séculos favoreceu o surgimento e a manutenção de variantes genéticas que conferem proteção parcial contra as formas graves da doença, como o traço falciforme (HbS) e a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Essas adaptações genéticas representam respostas evolutivas a uma pressão seletiva intensa, nas quais mutações que reduzem a gravidade da infecção aumentaram a sobrevivência e, conseqüentemente, a frequência dessas variantes nas populações afetadas (Allison, 2009; Jallow et al., 2018; Schiess et al., 2020).

De forma complementar, os polimorfismos em genes de citocinas, também surgiram a partir de mutações espontâneas ao longo da evolução humana e foram mantidos por pressões seletivas associadas à resposta imune (Armantieri et al., 2019; Curtis; Kamboj, 2020). Diferentemente das variantes genéticas clássicas diretamente relacionadas à resistência à malária, como o traço falciforme e a deficiência de G6PD, esses polimorfismos afetam regiões regulatórias dos genes, modulando a expressão e a produção de citocinas (Fernandes et al., 2018), os quais contribuem para diferentes perfis de resistência ou susceptibilidade a infecções entre populações humanas (Pritchard; Pickreel; Coop, 2010; Rasquinha et al., 2022).

Em contrapartida, na região amazônica, onde a transmissão da malária é mais instável e ocorre predominantemente por *Plasmodium vivax*, o cenário genético é

distinto. A menor pressão seletiva parasitária faz com que variantes clássicas associadas à resistência, como HbS e G6PD, apresentem menor prevalência e relevância clínica. Nesses contextos, estudos realizados em populações amazônicas identificaram polimorfismos em genes como *il10*, *tlr4*, *lta*, *il6* e *il12*, associados à modulação da resposta imune e à evolução clínica da infecção, influenciando a susceptibilidade a formas sintomáticas ou assintomáticas da doença (Santos et al., 2012; Silva et al., 2021, Santos TV 2023)

Essas diferenças regionais evidenciam a importância de compreender os fatores genéticos que modulam a resposta imune em diferentes contextos endêmicos, uma vez que o impacto de um mesmo polimorfismo pode variar conforme a intensidade da transmissão, a espécie predominante de *Plasmodium spp.* e o histórico evolutivo da população. Enquanto em regiões africanas genes relacionados à hemoglobina e à imunorregulação desempenham papel central na resistência à malária, nas regiões amazônicas as variações em genes de citocinas parecem ter maior relevância na determinação da gravidade clínica e da susceptibilidade à infecção. Assim, investigar polimorfismos em genes imunorreguladores, como genes que codificam citocinas, é essencial para compreender a variabilidade da resposta inflamatória e os mecanismos de resistência e susceptibilidade entre diferentes populações, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção mais eficazes e adaptadas a cada realidade epidemiológica (Segbefia et al., 2024).

A interleucina 6 é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica, ou seja, dependendo da sua concentração pode auxiliar no processo de cura ou exacerbar a infecção. Ela é produzida por várias células do sistema imune, como macrófagos, células T, B e dendríticas, e estimula a produção de proteínas de fase aguda, como fibrinogênio, proteína C reativa e haptoglobina. Também promove a diferenciação de linfócitos T CD4+ e a ativação da resposta inflamatória (Tanaka et al., 2014). Citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina 6 (IL6), podem agravar a doença, enquanto citocinas anti-inflamatórias ajudam a conter a inflamação e favorecem a recuperação (Hashmi et al., 2023).

Durante a infecção por *Plasmodium spp.*, a IL6 é rapidamente induzida, principalmente em resposta à lise de hemácias (na fase sanguínea do ciclo) e liberação de antígenos parasitários como a hemozoína, além da presença do DNA do parasito (Mancilla-Galindo et al., 2021). Esses antígenos ativam receptores como os

TLRs, desencadeando cascatas inflamatórias (Gowda, 2007). Embora essencial para controlar a infecção, o excesso de IL6 pode piorar o quadro clínico, estando associado em estudos anteriores a formas graves, como malária cerebral e anemia severa (Lyke et al., 2004; Armah et al., 2005). A IL6 também pode comprometer a barreira hematoencefálica e facilitar o acúmulo de células inflamatórias no cérebro, agravando os sintomas neurológicos (John et al., 2008). Outros genes, que codificam citocinas como *tnf-alfa*, *il10* e *il12*, também apresentam polimorfismos que modulam a resposta inflamatória e influenciam a gravidade da malária (McGuire et al., 1999; Walther et al., 2009). A interação entre variantes genéticas, fatores ambientais e o perfil genético da população impacta diretamente os desfechos clínicos, justificando a importância de abordagens personalizadas para o controle da doença (Alamad et al., 2024).

Os polimorfismos são variações genéticas podendo ser de deleção e inserção de nucleotídeos, troca de bases nitrogenadas e entre outros. Porém o mais frequente são os polimorfismos de base única (SNPs) que são os polimorfismos de nucleotídeo único, onde só há alteração em um nucleotídeo. Eles são mais frequentes pois ocorrem em 1 a cada 100 pares de base e estão presentes em mais de 1% da população (Nutritotal Pro, 2013). SNPs localizados nas regiões promotoras desses genes podem influenciar a expressão gênica, resultando em concentrações aumentadas ou reduzidas das citocinas. No gene *il6*, um dos SNPs regulatórios mais estudados é o rs1800795 (-174G>C). O alelo G está associado a uma expressão mais alta de IL6, enquanto o alelo C leva a níveis mais baixos (Fishman et al., 1998). Indivíduos com o alelo G tendem a apresentar respostas inflamatórias mais intensas nas primeiras 72 horas, o que pode ser útil para o controle do parasita, mas também aumenta o risco de dano tecidual e complicações graves (Awandare et al., 2006; Kwiatkowski, 2005).

