

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

DUFFY BINDING PROTEIN: ANÁLISE DA
DIVERSIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DO
Plasmodium vivax DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Taís Nóbrega de Sousa

Belo Horizonte
Fevereiro/2009

Tese DBCM-CPqRR T. N. SOUSA 2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

DUFFY BINDING PROTEIN: ANÁLISE DA
DIVERSIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DO
Plasmodium vivax DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Taís Nóbrega de Sousa

Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração de Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de
Brito

Co-orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte
Fevereiro/2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S825d 2009	Sousa, Tais Nóbrega de. Duffy Binding Protein: análise da diversidade genética em isolados do Plasmodium vivax da Amazônia Brasileira / Tais Nóbrega de Sousa . – Belo Horizonte, 2009. xviii, 123 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f.: 129 - 141 Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. 1. Malária Vivax/genética 2. Plasmodium vivax/genética 3. Variação (Genética)/imunologia I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação) III. Carvalho, Luzia Helena (Co-orientação). CDD – 22. ed. – 616.936 2
---------------	--

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

DUFFY BINDING PROTEIN: ANÁLISE DA DIVERSIDADE
GENÉTICA EM ISOLADOS DO Plasmodium vivax DA
AMAZÔNIA BRASILEIRA

por

Taís Nóbrega de Sousa

Foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)

Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira

Dra. Irene da Silva Soares

Dr. Mariano Gustavo Zalis

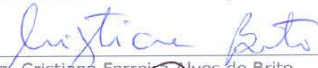
Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Suplentes: Dra. Teofânia Heloisa Dutra Vidigal

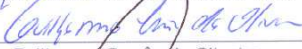
Tese defendida e aprovada em 18/02/2009

Ata da vigésima primeira defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Taís Nóbrega de Sousa, sob a orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito e co-orientação da Dra. Luzia Helena de Carvalho.

Aos dezoito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e nove, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, a defesa da vigésima primeira tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese da aluna Taís Nóbrega de Sousa intitula-se "Duffy Binding Protein: análise da diversidade genética em isolados do *Plasmodium vivax* da Amazônia Brasileira". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito - CPqRR/FIOCRUZ (orientadora e presidente da banca), Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dra. Irene da Silva Soares - USP (membro titular), Dr. Mariano Gustavo Zalis - UFRJ (membro titular), Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu - UFMG (membro titular) e Dra. Teofânia Heloisa Dutra Vidigal - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após argüir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Cristiana Ferreira Alves de Brito, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, dezoito de fevereiro de dois mil e nove.



Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito



Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira



Dra. Irene da Silva Soares



Dr. Mariano Gustavo Zalis



Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, co-orientação da Dra. Luzia Helena de Carvalho e com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Organização Mundial da Saúde (TDR/WHO), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), PAPES IV/FIOCRUZ e Centro de Pesquisas René Rachou.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, dedicação e incentivo e ao Breno, pelo carinho, apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço à Deus, por me guiar neste caminho, abrindo as portas do Laboratório de Malária e me abençoando com a aprovação nos processos seletivos do Mestrado e Doutorado. Obrigada, meu Senhor, por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho, que permitiram anos de convivência tão agradáveis, uma formação profissional de excelência e, principalmente, amizades verdadeiras. Em especial eu agradeço a Cristiana, minha orientadora, que tanto me apoiou e incentivou. Você é uma profissional, em quem sempre vou me espelhar, por sua competência e inteligência. Mas eu te admiro, especialmente, pelo ser humano maravilhoso que você é: compreensiva, sensível e amorosa. Luzia, você também faz parte diretamente da minha formação profissional, sempre me apoiando e acreditando na minha capacidade de desenvolver um trabalho de qualidade. Você é uma pessoa muito especial e uma profissional brilhante, a quem muito admiro. Este trabalho contou com a colaboração de vários pesquisadores, técnicos e estudantes, os quais eu agradeço pelas críticas, sugestões, disponibilidade, parceria e amizade: Dr. Eduardo Tarazona, Dra. Andrea Teixeira, Dr. Marcelo Urbano, Dra. Ana Paula Madureira, Dra. Isabela Cerávdo, Bruno Sanchez, Dr. Luciano Moreira, Alice Di Sabatino, Marialice, Flávia Cardina, Dra. Paula Kuser, Dr. Cór Jesús Font, Dr. José Maria, Dr. Álvaro Couto, Dr. Luis Herman, Dr. Daniel Wilson, Dra. Érika Braga, Ana Beatriz (Tiza) e Elisângela Monteiro. Aos amigos do laboratório de Malária, meus agradecimentos pelos anos de convivência agradáveis, apoio e amizade: Flávia Guimarães, Fernando, Antônio, Armando, Bruno Rocha, Fernanda Campos, Flávia Alessandra, Dra. Flora Kano, Geraldo, Máira, Sabrina, Fernanda Rezende, Isabela Oliveira, Marcelle, Paula, Ricardo, Francine, Izabela Coimbra, Bruna, Isabela Ribeiro, Júnia, Cristiane, Daniela, Renata, Joseph, Dra. Antoniana Krettli, Karla, Luiza, Luísa Krettli, Manuela, Marina Caram, Paloma, Tânia e Walison. Agradeço igualmente aos funcionários do CPqRR, a coordenação e aos professores do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR, bem como ao CNPq, TDR/WHO, FAPEMIG e PAPER/VIOL/CRUZ, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Ciclo Biológico dos Parasitos da Malária Humana	21
1.2 Variabilidade Genética de Plasmodium vivax.....	26
1.3 Caracterização da Duffy Binding Protein de P. vivax	31
1.4 O antígeno Duffy/Receptor para Quimiocinas (DARC)	37
2 JUSTIFICATIVA.....	41
3 OBJETIVO GERAL.....	43
3.1 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Áreas de Coleta das Amostras de Sangue.....	44
4.1.1 Amazônia Legal.....	44
4.1.2 Região extra-Amazônica	45
4.2 Amostras de Sangue	46
4.3 Extração de DNA.....	48
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase para Amplificação da PvDBP _{II}	48
4.5 Seqüenciamento	49
4.6 Análise das Seqüências	50
4.7 Predição de Epitopos in silico.....	52
4.8 Modelagem Molecular	53
4.9 Fenotipagem do Receptor DARC.....	53
4.10 Genotipagem do Receptor DARC pela Reação em Cadeia da Polimerase Alelo-Específica (PCR-ASP)	54
4.11 Genotipagem do Receptor DARC pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-time PCR).....	56
4.12 Análise Estatística	57
5 RESULTADOS.....	58

5.1 SOUSA, T. N., CERAVOLO, I. P., FONTES, C. J. F., COUTO, A., CARVALHO, L. H. and BRITO, C. F. A. (2006). The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among <i>Plasmodium vivax</i> isolates from the Brazilian Amazon area. <i>Molecular and Biochemical Parasitology</i> , 146, 251-254	59
5.2 SOUSA, T., TARAZONA-SANTOS, E., WILSON, D., MADUREIRA, A., FALCÃO, P., FONTES, C., DE SOUZA, J., COUTO, A. A., GIL, L., FERREIRA, M., CARVALHO, L. and BRITO, C. (2009). Recombination and positive selection on epitopes have shaped the haplotype structure of the ligand domain of <i>Plasmodium vivax</i> duffy binding protein. Artigo submetido.	63
5.3 SOUSA, T. N., SANCHEZ, B. A., CERAVOLO, I. P., CARVALHO, L. H. and BRITO, C. F. (2007). Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the <i>Plasmodium vivax</i> invasion receptor. <i>Vox Sang</i> , 92, 373-380	102
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
6.1 Identificação de polimorfismos na DBP _{II} potenciais alvos de anticorpos em isolados de <i>P. vivax</i> da Amazônia brasileira	111
6.2 A variabilidade genética da DBP _{II} de isolados de <i>P. vivax</i> do Brasil é moldada pela recombinação e seleção natural	112
6.3 Predição in silico de epitopos de células B e T e mapeamento na estrutura tridimensional da PvDBP _{II} de polimorfismos próximos ao sítio funcional da proteína	113
6.4 Evidências sugerem que os polimorfismos na PvDBP _{II} são alvos de anticorpos bloqueadores da interação PvDBP _{II} -DARC	114
6.5 A suscetibilidade à infecção por <i>P. vivax</i> está associada à densidade do receptor DARC na superfície do eritrócito	116
7 CONCLUSÕES	117
8 ANEXOS	118
8.1 Anexo 1 - Ceravolo I. P. , Sanchez B. A. M. , Sousa T. N. , Guerra B. M. , Soares I. S. , Braga E. M. , McHenry A. M. , Adams J. H. , Brito C. F. A. , Carvalho L. H. (2009). Naturally acquired inhibitory antibodies to <i>Plasmodium vivax</i> Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. <i>Clinical & Experimental Immunology</i> , 156(2): 502-510. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x	119