A produção de citocinas é modulada por mecanismos genéticos, e diversos polimorfismos em genes codificadores de citocinas têm sido associados à resistência ou susceptibilidade à infecção (Pritchard; Pickrell; Coop, 2010; Rasquinha et al., 2022). A caracterização detalhada desses SNPs pode proporcionar uma compreensão mais aprofundada do papel específico das citocinas na fisiopatologia da malária, bem como de sua relação com fatores do hospedeiro que determinam o desenvolvimento de quadros assintomáticos ou de resistência à infecção.

No Brasil, ainda existem poucos estudos relacionando polimorfismos no gene IL6 e malária, porém, pesquisas realizadas em outras regiões demonstraram que

variantes genéticas nesse gene estão associadas a níveis elevados dessa citocina em formas graves da doença (Sortica et al., 2014; Mendes-Santos et al., 2022). Estudos apontam que alterações na expressão gênica de IL6 estão associadas tanto à proteção quanto à patogênese da malária, podendo, portanto, influenciar a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção (Kumar et al., 2019).

A proposta deste projeto é altamente relevante ao integrar conhecimentos epidemiológicos e genéticos em uma área crítica para o controle da malária no Brasil, como Barcelos, na região amazônica. O estudo visou investigar a ocorrência de um SNP na região promotora do gene *il6*, por meio de sequenciamento automático de DNA, em uma população frequentemente exposta à infecção por *Plasmodium spp.*, com o objetivo de identificar SNPs conhecidos relacionados à resposta imune precoce e compreender seus possíveis papéis na susceptibilidade ou resistência à malária.

2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado no município de Barcelos que está localizado no médio rio Negro, Amazonas. Segundo o último censo do IBGE realizado em 2022, esse município tem 18.831 habitantes, com uma densidade demográfica de 0,15 habitantes por km² (IBGE, 2023). Barcelos é uma área altamente endêmica para malária. Em 2023, o município de Barcelos registrou 6.989 casos de malária, sendo 3.508 predominantemente por *Plasmodium vivax* e a Incidência Parasitária Anual (IPA) que é utilizada pelo Programa Nacional de Controle e Prevenção da Malária (PNCM) para estimar o risco de ocorrência anual de malária no território, de 371.1. Mantendo-se como um município de alta endemicidade (SES-AM, 2024; MS, 2024)

Figura 4-Localização do município de Barcelos, no médio rio Negro, estado de Amazonas.



(Suárez-Mutis, 2007.)

Figura 5-Tabela de lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária referente à Portaria Interministerial N° 60, de 24 de março de 2015, e à Portaria N°1, de 13 de janeiro de 2014 Ano de referência: 2023, atualizado em 05/07/2024.

Código	Município provável de infecção	UF de infecção	2021	2022	2023	Média	População 2023	IPA 2023
120020	Cruzeiro do Sul	AC	4.498	2.665	3.158	3.440,3	91.888	34,4
120025	Epitaciolândia	AC	1	0	0	0,3	18.757	0,0
120030	Feijó	AC	1	0	0	0,3	35.426	0,0
120032	Jordão	AC	2	1	0	1,0	9.222	0,0
120033	Mâncio Lima	AC	1.317	2.108	1.297	1.574,0	19.294	67,2
120035	Marechal Thaumaturgo	AC	35	15	2	17,3	17.093	0,1
120038	Plácido de Castro	AC	84	177	111	124,0	16.560	6,7
120039	Porto Walter	AC	249	40	32	107,0	10.735	3,0
120040	Rio Branco	AC	60	44	19	41,0	364.756	0,1
120042	Rodrigues Alves	AC	1.732	813	414	986,3	14.938	27,7
120043	Santa Rosa do Purus	AC	1	0	0	0,3	6.723	0,0
120045	Senador Guiomard	AC	207	118	87	137,3	21.454	4,1
120050	Sena Madureira	AC	0	1	0	0,3	41.343	0,0
120060	Tarauacá	AC	138	74	45	85,7	43.467	1,0
120070	Xapuri	AC	1	0	0	0,3	18.243	0,0
120080	Porto Acre	AC	25	11	8	14,7	16.693	0,5
130002	Alvarães	AM	1.064	1.157	2.204	1.475,0	15.866	138,9
130006	Amaturá	AM	5	2	11	6,0	10.819	1,0
130010	Anori	AM	1	0	0	0,3	17.194	0,0
130014	Apuí	AM	269	587	359	405,0	20.647	17,4
130020	Atalaia do Norte	AM	1.796	3.006	2.581	2.461,0	15.314	168,5
130030	Autazes	AM	21	16	6	14,3	41.564	0,1
130040	Barcelos	AM	10.461	6.663	6.989	8.037,7	18.834	371,1
130050	Barreirinha	AM	0	1	29	10,0	31.051	0,9
130060	Benjamin Constant	AM	0	50	104	57,0	27.640	2,0

(Ministério da Saúde, 2024 – Adaptado).

Foram analisadas 110 amostras de indivíduos que foram coletadas entre 2002 e 2019, e que estão no biorrepositório do Laboratório de Doenças Parasitárias-IOC. As amostras foram separadas e classificadas considerando a característica clínica dos indivíduos e as respostas do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) nos seguintes subgrupos: indivíduos com malária clínica, infecção assintomática, pessoas

com malária pregressa e indivíduos que nunca tiveram malária, apesar de morarem na área endêmica. As amostras foram coletadas durante vários estudos seccionais realizados neste município, nas áreas urbanas de São Francisco e São Sebastião, e na área rural do município, no rio Padauari. Para inclusão dos participantes do estudo, foram usadas duas estratégias metodológicas, onde os indivíduos foram recrutados a participar, incluindo as crianças maiores de dois anos de idade, através da busca passiva de casos de malária nas unidades de saúde, e da busca ativa com rastreamento domiciliar de cada um dos casos infectados (Santos, 2012). O exame de gota espessa foi realizado em todas as pessoas que consentiram sua participação no estudo. Em seguida foram coletados 5mL de sangue periférico em tubo a vácuo com o anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e congelado à – 20°C.

Definição dos grupos de estudo: Malária clínica: foi definida pelo exame positivo de gota espessa para qualquer uma das duas espécies de *Plasmodium* spp. e associada aos sintomas clínicos da doença apresentados pelo indivíduo. Infecção assintomática: definida como todos os indivíduos positivos para *Plasmodium* spp. na gota espessa e/ou no diagnóstico por PCR, e que não tinham apresentado sintomas característicos da doença 30 dias antes e 30 dias depois da coleta da amostra biológica, e sem ter tomado medicamentos antimaláricos nem antibióticos no mesmo período. Essas são as definições usadas pelo Grupo Brasileiro de Consensos em estudos de infecção plasmodial assintomática. Nunca malária: Indivíduos a princípio sem antecedentes de sintomas clínicos característicos da malária em qualquer momento da vida, mesmo morando em áreas de alta endemicidade. História de malária prévia: indivíduos que foram diagnosticados por qualquer espécie de *Plasmodium* spp. no passado, porém que não estavam infectados no momento da coleta da amostra sanguínea.

Foi realizada extração de DNA genômico a partir de 300µL do sangue total através da utilização do kit comercial Wizard® Genomic Purification (Promega®) conforme o protocolo do fabricante. Após a extração do DNA foi realizada a leitura e quantificação do DNA genômico pelo equipamento fluorômetro Qubit seguindo o protocolo dos kits comerciais utilizados, Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) (Invitrogen®).

A Reação em Cadeia da Polimerase para diagnóstico do *Plasmodium spp.* é uma reação de PCR aninhada (nested) baseada no protocolo de Snounou *et al* (1993) com algumas modificações (Suárez-Mutis *et al.* 2007). A primeira amplificação é realizada para identificação do fragmento gênero-específico *Plasmodium spp.*, a segunda reação é amplificação de um fragmento espécie-específico (*P. vivax* e *P. falciparum*). Neste caso, por ser uma reação em nested, não é realizada a eletroforese entre a primeira e segunda reação para evitar contaminação. Para a primeira PCR para identificação de gênero serão utilizados os seguintes primers.

Tabela 1-Iniciadores usadas para a realização da primeira reação da PCR diagnóstica.

Iniciador	Sequência Gênero <i>Plasmodium</i>
rPLU5	5' CTT GTT GCC TTA AAC TTC-3'
rPLU6	5' TTA AAA TTG CAG TTA AAA CG-3'

Tabela 2-Reagentes e concentrações usadas para realização da primeira reação da PCR diagnóstica.

Reagentes	Concentração
Tampão Taq Polimerase	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,5Mm
dNTPs (200mM)	200µM
Primer 1 (PLUS5) (10µM)	5pmol
Primer 2 (PLUS6) (10µM)	5pmol
Taq-Polimerase (invitrogen) (5U/µL)	5U/ µL
Amostra de DNA	10-15 ng/ µL
H2O milli-Q	Volume final 25 µL

Foram inseridos o controle positivo (*P. vivax* e *P. falciparum*) e negativo (H₂O) em cada reação. A primeira reação de PCR gênero-específica foi realizada segundo o perfil térmico.

Tabela 3-Perfil térmico usado para a primeira reação da PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5min	1
94°C	1min	25
58°C	2min	
72°C	2min	
72°C	5min	1
4°C	∞	

Para a segunda reação foram utilizados os seguintes primers:

Tabela 4-Sequência de primers para segunda reação.

Iniciador	Sequência
-----------	-----------

rVIV1 rVIV2	Gênero <i>P.vivax</i> 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3
rFAL1 rFAL2	Gênero <i>P.falciparum</i> 5'-TAA AAC TGG TTT GGG AAA ACC TAT ATT-3' 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'

Os reagentes com as respectivas concentrações finais (tabela 5) e o perfil térmico da segunda reação da PCR diagnóstica (tabela 6) foram:

Tabela 5-Reagentes e concentrações finais usada para realização da segunda reação da PCR nested.