8.2 Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou.....	128
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

LISTA DE FIGURAS

Figura da capa. Rompimento da célula sanguínea vermelha após infecção pelo Plasmodium falciparum	I
Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor Anopheles	23
Figura 2. Representação esquemática da Duffy binding protein de P. vivax.....	32
Figura 3. Representação esquemática do gene FY que codifica DARC	37
Figura 4. Mapa do Brasil indicando a localização das áreas de coleta das amostras de sangue utilizadas neste estudo.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das amostras de sangue coletadas de voluntários selecionados para o estudo 47

Tabela 2. Relação dos iniciadores utilizados na genotipagem do receptor DARC por PCR alelo-específica (PCR-ASP) e PCR em tempo real (RT-PCR) 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa – Aminoácido

AMA-1 – Antígeno 1 de membrana apical (Apical membrane antigen 1)

DARC – Antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (Duffy antigen/receptor for chemokines)

DBL-EBPs – Família de proteínas que se ligam aos eritrócitos e apresentam um domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding like domain Erythrocyte binding protein)

DBL – Domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding like domain)

dbp – Gene que codifica a proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC

DBP – Proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding protein)

DBP_{II} – Domínio de ligação (região II) da proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding protein II)

dbpII – Gene que codifica o domínio de ligação (região II) da proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC

DBP α – Proteína α que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding protein α)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBA-140 (BAEBL) – Antígeno de 140 kDa que se liga a eritrócito (140 kDa erythrocyte binding antigen)

EBA-175 – Antígeno de 175 kDa que se liga a eritrócito (175 kDa erythrocyte binding antigen)

EBA-181 (JESEBL) – Antígeno de 181 kDa que se liga a eritrócito (181 kDa erythrocyte binding antigen)

EBL-1 – Proteína 1 que se liga a eritrócito (erythrocyte binding ligand 1)

EBP – Proteína que se liga ao eritrócito (Erythrocyte binding protein)

ECD – Domínio amino-terminal extracelular (Extracelular amino-terminal domain)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ES – Silenciado na linhagem eritróide (erythroid silent)

F_{ST} – Índice de diversidade genética

FY – Locus do antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC)

FY*A, FY*B – Alelos DARC que codificam os antígenos Fy^a e Fy^b, respectivamente

FY*A^{ES}, FY*B^{ES} – Alelos DARC silenciados na linhagem eritróide

FY*X – Alelo DARC que codifica uma expressão fraca ou qualitativamente reduzida do antígeno Fy^b

Fy^a, Fy^B – Antígenos a e b do grupo sanguíneo DARC, respectivamente

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

H – Número de haplótipos

Hd – Diversidade haplotípica

HGF – Fator de crescimento hepático (Hepatocyte growth factor)

IL-8 – Interleucina 8

IPA – Incidência parasitária anual

kb – Kilobase

kDa – Kilodalton

LD – Desequilíbrio de ligação

MCP-1 – Proteína 1 quimiotática de monócito (Monocyte chemotactic protein-1)

MGSA – Quimiocina com atividade estimuladora do crescimento de melanoma (Melanoma growth stimulating activity)

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

MSP-1 – Proteína 1 de superfície do merozoíto (Merozoite surface protein 1)

MSP-2 – Proteína 2 de superfície do merozoíto (Merozoite surface protein 2)

Ne – Tamanho efetivo da população

pb – par de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCR-ASP – Reação em cadeia da polimerase alelo-específica

PfEMP1 – Antígeno 1 variante de superfície de *P. falciparum* (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1)

PfRBP1 – Proteína 1 de *P. falciparum* que se liga a reticulócito (*P. falciparum* Reticulocyte binding protein 1)

PfRBP2a – Proteína 2a de *P. falciparum* que se liga a reticulócito (*P. falciparum* Reticulocyte binding protein 2a)

PfRBP2b – Proteína 2b de *P. falciparum* que se liga a reticulócito (*P. falciparum* Reticulocyte binding protein 2b)

PfRBP3 – Proteína 3 de *P. falciparum* que se liga a reticulócito (*P. falciparum* Reticulocyte binding protein 3)

PfRBP4 – Proteína 4 de *P. falciparum* que se liga a reticulócito (*P. falciparum* Reticulocyte binding protein 4)

Pk α DBP – Proteína α de *P. knowlesi* que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*P. knowlesi* Duffy binding protein α)

PvDBP – Proteína de *P. vivax* que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*P. vivax* Duffy binding protein)

PvDBP_{II} – Domínio de ligação (região II) da proteína de *P. vivax* que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*P. vivax* Duffy binding protein II)

PvRBP-1 – Proteína 1 de *P. vivax* que se liga a reticulócito (*P. vivax* Reticulocyte binding protein 1)

PvRBP-2 – Proteína 2 de *P. vivax* que se liga a reticulócito (*P. vivax* Reticulocyte binding protein 2)

r – Taxa de recombinação por geração

r^2 – Coeficiente de correlação

RANTES – Regulada pela ativação, secretada e expressa por célula T normal (Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)

RBC(s) – Célula(s) sanguínea(s) vermelha(s) (Red blood cell)

Real-time PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – PCR em tempo real

SNP(s)- Polimorfismo(s) de base única (Single nucleotide polymorphism)

π - Diversidade nucleotídica

ρ – Parâmetro de recombinação populacional

ω – Parâmetro de seleção natural

RESUMO

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos de *Plasmodium vivax* requer a interação da Duffy binding protein (PvDBP) com o receptor DARC na superfície dos eritrócitos humanos. Esta interação parece ser essencial na formação de uma junção irreversível entre as membranas do merozoíto e da célula do hospedeiro, uma etapa chave no processo de invasão dos eritrócitos. Diante disso, a PvDBP é considerada uma das mais importantes candidatas para compor uma vacina anti-*P. vivax*. O domínio de ligação da PvDBP (região II, PvDBP_{II}) ao seu receptor é rico em resíduos de cisteína e constitui a região mais polimórfica da proteína. Embora a maioria dos aminoácidos envolvidos na interação PvDBP_{II}-DARC seja invariável, a resposta imune que parece ser direcionada principalmente contra regiões polimórficas da PvDBP_{II} é capaz de bloquear a interação proteína-receptor. Como esta diversidade genética pode comprometer a eficácia de uma vacina que inclua este antígeno, o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar o padrão de diversidade do domínio de ligação da Duffy binding protein de isolados de *P. vivax* de várias regiões da Amazônia Legal brasileira. Utilizando ferramentas estatísticas adequadas, evidenciou-se o papel da recombinação e da seleção natural na geração e manutenção da diversidade genética na PvDBP_{II}. Em adição, a seleção positiva parece agir em codons individuais da proteína, preferencialmente nos epitopos de células T e B da PvDBP_{II}. Em geral, estas regiões apresentam uma diversidade genética maior do que toda a região II da proteína. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o sistema imune do hospedeiro é um importante fator de seleção de mutações relacionadas ao escape do parasito. Adicionalmente, avaliou-se a associação entre prevalência dos alelos DARC e suscetibilidade à infecção por *P. vivax* na Amazônia Legal brasileira. Com este objetivo foi desenvolvida uma nova metodologia de genotipagem de DARC baseada no PCR em tempo real. Este foi um dos primeiros estudos a evidenciar uma associação significativa entre indivíduos que expressam dois alelos DARC funcionais e maior suscetibilidade à infecção por *P. vivax* e o primeiro a caracterizar o padrão de variabilidade genética da DBP_{II} em isolados de *P. vivax* do Brasil.

ABSTRACT

Plasmodium vivax requires interaction of the Duffy binding protein (PvDBP) with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) to enable its invasion of human erythrocytes, making PvDBP an important vaccine candidate. This interaction seems to be essential for junction formation, which is a key step in the erythrocyte invasion process. The receptor-binding domain of PvDBP maps to a conserved cysteine-rich region, referred to as region II (PvDBP_{II}). Most of the allelic diversity observed in PvDBP is due to the high rate of nonsynonymous polymorphisms in this critical domain for receptor recognition. Although contact residues that form the DARC-recognition site within PvDBP_{II} appear to be invariant, host immune responses that target mainly against polymorphic regions are able to inhibit binding of PvDBP_{II} to DARC. As the PvDBP_{II} allelic diversity may represent a major obstacle for vaccine development, this study undertook a comprehensive analysis of the genetic diversity of the DBP_{II} from *P. vivax* isolates obtained from different sites across the Brazilian Amazon region. Using appropriate statistical tests, we found evidence that allelic diversity within the Brazilian population of parasites is maintained by recombination and natural selection at PvDBP_{II} locus. In addition, we conclude that positive natural selection preferentially acts on B- and T-cell epitopes. Overall, these regions also showed higher nucleotide diversity compared to the whole PvDBP_{II}. Our results suggest that the host immune system is an important selection factor for mutations related to escape of the parasite. In this study, we also evaluated the relationship between DARC alleles and malaria susceptibility. For this aim we developed a new DARC genotyping assay based on multiplex real-time PCR. Our findings provided one of the first evidences that the presence of two functional alleles increases the risk of *P. vivax* infection. Indeed, the current investigation presented the first comprehensive analysis of genetic diversity across PvDBP_{II} gene from Brazilian parasite isolates.

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por um protozoário do filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium*, sendo descritas quatro espécies que habitualmente parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Atualmente, estima-se que a malária afete 500 milhões de pessoas no mundo, causando cerca de um milhão de mortes por ano (Greenwood et al., 2008; WHO, 2008). Uma estimativa recente sugere que mais de dois bilhões de pessoas no mundo estão sob o risco de adquirir malária. Vários fatores contribuíram para o ressurgimento da doença em diversas partes do mundo a partir da segunda metade do século XX, principalmente o desenvolvimento de resistência dos vetores aos inseticidas, bem como dos parasitos aos antimaláricos (Greenwood et al., 2008).

A doença é um importante problema de saúde pública em algumas partes da Ásia e América do Sul, porém seu principal impacto é na África sub-Saariana, que concentra 86% dos casos de malária do mundo (WHO, 2008). *P. vivax* e *P. falciparum* são as espécies mais prevalentes, sendo que *P. falciparum* é responsável pelas formas mais graves da doença e está associado a um alto índice de mortalidade (Greenwood et al., 2005; Mendis et al., 2001). *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo, sendo comum em áreas tropicais fora do continente africano. Essa espécie é responsável por uma média anual de 130 a 435 milhões de casos de malária no mundo, estimativa superior a freqüentemente citada de 70-80 milhões de infecções anuais (Baird, 2007; Hay et al., 2004; Mendis et al., 2001). *P. vivax* causa uma doença debilitante que afeta a qualidade de vida e a produtividade econômica das pessoas afetadas (Greenwood et al., 2005). Embora freqüentemente a malária causada por *P. vivax* seja referida como benigna e raramente fatal, dois estudos epidemiológicos recentes, realizados na Papua Nova Guiné e Indonésia, reportaram uma proporção elevada de malária *vivax* grave, principalmente em crianças. Uma característica importante desses estudos é a incidência comparável de casos graves de malária causados por *P. vivax* e *P. falciparum* em cada região (Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008).

Nas Américas, o Brasil é responsável por cerca de 65% de um milhão de casos clínicos de malária registrados anualmente (Bremner & Holloway, 2007). No Brasil, a principal região onde ocorre a transmissão da malária é a Amazônia Legal, com média anual de 500 mil casos, correspondendo a 99,8% das ocorrências da doença no país. As três espécies que transmitem a malária no Brasil são *P.*

falciparum, *P. vivax* e *P. malariae*, sendo que *P. vivax* é responsável por mais de 80% dos casos de malária notificados anualmente na região Amazônica (SVS, 2008).

Na Amazônia Legal, a malária é uma doença com distribuição focal, havendo diferentes situações epidemiológicas em função das formas variadas de ocupação do solo e das diversas modalidades de exploração econômica dos recursos naturais (Barata, 1995; Duarte & Fontes, 2002; Tauil, 1986). Em 2007, apenas três estados, Amazonas, Rondônia e Pará, registraram cerca de 354 mil casos de malária, o que corresponde a 78% das ocorrências (SVS, 2008). Em adição às condições sócio-econômicas e ambientais, a alta transmissão de malária, durante décadas na Amazônia Legal brasileira, está associada com a ocupação intensa e desordenada dos espaços peri-urbanos, ao desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos não-oficiais (Marques et al., 1986; SVS, 2007; SVS, 2008). Outro fator colaborador é o aumento dos criadouros do mosquito vetor em função da atividade de piscicultura, com a construção de tanques artificiais (SVS, 2007).

A região extra-amazônica, uma área não endêmica de malária, apresenta uma média anual de 220 casos autóctones da doença desde 1999. Nessas regiões, a transmissão da infecção se deve, em grande parte, ao fluxo constante de pessoas infectadas provenientes de áreas endêmicas dentro e fora do país, somado à existência dos vetores anofelinos na região extra-amazônica (SVS, 2008).

Desde 2003 está em vigência o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) no Brasil, cujos principais objetivos são a redução da incidência e da morbimortalidade pela malária. Entre as estratégias traçadas para atingir esses objetivos estão o diagnóstico precoce, o tratamento oportuno e adequado dos casos da doença e intervenções seletivas para o controle vetorial (SVS, 2007). Essas medidas de controle, somadas a uma série de outros fatores, como maior investimento de recursos pelas três esferas do governo e mudança no esquema de tratamento de primeira escolha da malária por *P. falciparum* têm contribuído para uma redução do número de casos de malária nos últimos dois anos no país (SVS, 2008).

1.1 Ciclo Biológico dos Parasitos da Malária Humana

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana compreende uma fase de reprodução sexuada, que ocorre dentro do hospedeiro invertebrado, e outra de reprodução assexuada, que se desenvolve no hospedeiro vertebrado (Figura 1). Em diferentes momentos do seu ciclo de vida, o plasmódio sofre várias transformações que o capacitam a transpor diversas barreiras e se desenvolver em ambientes variados. Essas mudanças incluem o desenvolvimento do parasito em diferentes formas, tais como nos estágios móvel, invasivo, encistado, intracelular, sexuada e dormente (Greenwood et al., 2008).

As formas infectantes do parasito, conhecidas como esporozoítos e que se acumulam nas glândulas salivares do inseto vetor, são transmitidas para o homem através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Estima-se que cerca de 15 a 123 parasitos são depositados sob a pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo, podendo permanecer na derme por um longo período após a picada do vetor (Amino et al., 2006; Prudêncio et al., 2006; Yamauchi et al., 2007). Recentemente, um estudo demonstrou que entre os esporozoítos que deixam o local da picada, grande parte invade os vasos sanguíneos, enquanto outros são drenados pelos vasos linfáticos e se acumulam nos linfonodos. Nos linfonodos, a maioria dos esporozoítos é degradada dentro das células dendríticas (Amino et al., 2006). Entretanto, algumas vezes o mosquito perfura diretamente um vaso durante o repasto sanguíneo, inoculando os esporozoítos na corrente sanguínea (Vanderberg & Frevert, 2004).

Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos migram para o fígado, onde atravessam vários hepatócitos antes de se desenvolverem no próximo estágio invasivo dentro de um vacúolo parasitóforo (Mota et al., 2001). Mota e colaboradores (2002) evidenciaram que a migração do parasito através de várias células induz a excitose de organelas apicais dos esporozoítos, tornando-os aptos a infectar o hepatócito e se desenvolver no interior do vacúolo parasitóforo (Mota et al., 2002; Prudêncio et al., 2006). Ainda no fígado, *P. vivax* e *P. ovale* podem se desenvolver em formas dormentes, que são responsáveis por episódios de recaída, meses ou até mesmo anos após a infecção inicial (Barnwell et al., 1998).

Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam e dividem mitoticamente dando origem aos merozoítos, que são liberados diretamente na corrente sanguínea no interior de vesículas delimitadas pela membrana da própria célula hospedeira, os

merossomos (Sturm et al., 2006). Na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos, dando início ao ciclo sanguíneo assexuado do parasito, que é responsável pelas patologias mais complexas da malária. A entrada do plasmódio dentro dos eritrócitos ocorre em poucos segundos, reduzindo o tempo de exposição do parasito ao sistema imune (Cowman & Crabb, 2006; Oh & Chishti, 2005).

O processo de invasão dos eritrócitos compreende os seguintes eventos: (1) ligação de baixa afinidade e reversível do merozoíto à superfície do eritrócito após colisão aleatória; (2) reorientação do parasito a fim de posicionar a sua porção apical, onde são encontradas as organelas apicais, em contato com a membrana eritrocítica, formando uma junção irreversível entre as membranas das duas células; (3) deslocamento da junção em direção ao pólo posterior do parasito com a concomitante liberação do conteúdo das organelas apicais, as roptrias e os micronemas e; (4) entrada do parasito no interior do eritrócito através da formação do vacúolo parasitóforo, no interior do qual o merozoíto se desenvolve (Cowman & Crabb, 2006; Oh & Chishti, 2005).