Reagentes	Concentração
Tampão Taq Polimerase	1X
MgCl ₂ (50mM)	1,5Mm
dNTPs(10μM)	120 μM
Primer 1 (10μM)	5pmol
Primer 2 (10μM)	5pmol
Taq-Polimerase (invitrogen) (5U/μL)	1U/ μL
Produto de PCR(1° reação)	1 μL
H2O milli-Q	Volume final 25 μL

Tabela 6-Perfil térmico da segunda reação do PCR diagnóstico.

Temperatura(°C)	Tempo	Ciclos
95°C	5min	1x
94°C	1min	30x
65°C	2min	
72°C	2min	
72°C	5min	1x
4°C	∞	

O resultado da amplificação foi visualizado através de luz UV após a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com corante intercalante de DNA Blue Green Loading Dye (Sinapse Biotecnologia) (0,5 mg/ml). O tamanho da banda esperada para *P. vivax* foi de 120pb, e para *P. falciparum* foi de 205pb.

Posteriormente foi realizada a PCR para amplificação de parte da região promotora do gene que codifica a citocina IL6 pelo método de PCR convencional. As reações de PCR foram feitas utilizando o termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf®). Os primers foram previamente desenhados por Xiao-Fen Zhao e cols. (2022). As sequências dos primers utilizados estão na tabela 7.

Tabela 7-Sequência de primers para reação de PCR para amplificar a região promotora do gene il6.

Iniciador	Sequência
IL6 UP	5' AGA CAT GCC AAA GTG CTG AG 3'
IL6 DWN	5' CCT GGA GGG GAG ATA GAG CT 3'

Tabela 8-Reagentes e concentração usada para realização da PCR para amplificação de parte da região promotora do gene que codifica a IL6.

Reagentes	Concentração
Enzima Platinum hot start	0.6U
Primer IL6 UP	5pmol
Primer IL6 DWN	5pmol
Amostra de DNA	30ng
Tampão 10x	5X
DNTP	200µM
MgCl ₂	1.6µL
Água Mili-Q	volume final 50µL

A reação de PCR foi realizada segundo o perfil térmico:

Tabela 9-Perfil térmico do PCR para amplificação do gene il6.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	2min	14x
95°C	30seg	
64°C	30seg	
72°C	1min	
95°C	30seg	30x
55°C	30seg	
72°C	1min	
72°C	30seg	
12°C	∞	

Após realizado o PCR para amplificação da região promotora, foi feita a purificação do produto amplificado e, posteriormente feito o gel da purificação. Por fim, foi realizado o sequenciamento das amostras purificadas, pelo método de Sanger.

3 RESULTADOS

Um total de 110 amostras de indivíduos foram incluídos no estudo. A idade mediana observada foi de 19 anos, variando de 2 a 81 anos. Dentre os 110 indivíduos, 44,5% (49/110) eram do sexo masculino e 55,5% (61/110) do sexo feminino, não havendo casos sem informação de sexo.

Os participantes foram classificados entre pessoas que nunca tiveram malária (“controles”, n = 39) e pessoas com “qualquer malária” (n = 71, 64,5%). Este último grupo foi subdividido em três categorias:

- História de malária prévia: Pessoas que não estavam infectadas no momento da coleta do sangue, e que tiveram episódios clínicos anteriores de malária. Esses episódios foram verificados através das fichas de notificação de caso do Programa Nacional de Controle de Malária (n = 36 indivíduos, 32,7%)
- Malária clínica: pessoas com sintomas atribuídos a malária e infecção por *Plasmodium spp.* (n = 8 indivíduos, 7,3%)
- Infecção assintomática: pessoas sem sintomas clínicos, mas com infecção plasmodial (n = 27 indivíduos, 24,5%).

Entre os indivíduos com histórico de malária (n = 71), podendo estes estar ou não infectados no momento da coleta, observou-se que 37,2% (41/110) relataram nenhum episódio prévio; 31,8% (35/110) tiveram de 1 a 3 episódios; 13,6% (15/110) relataram entre 4 e 6 episódios; e 13,6% (15/110) apresentaram sete ou mais infecções anteriores. Em 2,7% (3/110) das amostras, o número de episódios prévios não foi informado (tabela 10).

Entre os indivíduos infectados no momento da coleta (n = 35, somando infecção assintomática e sintomáticos), as espécies identificadas foram: *Plasmodium falciparum* em 19 (17,3%), *P. vivax* em 11 (10,0%), e infecções mistas (*Pv* + *Pf*) em 5 (4,5%). Os demais 73 indivíduos (66,3%) não apresentaram infecção detectável no momento da análise. Todas as amostras foram confirmadas por meio do PCR para *Plasmodium spp.* (tabela 10).

Tabela 10 - Relação de sexo, status clínico, espécie parasitária e quantidade de episódios prévios de malária nos indivíduos estudados.

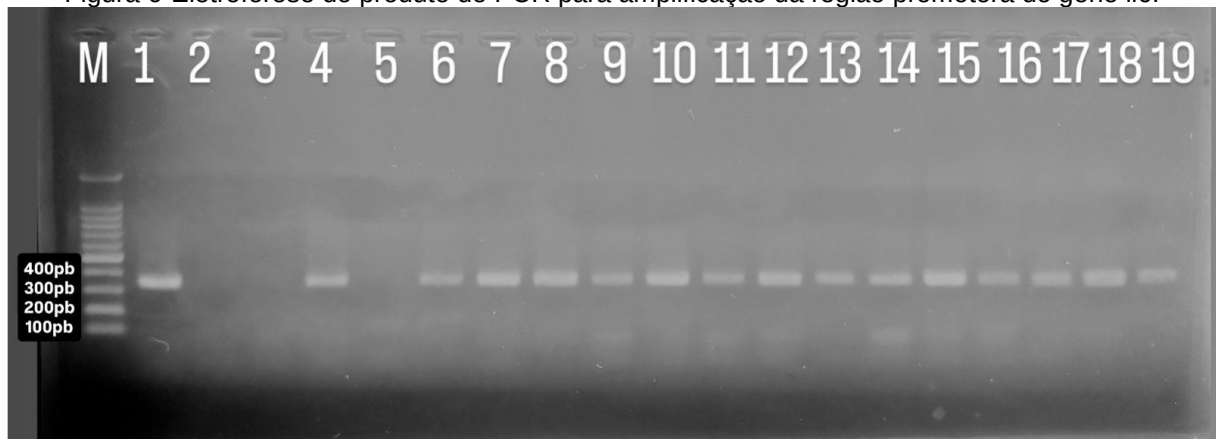
Variáveis	Total (N = 110)	%
Sexo		
Masculino	49	44,5
Feminino	61	55,5
Idade (mediana - anos)	19 anos	
Malária prévia		
Sim	68	61,8
Não	42	38,2
Número de malária prévia		
0	41	37,2
1-3	35	31,8
4-6	15	13,6
>=7	15	13,6
SEM DADOS	3	2,7
Status clínico		
Infecção Assintomática	27	24,5
Sintomáticos	8	7,3
Não infectados	36	32,7
Controles	39	35,5
<i>P. vivax</i>	11	10
<i>P. falciparum</i>	19	17,3
Mista	5	4,5
Não infectados	36	32,7

Neste estudo mapeamos, por meio do sequenciamento automático de DNA pelo método de Sanger, parte da região promotora do gene que codifica para a

citocina IL6. Após a identificação do polimorfismo rs1800795, descrevemos as frequências alélicas e genotípicas encontradas e investigamos a possível associação delas com diferentes desfechos após a infecção pelo *Plasmodium spp.*

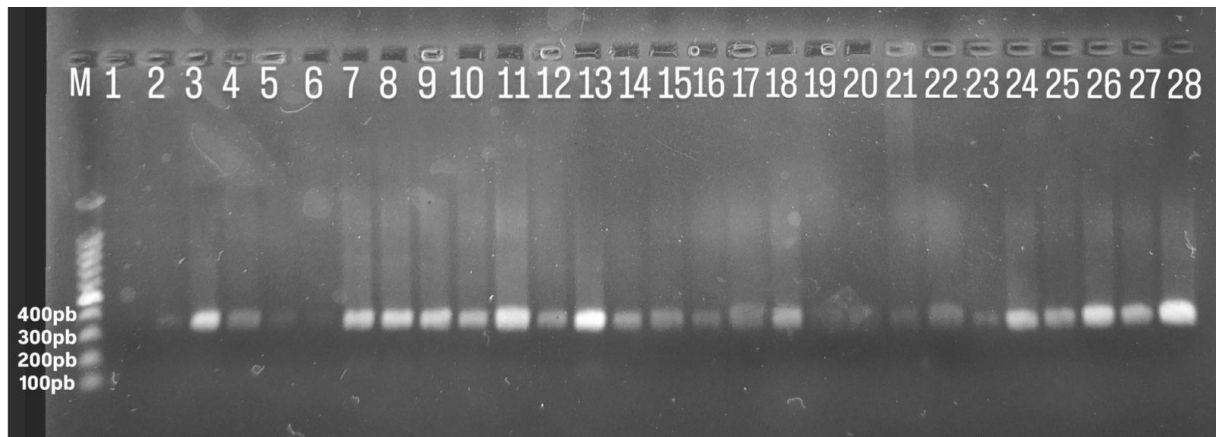
Uma vez otimizadas as condições da reação de PCR, foi realizada a amplificação da parte da região promotora, gerando um fragmento de aproximadamente 340pb (Figura 06). Os produtos de PCR foram purificados (figura 07) e submetidos à reação de sequenciamento direto para obter a sequência completa dos fragmentos amplificados. As sequências obtidas foram analisadas utilizando programa SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems). Nas análises, a sequência AF048692 (Genbank/SNP Data Base) foi usada como referência no alinhamento e foi possível identificar e mapear a região de interesse e identificar o SNP rs1800795 -174 G>C/A nesta região do gene *il6* na população de estudo (Figura 08).

Figura 6-Eletroforese do produto de PCR para amplificação da região promotora do gene *il6*.



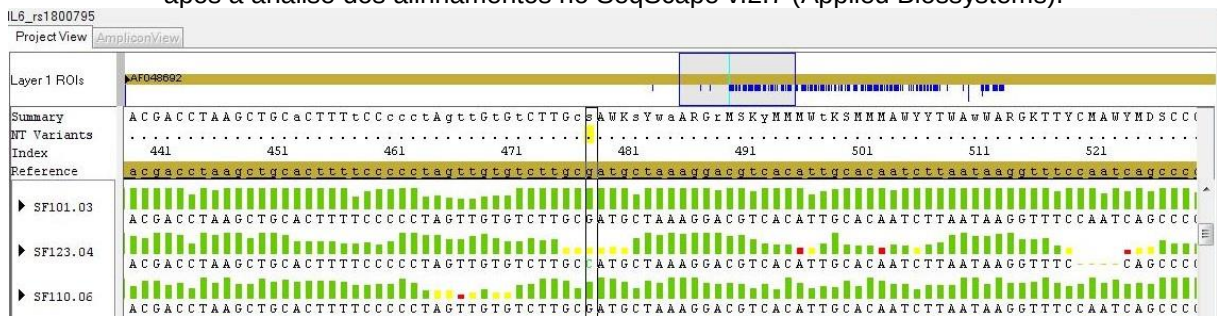
Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação de parte da região promotora do gene que codifica a IL6 (340pb). Amostras clínicas de 1-19; M: marcador de peso molecular 100bp ladder (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).