No interior dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem nas formas jovens intra-eritrocíticas do parasito (trofozoítos jovens ou anel) que maturam em trofozoítos maduros e esquizontes dentro de um período que varia de 48-72 horas, dependendo da espécie do plasmódio. Cada esquizonte produz aproximadamente 10-30 merozoítos, que ao serem liberados na corrente sanguínea, invadem novas células sanguíneas. Alguns merozoítos, por sua vez, se diferenciam nas formas sexuadas, microgametócitos (masculino) e macrogametócitos (feminino), que ao serem ingeridas pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, se diferenciam nos gametas masculino e feminino. No interior do intestino médio do *Anopheles* os gametas se fundem, formando o zigoto (Barnwell et al., 1998). Dentro de um período de 5-18 horas, o zigoto se diferencia em um oocineto móvel, que atravessa a matriz peritrófica e a camada de células epiteliais do intestino, alcançando a lâmina basal, onde é induzida a progressão do ciclo celular com a diferenciação do oocineto em oocisto. Após sucessivas divisões mitóticas e diferenciação celular, milhares de esporozoítos são produzidos a partir do oocisto e migram para as glândulas salivares, onde são armazenados até a sua inoculação no hospedeiro vertebrado, completando o seu ciclo de vida (Sinden, 2002).

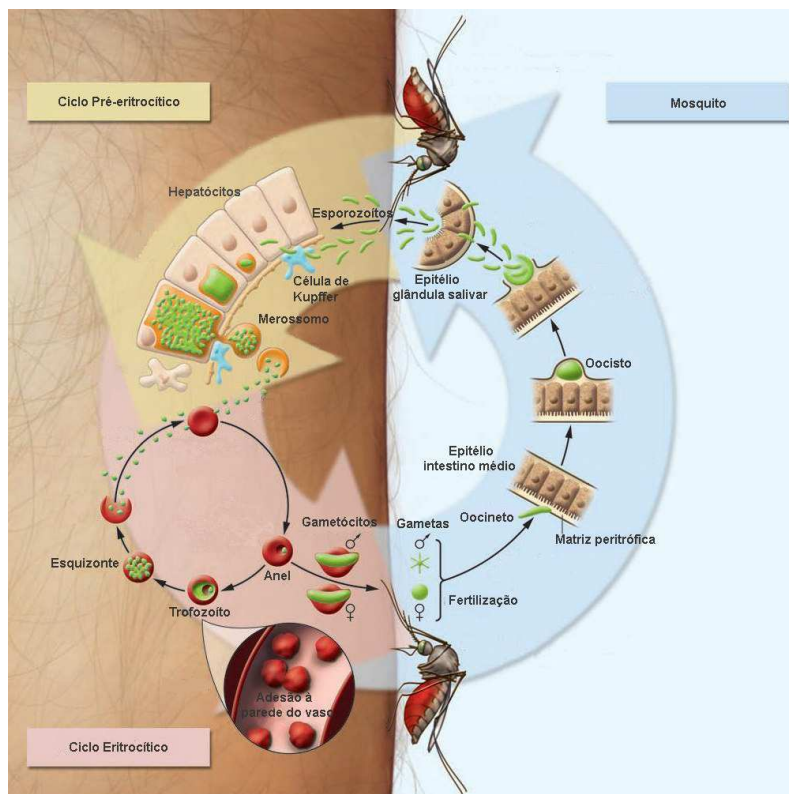


Figura 1. Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Figura modificada de Greenwood e colaboradores (2008).

Diferenças significativas são observadas entre a infecção causada por *P. vivax* e *P. falciparum*, quanto ao tipo de célula infectada e as interações ligante-receptor que ocorrem durante o processo de invasão do eritrócito. *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos (eritrócitos jovens) (Galinski et al., 1992; Mons, 1990), enquanto *P. falciparum* invade tanto reticulócitos quanto eritrócitos maduros (Pasvol et al., 1980). A especificidade de invasão de *P. vivax* é atribuída a pelo menos duas proteínas, PvRBP-1 e PvRBP-2 (reticulocyte binding protein, RBP) (Galinski et al., 1992). Quatro proteínas homólogas às PvRBP foram identificadas em *P. falciparum*, entre elas a PfRBP1, PfRBP2a, PfRBP2b e PfRBP4, além do pseudogene PfRBP3 (Duraisingh et al., 2003; Rayner et al., 2001; Stubbs et al., 2005; Triglia et al., 2001; 2005). Até o momento, a função dessas proteínas no processo de invasão de *P. falciparum*, bem como os receptores eritrocíticos para as RBP de *P. vivax* ou de *P. falciparum* não foram identificados (Oh & Chishti, 2005).

Outras diferenças significativas no processo de invasão dos eritrócitos por *P. vivax* e *P. falciparum* se referem às interações moleculares que ocorrem entre proteínas do parasito e os receptores eritrocíticos. *P. vivax* requer principalmente a interação de uma proteína micronemal, a Duffy binding protein (DBP), com o seu receptor na superfície do eritrócito, o antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC) (Chaudhuri et al., 1989; Horuk et al., 1993; Miller et al., 1976). Uma forte evidência disso é a ausência de infecção causada por *P. vivax* no oeste da África, coincidindo com a ausência de expressão do receptor DARC nas mesmas populações (Miller et al., 1976). A interação da PvDBP com DARC parece ser essencial na etapa de formação da junção irreversível durante o processo de invasão dos eritrócitos (Miller, 1989; Singh et al., 2005; 2006).

Em contrapartida, tanto os isolados de campo quanto os isolados de laboratório de *P. falciparum* apresentam diferentes vias de invasão dos eritrócitos (Gaur et al., 2004). A classificação dessas vias alternativas de invasão é feita de acordo com a natureza do receptor eritrocítico, sendo definidas a partir da utilização de eritrócitos deficientes em proteínas específicas de superfície e do tratamento enzimático dessas células (Gaur et al., 2004). Dessa forma, quatro proteínas importantes para invasão dos eritrócitos foram identificadas no *P. falciparum*, todas ortólogas à PvDBP: EBA-175 (175 kDa erythrocyte binding antigen), BAEBL (também conhecida como EBA-140), JESEBL (EBA-181) e EBL-1 (Cowman & Crabb, 2006; Gaur et al., 2004). Esses ligantes, dependendo do isolado de *P.*

falciparum, são capazes de interagir com diferentes receptores eritrocíticos e essa interação ligante-receptor pode ser dependente ou não de resíduos de ácido siálico nos receptores (sialoglicoproteínas). O receptor da EBA-175 é uma sialoglicoproteína, a glicoforina A, assim como os receptores da BAEBL e JESEBL, a glicoforina C e um receptor glicosilado resistente à tripsina, respectivamente (Mayer et al., 2002; Orlandi et al., 1992; Rayner et al., 2001). Em adição a esses receptores, BAEBL e JESEBL são capazes de se ligar a proteínas não glicosiladas na superfície dos eritrócitos (Mayer et al., 2004; Thompson et al., 2001). A redundância na invasão dos eritrócitos pode proporcionar algumas vantagens para *P. falciparum*, como evasão do sistema imune do hospedeiro e capacidade de invadir eritrócitos genotipicamente distintos e em vários estágios de maturação (Gaur et al., 2004).

1.2 Variabilidade Genética de *Plasmodium vivax*

Em comparação com o *P. falciparum*, as informações disponíveis a respeito da variabilidade genética e história evolutiva de *P. vivax* são mais escassas. Isso se deve, principalmente, à menor mortalidade associada à infecção causada por *P. vivax* e à ausência de um sistema eficiente de cultivo contínuo desse parasito (Feng et al., 2003). Nos últimos anos, alguns estudos sobre *P. vivax* têm contribuído para um melhor entendimento da sua história evolutiva. Alguns autores defendem uma origem asiática para *P. vivax*, há pelo menos 50 mil anos atrás, com base na análise do seu genoma mitocondrial (Cornejo & Escalante, 2006; Jongwutiwes et al., 2005; Mu et al., 2005b). A partir da análise de vários loci neutros, sugere-se que a população atual de *P. vivax* originou-se de um parasito que infectava macacos asiáticos e passou, posteriormente, a parasitar os humanos modernos (Escalante et al., 2005; Mu et al., 2005b). No novo mundo, evidências sugerem uma introdução recente de *P. vivax* (Carter, 2003; Cornejo & Escalante, 2006; Li et al., 2001).

As inferências a respeito da história evolutiva, assim como a estimativa da diversidade genética das populações e genes dos parasitos da malária são importantes para: (1) o desenvolvimento e monitoramento de estratégias de controle; (2) identificação de novas drogas e alvos para vacinas e; (3) entendimento do padrão de virulência e da interação parasito-hospedeiro (Carlton, 2003; De Souza-Neiras et al., 2007).