Figura 7-Eletroforese do produto de PCR purificado.



Gel de agarose 1,5% mostrando a purificação dos produtos PCR referentes de parte da região promotora do gene que codifica a IL16. Amostras clínicas de 1-28; M: marcador de peso molecular 100bp ladder (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).

Figura 8-Identificação do polimorfismo na região promotora do gene que codifica a IL6 na posição após a análise dos alinhamentos no SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems).



Após análises, foram identificados somente os alelos G e C nessa posição e não foram identificados indivíduos heterozigotos GC. Identificaram-se dois genótipos principais: GG, presente em 98,1% (108/110) dos participantes, com mediana de idade de 18 (IIQ 11–34,5) anos, e CC, em 1,8% (2/110), com mediana de idade de 38 (IIQ 33–43) anos. A análise estatística não demonstrou associação significativa entre o sexo e a distribuição dos genótipos GG e CC ($p > 0,05$) (tabela 12). Em relação à frequência alélica, observou-se que o alelo G apresentou frequência de 0,98 (98,2%), enquanto o alelo C apresentou frequência de 0,01 (1,8%) (tabela 11). Não foram encontradas diferenças significativas na mediana da idade entre os dois grupos genotípicos.

Do total de 108 indivíduos com o genótipo GG, 43,5% eram do sexo masculino e 56,5% do sexo feminino; já entre os dois indivíduos portadores do genótipo CC, ambos eram do sexo masculino (100%). Assim, a frequência do genótipo GG foi maior

no sexo feminino quando comparado ao masculino, enquanto o genótipo CC foi observado apenas no sexo masculino ($p = 0,02$).

Em relação à história prévia de Malária, o genótipo GG está presente em, 62% (67/108) dos indivíduos com histórico prévio de malária, podendo estar ou não infectados no momento da coleta, enquanto 38% (41/108) não apresentaram relato prévio da doença (tabela 12). Entre os indivíduos com genótipo CC, 100% (2/2) relataram malária prévia, sendo um indivíduo não infectado no momento da coleta e um indivíduo infectado no momento da coleta.

Em relação ao status clínico, o genótipo GG foi observado em 36,1% (39/108) dos indivíduos do grupo nunca malária, 6,5% (7/108) no grupo malária clínica, sendo 0,9% (1/108) infectados por *P. vivax*, 4,6% (5/108) por *P. falciparum* e 0,9% (1/108) por infecção mista; 25% (27/108) pertenciam ao grupo de infecção assintomática, sendo 9,2% (10/108) infectados por *P. vivax*, 12% (13/108) por *P. falciparum* e 3,7% (4/108) por infecção mista; e 32,4% (35/108) pertenciam ao grupo não infectado. Já o genótipo CC foi observado em 50% (1/2) dos indivíduos do grupo malária clínica, infectado por *P. falciparum*, e em 50% (1/2) no grupo não infectado.

Conforme mostrado na figura 11, o genótipo GG foi o mais frequente entre os indivíduos analisados, sendo mais comumente observado nos grupos controle (36,1%), não infectados (32,4%) e assintomáticos (25%). Já o genótipo CC foi identificado apenas em dois indivíduos, distribuídos igualmente entre os grupos sintomático (50%) e não infectado (50%).

Esses achados indicam que o genótipo GG apresenta maior prevalência entre indivíduos nunca malária e com histórico de malária prévia, sugerindo uma possível associação com resposta imune mais eficiente ou controle da infecção, e a presença de sintomas. Embora a diferença entre os genótipos não tenha alcançado significância estatística robusta, observa-se uma tendência de o alelo G estar relacionado a um perfil de menor suscetibilidade clínica, considerando sua predominância em indivíduos controles e não infectados.

Também foi observado que indivíduos com infecção assintomática tinham maior chance de portar o genótipo GG, quando comparado com o genótipo CC, indicando que o alelo G pode conferir uma predisposição à infecção malárica, especialmente em casos de infecção por *P. falciparum*, entretanto, com ausência de sinais e sintomas.

O genótipo CC, por sua vez, foi identificado em apenas dois indivíduos da amostra total, o que impossibilita a realização de análises estatísticas robustas e sua associação com status clínico ou espécie parasitária. A baixa frequência desse genótipo na população estudada pode sugerir que o alelo C apresenta ocorrência rara e, portanto, sua influência sobre a resposta imune à infecção malárica não pôde ser devidamente avaliada neste grupo.