Dois abordagens complementares são empregadas no estudo de genética de população e variabilidade genética do plasmódio. A primeira tem como objetivo entender a estrutura genética das populações do parasito, como por exemplo, a partir do estudo da distribuição espacial dos alelos, da ocorrência de migrações e das estratégias de reprodução. A segunda abordagem consiste na análise da diversidade genética de genes específicos, como os genes que codificam antígenos vacinais e genes associados à resistência as drogas. As análises de genes específicos fornecem informações sobre como os diferentes alelos são gerados e mantidos na população, podendo também determinar o papel da recombinação genética e seleção natural na geração e manutenção dos polimorfismos observados (Cui et al., 2003). É importante ressaltar que a diversidade genética observada nos genes individuais, principalmente aqueles sob pressão seletiva, pode refletir uma história evolutiva específica que não coincide com as forças evolutivas responsáveis por moldar a diversidade genética geral da espécie (Gauthier & Tibayrenc, 2005).

Nas análises sobre evolução molecular, variabilidade genética e estrutura das populações de *P. vivax*, são utilizados vários marcadores moleculares, tais como os microssatélites e os polimorfismos de base única (SNPs), principalmente em genes ortólogos previamente identificados em *P. falciparum* (Feng et al., 2003; Imwong et al., 2006). A maioria desses estudos tem evidenciado uma alta diversidade genética em *P. vivax* (Feng et al., 2003; Ferreira et al., 2007a; Imwong et al., 2006).

Os polimorfismos de base única são amplamente utilizados, pois além de serem numerosos no genoma, esses marcadores genéticos são fáceis de serem analisados (Cui et al., 2003; Feng et al., 2003). Feng e colaboradores (2003) ao analisarem uma região de 100 kb em um cromossomo de *P. vivax*, evidenciaram uma alta frequência de SNPs e uma tendência de agrupamento desses marcadores em regiões intergênicas e em genes específicos que podem estar sob pressão seletiva. Em *P. falciparum*, a análise de 3539 genes revelou que os genes mais polimórficos são aqueles que codificam antígenos de superfície, moléculas de adesão celular e proteínas associadas à ação de drogas (Mu et al., 2007). Como muitas dessas proteínas são candidatas à vacina antimalárica, a análise da diversidade alélica, bem como o entendimento da origem dos polimorfismos presentes nos genes que as codificam, é essencial para o desenvolvimento de uma vacina que inclua esses antígenos (Galinski & Barnwell, 1996).

Vários fatores evolutivos e demográficos, como mutação, recombinação, seleção natural, deriva genética, fluxo gênico e estrutura geográfica das populações do parasito são responsáveis por modelar o padrão de variabilidade genética observado nas seqüências de DNA e proteínas (De Souza-Neiras et al., 2007). Para os antígenos da malária, ressalta-se o papel da recombinação e seleção natural na geração e manutenção da diversidade genética comumente observada nessas proteínas (Cui et al., 2003; Ferreira et al., 2007b).

A recombinação é uma importante fonte de diversidade genética, podendo substituir vários nucleotídeos, ao mesmo tempo, em um único evento de recombinação. Dessa forma, a recombinação constitui uma força diversificadora capaz de gerar novas variantes alélicas, que permitem ao parasito escapar da resposta imune do hospedeiro induzida por variantes do mesmo antígeno em exposições anteriores (Ferreira et al., 2007b). Para *P. vivax* e *P. falciparum*, a maioria dos estudos que faz inferências sobre a recombinação utiliza SNPs em genes que codificam antígenos vacinais, tais como AMA-1 e MSP-1. Nesses estudos, a recombinação tem sido frequentemente associada à elevada diversidade

genética observada nos genes que codificam esses antígenos (Gunasekera et al., 2007; Ord et al., 2008; Santos-Ciminera et al., 2007).

Além da estimativa acurada da taxa de recombinação ter implicações diretas no estabelecimento do repertório e da dinâmica espacial e temporal dos alelos (Awadalla, 2003), ela se faz necessária à medida que as ferramentas disponíveis para inferência da história evolutiva do patógeno são sensíveis à ocorrência de recombinação (Stumpf & McVean, 2003; Wilson et al., 2005). Na ausência de recombinação, a reconstrução de uma filogenia única é possível e pode ser o ponto de partida para qualquer análise, por exemplo, testes de seleção. Porém, se há recombinação, diferentes partes do genoma podem apresentar histórias evolutivas distintas. Como resultado, a ação da seleção e da mutação em uma dada região genômica pode ser independente da ação dessas mesmas forças em outras regiões. Portanto, se a recombinação é comum, a escolha de análises apropriadas é crucial para o estudo da história evolutiva dos patógenos (Stumpf & McVean, 2003; Wilson et al., 2005).

Na malária, a recombinação meiótica ocorre durante o ciclo de reprodução sexuada do parasito no mosquito. Em populações naturais do plasmódio, os eventos de recombinação são observados somente quando o hospedeiro invertebrado está infectado com diferentes genótipos do parasito. No mosquito, a fecundação entre gametas geneticamente distintos pode resultar na recombinação (exogamia), que tende a reduzir a associação entre alelos ou marcadores genéticos de diferentes loci, isto é, o desequilíbrio de ligação (LD). Na situação contrária, em que o hospedeiro freqüentemente está infectado com parasitos do mesmo genótipo e, portanto, a fecundação ocorre entre gametas geneticamente idênticos (endogamia), a recombinação é rara e o desequilíbrio de ligação pode ser mantido durante várias gerações (Gauthier & Tibayrenc, 2005).

Para *P. falciparum*, a taxa de recombinação na população parece estar diretamente associada à freqüência de infecção múltipla (parasitos de diferentes genótipos infectando o mesmo indivíduo), endemicidade e taxa de exogamia (Anderson et al., 2000; Mu et al., 2005a; Mzilahowa et al., 2007). Dessa forma, as populações de *P. falciparum* de áreas de alta transmissão de malária, onde as infecções múltiplas são mais comuns, freqüentemente apresentam uma taxa de recombinação elevada e um desequilíbrio de ligação não significativo (Mzilahowa et al., 2007). Em contrapartida, a partir da genotipagem de vários microssatélites de populações de *P. falciparum* de áreas de reduzida transmissão de malária, foi

evidenciado uma baixa frequência de infecções múltiplas e um forte desequilíbrio de ligação (Anderson et al., 2000; Machado et al., 2004).

De acordo com os dados de microsatélite, as populações de *P. vivax* parecem se desviar do padrão de estrutura de população observado para *P. falciparum*. Imwong e colaboradores (2007) observaram níveis elevados de infecção múltipla e um desequilíbrio de ligação não significativo na Tailândia e Laos, áreas de alta transmissão de malária. Em uma área de baixa endemicidade, como na Colômbia, foram descritos baixos níveis de infecção múltipla e forte desequilíbrio de ligação na população avaliada do parasito. Em conjunto, nessas regiões a estrutura de população de *P. vivax* se assemelha ao observado para *P. falciparum*. Entretanto, essa mesma correlação não foi observada em populações de *P. vivax* da Índia, Brasil e Sri Lanka. Na Índia, evidenciou-se um nível de infecção múltipla semelhante ao da Colômbia, porém um LD não significativo (Imwong et al., 2007). Enquanto, no Brasil e Sri Lanka foi observada uma taxa elevada de infecção múltipla e um forte padrão de LD (Ferreira et al., 2007a; Karunaweera et al., 2008).

A seleção natural, assim como a recombinação, pode exercer forte influência na evolução dos parasitos da malária, principalmente através da pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro e pelas drogas antimaláricas (Wilson et al., 2005). A diversidade observada nos genes codificadores de antígenos, principalmente do merozoíto e esporozoíto, é comumente atribuída à pressão seletiva imposta pelo sistema imune do hospedeiro. Esses genes acumulam mutações, o que é favorecido pela seleção natural positiva, que impedem o reconhecimento do parasito pelo sistema de defesa do hospedeiro (Escalante et al., 2004). Como consequência, uma alta diversidade genética é mantida pela seleção natural positiva, freqüentemente com um excesso de mutações não-sinônimas, isto é, que resultam na substituição do aminoácido (Escalante et al., 2004). Enquanto, provavelmente, as mutações sinônimas (não há substituição do aminoácido) são neutras ou praticamente neutras, as substituições não-sinônimas são funcionalmente restritivas e, portanto, expostas à seleção natural (Ohta, 1996).

Vários estudos têm evidenciado a influência da seleção natural positiva no padrão de variabilidade genética dos antígenos do plasmódio, como AMA-1, MSP-1, MSP-2 e EBA-175 (Ferreira & Hartl, 2007; Ferreira et al., 2007b; Gunasekera et al., 2007; Putaporntip et al., 2006; Verra et al., 2006). Recentemente, Carlton e colaboradores (2008) ao analisarem 3322 genes de *P. vivax* (ortólogos de *P. knowlesi*), definiram as principais classes gênicas, cuja taxa de evolução é elevada:

genes que codificam proteínas de adesão celular, proteínas exportadas ou ancoradas por cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e proteínas com uma região transmembrana ou peptídio sinal. Em conjunto, esses estudos sugerem uma forte influência da pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro no padrão observado de polimorfismo gênico.

1.3 Caracterização da Duffy Binding Protein de *P. vivax*

Um dos antígenos muito estudado quanto à sua variabilidade, por ser um importante candidato à vacina contra a malária causada por *P. vivax*, é a Duffy binding protein (PvDBP). A interação da Duffy binding protein com seu receptor DARC na superfície do eritrócito humano constitui a principal via de invasão dessas células pelos merozoítos, pois os indivíduos que não expressam o receptor DARC na superfície de seus eritrócitos são refratários à infecção por *P. vivax* (Miller et al., 1976). Apenas recentemente foram reportados alguns casos de indivíduos DARC negativos infectados por *P. vivax*, no Quênia e Brasil, sugerindo que esse parasito utilize uma via alternativa para invadir os eritrócitos, embora a minoria dos isolados do parasito parece ser capaz de utilizar essa via alternativa (Cavasini et al., 2007; Ryan et al., 2006).

A Duffy binding protein de *P. vivax* (PvDBP) é uma molécula de 140 kDa que pertence a uma família de proteínas de adesão, expressas durante o ciclo eritrocítico do plasmódio. Essa superfamília inclui outras proteínas que se ligam ao eritrócito (erythrocyte binding protein, EBP): (a) a DBP α e as proteínas β e γ de *P. knowlesi*, um parasito de macacos do Velho Mundo, que também é capaz de invadir eritrócitos humanos que expressam o receptor DARC e; (b) as moléculas de adesão de *P. falciparum* EBA-175, BAEBL (EBA-140) e JSEBL (EBA-181) (Adams et al., 1990; Adams et al., 1992; Miller et al., 1975). Também pertencem a essa superfamília os antígenos variantes de superfície de *P. falciparum* (PfEMP1), envolvidos na citoaderência dos eritrócitos infectados ao endotélio microvascular e a outros eritrócitos não infectados (Howell et al., 2006). As proteínas dessa superfamília são caracterizadas pela presença de um domínio rico em resíduos de cisteína na região amino-terminal e funcionalmente conservado, conhecido como domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding like domain, DBL) (Adams et al., 1992; Barnwell & Wertheimer, 1989). Adicionalmente, as DBL-EBPs estão localizadas nos micronemas, organela intracelular localizada na região apical do merozoíto e apresentam um segundo domínio rico em cisteína na região carboxi-terminal da proteína (Adams et al., 1992).

A PvDBP pode ser dividida em sete regiões, definidas a partir da similaridade da sua estrutura gênica e seqüência de aminoácidos com as outras DBL-EBPs (Figura 2): uma região que contém o peptídeo sinal (região I), duas regiões ricas em cisteínas amino e carboxiterminal (região II e VI, respectivamente), três regiões

hidrofílicas (região III, IV e V), um domínio transmembrana e um curto segmento citoplasmático (região VII) (Adams et al., 1992; Fang et al., 1991). A região II da PvDBP (PvDBP_{II}), que corresponde ao domínio DBL, compreende 330 aminoácidos com 12 resíduos de cisteína e contém o sítio de ligação da proteína ao seu receptor nos eritrócitos (Adams et al., 1992; Ranjan & Chitnis, 1999). O sítio de ligação está localizado em um segmento de aproximadamente 170 aminoácidos entre as cisteínas 4 e 7 (Chitnis & Miller, 1994; Ranjan & Chitnis, 1999). A maioria dos resíduos de cisteína e vários aminoácidos aromáticos são conservados entre os domínios DBL, sugerindo que esses resíduos sejam estrutural e funcionalmente importantes (McHenry & Adams, 2006).

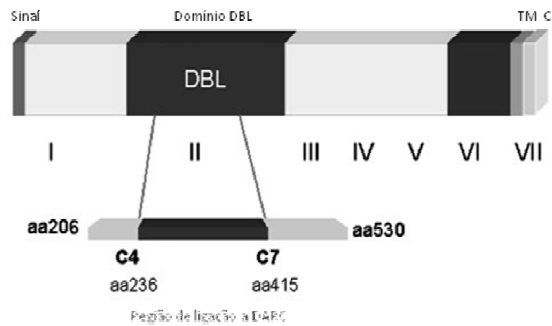


Figura 2. Representação esquemática da Duffy binding protein de *P. vivax*. Estão indicados na figura os domínios em algarismos romanos, o peptídeo sinal, os domínios transmembrana (TM) e citoplasmático (C) e o sítio de ligação ao receptor DARC dentro do domínio DBL (Duffy binding like). O sítio de ligação está localizado entre as cisteínas 4 e 7 (aa 236-415). Figura modificada de VanBuskirk; Sevova; Adams (2004b).

Recentemente, foram determinadas as estruturas terciárias dos dois domínios DBL da EBA-175 (F1 e F2) de *P. falciparum* e da DBP α de *P. knowlesi* (P κ DBP) (Singh et al., 2006; Tolia et al., 2005). Apesar da similaridade entre as estruturas desses domínios, as suas seqüências nucleotídicas são pouco conservadas (Singh et al., 2006; Tolia et al., 2005). Uma outra característica importante revelada a partir da elucidação da estrutura da EBA-175 e P κ DBP é que elas apresentam sítios de ligação distintos, o que, em parte, poderia explicar a capacidade dessas proteínas de se ligarem a diferentes receptores (Howell et al., 2006). O receptor eritrocítico da EBA-175 é a glicoforina A e a interação proteína-receptor requer a dimerização dos domínios DBL F1 e F2 (Sim et al., 1994; Tolia et al., 2005). Ao contrário da EBA-175, a interação da P κ DBP-DARC não requer a dimerização do domínio DBL, e de fato, os elementos de dimerização (resíduos de aminoácidos) definidos para a EBA-175 não estão presentes na P κ DBP ou na PvDBP (Singh et al., 2006).

No início do processo de invasão do eritrócito, a PvDBP está localizada nos micronemas e, apenas no momento exato da invasão, é liberada na superfície do merozoíto. Durante esse processo, sugere-se que a PvDBP se ligue rapidamente ao seu receptor eritrocítico e, portanto, seja exposta ao sistema imune do hospedeiro apenas por um curto período de tempo (Adams et al., 1990). Uma provável consequência da breve exposição da PvDBP na superfície do merozoíto é a sua reduzida imunogenicidade natural. Vários estudos avaliaram a prevalência de anticorpos anti-PvDBP em populações humanas de diferentes áreas endêmicas de malária e demonstraram uma alta proporção de indivíduos que não desenvolveram imunidade humoral contra essa proteína, principalmente nas áreas de menor endemicidade (Ceravolo et al., 2005; Fraser et al., 1997; Michon et al., 1998; Tran et al., 2005). Por outro lado, na Papua Nova Guiné, região hiperendêmica de malária, uma alta prevalência de anticorpos anti-PvDBP foi observada entre os indivíduos avaliados (Fraser et al., 1997; Tran et al., 2005). No Brasil, somente em áreas da região Amazônica brasileira, onde a transmissão da doença era elevada no momento do estudo e a população foi exposta à malária por um longo período de tempo, observou-se uma proporção elevada de indivíduos que desenvolveram anticorpos anti-PvDBP (Ceravolo et al., 2005). Esses estudos sugerem um possível aumento na resposta humoral anti-PvDBP como resultado da exposição repetida à infecção por *P. vivax* (Ceravolo et al., 2005; Fraser et al., 1997; Tran et al., 2005), mesmo em áreas de baixa transmissão de malária (Michon et al., 1998).

No Brasil demonstrou-se ainda que a exposição natural ao *P. vivax* induz anticorpos anti-PvDBP_{II} capazes de impedir a interação PvDBP_{II}-DARC. Contudo, o plasma de indivíduos esporadicamente expostos ao *P. vivax* não foi capaz de bloquear a interação proteína-receptor, sugerindo que uma exposição crônica seja necessária para induzir uma resposta eficaz de anticorpos inibitórios (Ceravolo et al., 2008). Adicionalmente à evidência de que anticorpos anti-PvDBP_{II} são capazes de bloquear a ligação da proteína à DARC, Grinberg e colaboradores (2007) demonstraram que esses anticorpos reduzem a eficiência de invasão dos eritrócitos por *P. vivax* in vitro (Grinberg et al., 2007). Recentemente, um estudo de coorte prospectivo com crianças da Papua Nova Guiné evidenciou uma associação entre presença de altos níveis de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} e proteção contra a infecção por *P. vivax* (King et al., 2008).