Tabela 11- Frequência Genotípica e Alélica do SNP rs1800795 de IL6 nas amostras estudadas

Genótipo	Número	Percentual (%)	Alelo	Frequência Alélica	Percentual (%)
GG	108	98,1	G	0,98	98,2
CC	2	1,8	C	0,01	1,8
TOTAL	110	100			100

Tabela 12-Distribuição dos Genótipos de il6 com Variáveis Clínicas e Epidemiológicas

Variáveis	GG (N = 108)	%	CC (N = 2)	%
Sexo				
Masculino	47	43,5	2	100
Feminino	61	56,5	0	0
Idade (mediana - anos)	18 anos		38 anos	
Malária prévia				
Sim	67	62	2	100
Não	41	38	0	0
Número de malária prévia				
0	41	38	0	0
1-3	35	32,4	0	0
4-6	14	13	1	50
>=7	15	13,8	1	50
SEM DADOS	3	2,7	0	0
Status clínico				
Infecção assintomática	27	25	0	0
Sintomáticos	7	6,5	1	50
Não infectados	35	32,4	1	50
Controles	39	36,1	0	0
Espécie parasitária				
<i>P. vivax</i>	11	10,2	0	0
<i>P. falciparum</i>	18	16,7	1	50
Mista	5	4,6	0	0
Não infectados	35	32,4	1	50

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram um predomínio expressivo do genótipo GG no polimorfismo -174 G>C do gene IL6, representando 98,1% dos indivíduos analisados, enquanto o genótipo CC apresentou frequência bastante reduzida (1,8%). Esse padrão genotípico reforça a hipótese de que, em populações residentes em áreas endêmicas, como a região amazônica, fatores genéticos específicos podem se tornar predominantes devido a pressões seletivas adaptativas associadas à exposição contínua ao *Plasmodium spp.*, ainda que em contextos de transmissão moderada. A observação de que o genótipo GG foi mais frequente entre indivíduos assintomáticos, enquanto o genótipo CC ocorreu em indivíduos sintomáticos e infectados por *Plasmodium falciparum* e em indivíduos não infectados, sugere uma possível relação funcional entre variações no gene IL6 e a manifestação clínica da malária.

Em concordância com esses achados, Sortica et al. (2014), em estudo conduzido na Amazônia brasileira, relataram associação entre o polimorfismo IL6-174 C>G e maior parasitemia, bem como índices clínicos mais elevados de severidade em infecções por *Plasmodium vivax*, indicando que a variação na expressão dessa citocina pode modular a resposta inflamatória e influenciar o curso clínico da infecção. Em contrapartida, uma pesquisa de randomização mendeliana (RM) com coortes internacionais não encontrou evidências de efeito causal direto da via de sinalização da IL6 sobre a malária grave (Hamilton et al., 2023), o que sugere que o impacto dessa via pode ser dependente do contexto populacional, do perfil imunogenético e da espécie de *Plasmodium* predominante.

A predominância do genótipo GG entre indivíduos com infecção assintomática, especialmente associada ao *P. falciparum*, pode indicar uma resposta imune mais regulada, capaz de conter o parasito sem desencadear inflamação exacerbada. Tal mecanismo seria compatível com a hipótese de tolerância imunológica, segundo a qual populações expostas continuamente ao parasito desenvolvem respostas equilibradas que evitam manifestações clínicas severas. Por outro lado, o genótipo CC, observado apenas em indivíduos sintomáticos, pode estar relacionado a uma produção aumentada de IL6, o que contribuiria para um estado inflamatório mais intenso e para a expressão clínica da doença, embora o baixo número de portadores inviabilize conclusões definitivas.

Esses resultados evidenciam a importância de investigar os fatores genéticos da resposta imune em populações específicas. Em regiões de alta transmissão, como

em países africanos, variantes protetoras clássicas como HbS e G6PD, já foram amplamente documentadas como moduladoras da resistência ao *P. falciparum* (Allison, 2009). No entanto, em áreas de transmissão moderada ou instável, como a Amazônia, onde predomina o *P. vivax*, os fatores genéticos associados à resistência e susceptibilidade à infecção podem variar consideravelmente. Assim, o estudo de polimorfismos em genes de citocinas, como IL6, torna-se essencial para compreender a variabilidade clínica e epidemiológica da malária na região.

A literatura sobre citocinas mostra evidências consistentes de que níveis elevados de IL-6 estão associados à maior gravidade da malária. Em uma meta-análise recente, observou-se que pacientes com malária grave apresentaram concentrações médias significativamente mais altas de IL-6 quando comparados àqueles com formas não graves da doença, sugerindo uma correlação entre inflamação sistêmica exacerbada e piores desfechos clínicos (Wen *et al.*, 2022).

Esses achados reforçam o papel central dessa citocina na interação entre imunidade protetora e imunopatologia.

Portanto, os resultados deste estudo contribuem para o entendimento de como variações genéticas no gene *il6* podem estar associadas a diferentes perfis clínicos da infecção malárica em populações da Amazônia. Embora algumas associações não tenham alcançado significância estatística, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos com o genótipo CC, os padrões observados indicam a possibilidade de um estudo futuro com um número maior de amostras, principalmente do grupo com malária clínica. A identificação e validação de variantes genéticas no gene *il6* como marcadores de susceptibilidade ou resistência podem, no futuro, ser incorporadas em estratégias de vigilância genômica, estratificação de risco e formulação de políticas públicas mais direcionadas às realidades epidemiológicas da malária na região amazônica.