Apesar dos estudos apontarem a PvDBP_{II} como um fraco imunógeno natural, a imunização de animais tem demonstrado que esse antígeno é capaz de induzir uma forte resposta humoral (Arevalo-Herrera et al., 2005; Moreno et al., 2008; Yazdani et al., 2004). A antigenicidade da região II da PvDBP formulada com o adjuvante de Freund ou adjuvantes compatíveis para utilização em seres humanos foi avaliada em camundongos (Yazdani et al., 2004) e em primatas não humanos: *Aotus lemurinus* griseimembra (Arevalo-Herrera et al., 2005) e *Macaca mulatta* (macaco rhesus) (Moreno et al., 2008). A imunização de camundongos BALB/c induziu altos títulos de anticorpos anti-PvDBP_{II} que bloquearam eficientemente a ligação PvDBP_{II}-DARC in vitro (Yazdani et al., 2004). Além da forte resposta humoral induzida pela imunização de macacos *Aotus*, Arevalo-Herrera e colaboradores (2005) demonstraram que a imunização com a PvDBP_{II} formulada em adjuvante de Freund protegeu parcialmente os animais após desafio experimental com formas sanguíneas de *P. vivax*. Adicionalmente, os resultados de imunização com macaco rhesus, um grupo filogeneticamente mais próximo dos seres humanos, indicaram que todas as formulações da PvDBP_{II} utilizadas foram seguras e imunogênicas (Moreno et al., 2008).

Concomitantemente à breve exposição da PvDBP na superfície do merozoíto, a imunogenicidade natural da proteína também pode ser influenciada pela sua natureza altamente polimórfica. Foi demonstrado que indivíduos expostos à malária por um longo período de tempo desenvolveram uma imunidade humoral capaz de bloquear a interação de diferentes alelos PvDBP_{II} com DARC (Ceravolo et al., 2008; King et al., 2008). Esses resultados sugerem que uma vacina que inclua a PvDBP

poderia ser eficaz contra diferentes genótipos do parasito (Ceravolo et al., 2008; King et al., 2008). Porém, diferentes estudos sugerem que os polimorfismos comumente observados na PvDBP_{II} podem alterar o seu caráter antigênico e interferir no bloqueio da ligação PvDBP_{II}-DARC por anticorpos inibitórios (Xainli et al., 2003; VanBuskirk et al., 2004a). Vanbuskirk e colaboradores (2004a) demonstraram que alguns resíduos polimórficos dentro do domínio de ligação da PvDBP (região II) foram capazes de alterar significativamente a antigenicidade da proteína em um ensaio de ligação de eritrócitos *in vitro*.

Com base no padrão de diversidade da PvDBP_{II}, têm sido propostos dois mecanismos distintos de evasão imune utilizados pelo parasito (Cole-Tobian & King, 2003; Singh et al., 2006; Tsuboi et al., 1994). O primeiro mecanismo se baseia na presença de polimorfismos adjacentes ao sítio de ligação da PvDBP, sugerindo que parte da resposta imune anti-PvDBP é direcionada para essas regiões polimórficas. O modelo prediz que esses polimorfismos, ao impedirem a ligação de anticorpos inibitórios, protegeriam os resíduos funcionalmente críticos na interação PvDBP-DARC, garantindo a invasão do eritrócito (Cole-Tobian & King, 2003; Tsuboi et al., 1994). A partir da elucidação da estrutura da Pk α DBP e mapeamento de alguns resíduos polimórficos presentes nos isolados de campo de *P. vivax*, um modelo alternativo de evasão imune foi proposto por Singh e colaboradores (2006). Esse modelo se fundamenta na observação de que a maioria dos polimorfismos ocorre em uma região da proteína oposta ao sítio de ligação. Essa localização espacial oposta corroboraria a hipótese de liberação da PvDBP/Pk α DBP a partir dos micronemas apenas no momento da invasão (hipótese de liberação “just-in-time”), minimizando a exposição direta do sítio de ligação da proteína aos anticorpos. De acordo com esse modelo, os resíduos alvo do sistema imune se localizariam na superfície oposta ao sítio de ligação, região onde os polimorfismos predominantemente ocorreriam (Chitnis & Sharma, 2008; Singh et al., 2006).

Estudos sobre a variabilidade genética da PvDBP foram realizados na Colômbia, Coréia do Sul, Papua Nova Guiné e Tailândia, indicando que a região II é a região mais polimórfica da proteína e que o padrão de variabilidade nessa região difere entre os isolados do parasito provenientes das diferentes áreas geográficas estudadas (Ampudia et al., 1996; Cole-Tobian et al., 2002; Gosi et al., 2008; Kho et al., 2001; Suh et al., 2001; Tsuboi et al., 1994; Xainli et al., 2000). É sugerido que o padrão de diversidade genética observado na PvDBP_{II} é mantido pela seleção natural, evidenciando-se duas tendências distintas quanto ao tipo de força seletiva

agindo sobre a proteína (Cole-Tobian & King, 2003; Martinez et al., 2004). Tanto a seleção natural positiva, quanto a seleção purificadora parecem influenciar o padrão observado de diversidade da PvDBP_{II}, porém, até o momento, não se identificou claramente as regiões da proteína e o tipo de pressão seletiva a qual essas regiões estão expostas (Cole-Tobian & King, 2003; Martinez et al., 2004).

Resultados inconclusivos também foram obtidos quanto à contribuição da recombinação para a diversidade observada na PvDBP (Cole-Tobian & King, 2003; Martinez et al., 2004). Enquanto os testes utilizados por Cole-Tobian e colaboradores (2003) não evidenciaram a presença de recombinação no gene que codifica a PvDBP_{II}, Martinez e colaboradores (2004) sugeriram que a recombinação poderia ser um fator importante para a geração de diversidade alélica nessa proteína. Em conclusão, a análise da variabilidade genética da PvDBP e o entendimento dos mecanismos evolutivos responsáveis por gerar e manter essa diversidade fazem-se necessários para uma melhor compreensão da relação entre variabilidade da PvDBP e imunidade natural, bem como para o desenvolvimento de uma vacina anti-*P. vivax* que inclua esse antígeno.

1.4 O antígeno Duffy/Receptor para Quimiocinas (DARC)

O receptor para a Duffy binding protein de *P. vivax* e *P. knowlesi* nos eritrócitos humanos é também um receptor para vários membros de quimiocinas das classes C-C e C-X-C, conhecido como antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (Duffy antigen/receptor for chemokines, DARC) (Chaudhuri et al., 1989; Horuk et al., 1993; Miller et al., 1975; 1976). Essa glicoproteína de 40-45 kDa é expressa principalmente nos eritrócitos e nas células endoteliais de vênulas pós-capilares de vários tecidos e, provavelmente, tem um papel na regulação dos processos inflamatórios. DARC, ao contrário dos receptores clássicos de quimiocinas, não apresenta o motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) necessário para o acoplamento da proteína G ao receptor e, portanto, não ativa cascatas de sinalização intracelular via proteína G (Hadley & Peiper, 1997; Pruenster et al., 2009; Pruenster & Rot, 2006).

O gene que codifica o receptor DARC é formado por dois exons e um intron de aproximadamente 450 pb (Figura 3). O primeiro exon codifica somente os sete primeiros aminoácidos da proteína. O processamento do intron produz um transcrito de RNA mensageiro (RNAm), conhecido como transcrito principal ou forma β , que codifica a forma predominante de DARC de 336 aminoácidos (Iwamoto et al., 1995). Uma forma menos abundante da proteína, com 338 aminoácidos é codificada por um RNAm, denominado de transcrito minoritário ou forma α (Chaudhuri et al., 1993; Yazdanbakhsh et al., 2000). As duas formas do transcrito de RNAm codificam proteínas funcionalmente idênticas (Yazdanbakhsh et al., 2000).

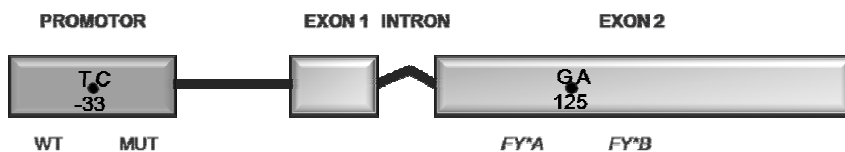


Figura 3. Representação esquemática do gene FY que codifica DARC, incluindo a região promotora, dois exons e o intron entre os exons 1 e 2. Está representado na figura: a mutação G125A, que define os alelos FY*A e FY*B, respectivamente e; a mutação T-33C, que diferencia o promotor selvagem (WT) do promotor mutado (MUT). Figura modificada de Cavalini e colaboradores (2001).