5 CONCLUSÃO

Foi encontrada uma elevada frequência do genótipo GG no polimorfismo –174 G>C do gene *il6* observada na população de Barcelos (AM)

A presença do genótipo CC, embora rara, foi identificada apenas em indivíduos sintomáticos e infectados por *Plasmodium falciparum* em comparação ao grupo dos assintomáticos e a infecções sintomáticas por outras espécies. Essa observação, ainda que limitada pelo número reduzido de casos, sugere que o polimorfismo –174

G>C pode atuar como marcador genético de susceptibilidade à malária sintomática, especialmente em infecções por *P. falciparum*.

Por fim, este trabalho destaca a necessidade de ampliar as pesquisas genéticas em populações expostas à malária no Brasil, integrando dados moleculares, imunológicos e clínicos. Estudos com amostras maiores e abordagem multigênica poderão aprofundar o entendimento sobre o papel dos polimorfismos em genes de citocinas na susceptibilidade ou resistência à malária, comprovando o conhecimento necessário para apoiar políticas públicas mais eficazes no controle e eventual eliminação da doença no território nacional.

REFERÊNCIAS

- ALAMAD, H. et al. Cross-population applications of genomics to understand the risk of multifactorial traits involving immunity and inflammation. *Genes and Immunity*, v. 25, p. 1–15, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10953767/>. Acesso em: 10 de out. 2025.
- ALLISON, A. C. *Genetic control of resistance to human malaria*. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 499–505, 2009. DOI: 10.1016/j.coi.2009.04.001.
- ARMAH, H. B. et al. High-level cerebellar expression of cytokines and chemokines in fatal pediatric cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7428–7436, 2005.
- AWANDARE, G. A. et al. High levels of circulating interleukin-6 and interleukin-10 in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 986–993, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de diagnóstico laboratorial da malária*. Brasília: MS, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Mapa de risco da malária no Brasil*. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2024.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Malaria life cycle*.

Atlanta, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.

Acesso em: 5 nov. 2025.

DA CRUZ FRANCO, V. L. *et al.* Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Brazilian Amazon and its possible relationship with asymptomatic infections. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 334, 2019.

DODOO, D. *et al.* Antibodies to pre-erythrocytic and blood-stage *Plasmodium falciparum* antigens in Ghanaian children: association with protection against malaria. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5813–5820, 2002.

FISHMAN, M. C.; PORTER, S. C. Cytokines and immunity in malaria. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 553–585, 1998.

GOMES, L. T. *et al.* Polymorphisms in cytokine genes and susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria in Brazilian Amazon. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 288–294, 2011.

GOWDA, D. C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 12, p. 596–604, 2007.

HAMILTON, F. *et al.* The effect of interleukin-6 signaling on severe malaria: a Mendelian randomization analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 129, p. 251–259, 2023. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.02.008.

HASHMI, F. et al. A systematic review and meta-analysis of inflammatory biomarkers associated with malaria infection and disease severity. *Cytokine*, v. 169, p. 156305, 2023.

IBGE — Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo Demográfico 2022: Barcelos (AM)*. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 5 set. 2025.

JALLOW, M. et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. **Nature Genetics**, v. 50, p. 1090–1101, 2018.

JOHN, C. C. et al. Cytokine balance in children with severe malaria: association with disease outcome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, p. 1068–1076, 2008.

KWIATKOWSKI, D. et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **The Lancet**, v. 341, n. 8853, p. 123–127, 1993.

KWIATKOWSKI, D. P. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. **American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 2, p. 171–192, 2005.

LYKE, K. E. et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha in Malian children with severe

Plasmodium falciparum malaria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 2, p. 363–370, 2004.

MALARIAGEN. A global network for investigating the genomic epidemiology of malaria. **Nature Genetics**, v. 40, p. 207–208, 2008.

MANCILLA-GALINDO, J. *et al.* Cytokine profiles associated with severe malaria and complications: a systematic review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 759–771, 2021.

MCGUIRE, W. *et al.* Association of TNF promoter polymorphism with susceptibility to cerebral malaria. **Nature**, v. 371, p. 508–510, 1994.

MIN-OO, G.; GROS, P. Genetic resistance to malaria in mice and humans. **Mammalian Genome**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 2005.

RECHT, J. *et al.* The neglected malaria species: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium knowlesi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005731, 2017.

SEGEBFIA, S. P. *et al.* Cytokine gene polymorphisms implicated in the pathogenesis of malaria. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1–12, 2024.

SHERMAN, I. W. et al. Human malaria parasites. In: *Encyclopedia of Life Sciences*.

NCBI Bookshelf, 2024. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8584/>.

SORTICA, V. A. et al. Role of IL6, IL12B and VDR gene polymorphisms in

Plasmodium vivax malaria severity, parasitemia and gametocytemia levels in

an Amazonian Brazilian population. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 5–12, 2014. DOI:

10.1016/j.cyto.2013.10.011.

SUÁREZ-MUTIS, M. C. Aspectos epidemiológicos da malária *vivax* e *falciparum* em

Barcelos (AM). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.

40, n. 1, p. 10–18, 2007.

TANAKA, T. et al. IL6 gene polymorphisms and their association with infectious

diseases. **Human Genetics**, v. 133, p. 121–134, 2014.

WEN, S. et al. Association between interleukin-6 levels and the severity of malaria

infection: a meta-analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 99, p.

105255, 2022. DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105255.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Malaria Report 2023*. Geneva:

WHO, 2023.