O receptor DARC é constituído por uma região extracelular amino-terminal (extracelular amino-terminal domain 1, ECD1) de aproximadamente 60 aminoácidos; uma região central (~250 resíduos) constituída por sete domínios transmembrana, três alças extracelulares (ECD2 a ECD4) e três alças intracelulares; e uma região citoplasmática de 28 resíduos (Hadley & Peiper, 1997). A região de DARC que interage com a DBP é constituída por 35 aminoácidos (Ala8-Asp42) e está localizada na região ECD1 (Chitnis et al., 1996; Tournamille et al., 2005). O sítio de ligação para quimiocinas é formado pela associação dos quatro domínios extracelulares de DARC (ECD1-4) (Tournamille et al., 1997; 2003). Recentemente, Choe e colaboradores (2005) demonstraram que um resíduo de tirosina sulfatada (Tyr 41) na região amino-terminal de DARC é essencial para a interação entre DBP e DARC. Adicionalmente, foi demonstrada a participação dessa tirosina sulfatada na interação entre DARC e algumas quimiocinas (MCP-1, RANTES e MGSA), entretanto a interação de outra quimiocina, a IL-8, é parcialmente depende da sulfatação da tirosina na posição 30 (Choe et al., 2005).

O locus Duffy/DARC (FY) está localizado no cromossomo 1, sendo caracterizado por três alelos principais: FY*A, FY*B e FY*B^{ES} (ES, erythroid silent; silenciado na linhagem eritróide) (Hadley & Peiper, 1997). Os dois alelos funcionais co-dominantes FY*A e FY*B codificam os antígenos Fy^a e Fy^b, respectivamente. Esses alelos diferem em uma única mutação de ponto ou SNP na posição 125 (G125A), que é responsável pela substituição de uma glicina em Fy^a por um ácido aspártico em Fy^b (Gly42Asp) (Chaudhuri et al., 1995; Iwamoto et al., 1995; Mallinson et al., 1995). Esses antígenos definem os fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+), enquanto a completa ausência de expressão desses antígenos nos eritrócitos define o fenótipo DARC negativo Fy(a-b-) (Tournamille et al., 1995a; 1995b). Esse fenótipo é caracterizado pela presença de dois alelos não funcionais FY*B^{ES}, cujo silenciamento gênico se deve a uma mutação na região promotora do gene FY (T-33C). Essa alteração impede a ligação do fator de transcrição à região promotora GATA-1 mutada do gene nos eritrócitos, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos (Tournamille et al., 1995a). Um alelo raro que apresenta a mutação T-33C na região promotora do gene FYA (FY*A^{ES}), também responsável pela negatividade de DARC, foi descrito na região da Papua Nova Guiné, sempre em heterozigose com o alelo FY*A (Zimmerman et al., 1999). Esse alelo também foi identificado em pacientes infectados por *P. vivax* da Amazônia brasileira e em doadores não-infectados de regiões não endêmicas (Langhi et al., 2004a; 2004b).

Recentemente, várias mutações foram descritas no gene FY, como a substituição C265T (Arg89Cys) no alelo FY*B, que define o alelo FY*X, responsável por uma expressão fraca ou qualitativamente reduzida do antígeno Fy^b na superfície dos eritrócitos. Tal alelo está associado ao fenótipo Fy(a+b^{weak}) (Tournamille et al., 1998). Entre outras mutações raras descritas no gene FY estão a G298A (Ala100Thr), G145T (Ala49Ser) e as mutações sem sentido Trp96 e Trp136 (Castilho et al., 2004; Olsson et al., 1998; Rios et al., 2000).

O genótipo DARC, bem como o estado de maturação dos eritrócitos, influenciam o nível de expressão do receptor DARC na superfície dessas células (Woolley et al., 2000; Yazdanbakhsh et al., 2000; Zimmerman et al., 1999). A expressão de DARC é significativamente maior nos reticulócitos em comparação com os eritrócitos maduros, consistente com o fato de que o volume e a área de superfície dos reticulócitos são maiores que dos eritrócitos maduros (Killmann, 1964; Woolley et al., 2000). Adicionalmente, há a possibilidade de uma expressão recente de DARC nos reticulócitos, resultando na maior expressão de DARC nessas células. Essa possibilidade é consistente com a identificação de um maior número de transcritos de RNAm DARC nos reticulócitos em relação aos eritrócitos maduros (Omi et al., 1997; Woolley et al., 2000).

Em relação ao genótipo DARC, uma expressão reduzida desse antígeno nos eritrócitos foi observada em indivíduos heterozigotos para a mutação T-33C no promotor do gene FY (alelos FY*B^{ES} e FY*A^{ES}). Esses indivíduos expressavam aproximadamente duas vezes menos DARC na superfície dos RBCs em relação aos indivíduos homozigotos para o promotor não mutado (alelos FY*A, FY*B) (Woolley et al., 2000; Yazdanbakhsh et al., 2000; Zimmerman et al., 1999). Similarmente, o alelo FY*X é responsável por uma expressão significativamente reduzida de DARC (Yazdanbakhsh et al., 2000).

Algumas evidências sugerem que o nível de expressão de DARC nos eritrócitos pode estar associado à suscetibilidade a infecção por *P. vivax*. Uma evidência indireta dessa associação foi obtida por Michon e colaboradores (2001). Nesse estudo, a expressão diminuída de DARC nos eritrócitos de indivíduos com um único alelo DARC funcional resultou na redução significativa da citoaderência dos eritrócitos à PvDBP_{II} expressa na superfície de células COS-7 in vitro. Esses resultados sugerem que a presença de um único alelo não-funcional (FY*B^{ES} ou FY*A^{ES}) poderia reduzir a suscetibilidade à infecção por *P. vivax* (Michon et al., 2001). Similarmente, Zimmerman e colaboradores (1999) evidenciaram um aumento

de duas vezes na prevalência de infecção por *P. vivax* em indivíduos da Papua Nova Guiné com o genótipo FY*A/FY*A comparado com FY*A/FY*A^{ES}. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos avaliados com o genótipo FY*A/FY*A^{ES} (Zimmerman et al., 1999). Recentemente, evidência mais direta foi obtida em um estudo epidemiológico conduzido na Papua Nova Guiné, onde o genótipo FY*A/FY*A^{ES} estava significativamente associado à susceptibilidade reduzida à infecção por *P. vivax* (Kasehagen et al., 2007). Além desse, outros estudos epidemiológicos são necessários com o objetivo de avaliar a associação entre os diferentes fenótipos de expressão de DARC e a susceptibilidade à infecção por *P. vivax*.

2 JUSTIFICATIVA

A malária causada por *P. vivax* atinge milhões de pessoas no mundo, resultando em importantes perdas sociais e econômicas. No Brasil, essa é a espécie mais prevalente, tendo sido responsável por cerca de 360 mil casos da doença em 2007 (SVS, 2008). *P. vivax* é frequentemente associado à malária branda, descomplicada e raramente fatal. Entretanto, nos últimos anos vários estudos têm desafiado esse dogma, apontando índices que revelam que a malária causada por *P. vivax* pode resultar em complicações e até mesmo levar ao óbito em níveis comparados ao de *P. falciparum* (Genton et al., 2008; Rogerson & Carter, 2008; Santos-Ciminera, 2005; Tjitra et al., 2008). Considerando que a malária vivax é um problema de saúde pública em várias regiões do mundo, é fundamental o conhecimento da biologia do parasito para o desenvolvimento de medidas mais efetivas que auxiliem no controle da doença, como uma vacina.

Nesse sentido, o presente estudo caracterizou, do ponto de vista molecular, as variantes da Duffy binding protein (DBP) de isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira e investigou a associação entre o nível de expressão do receptor DARC e suscetibilidade à infecção por *P. vivax*. O interesse inicial em se estudar a PvDBP deve-se à sua relevância no processo de invasão dos eritrócitos, o que a torna um dos principais alvos de uma vacina anti-*P. vivax*. Evidências experimentais e estudos epidemiológicos demonstraram que anticorpos anti-PvDBP são capazes de impedir a interação proteína-receptor, interferindo no processo de invasão (Ceravolo et al., 2008; Grimberg et al., 2007; King et al., 2008). Entretanto, os polimorfismos de ocorrência natural na PvDBP podem alterar o seu caráter antigênico (Grimberg et al., 2007; King et al., 2008; VanBuskirk et al., 2004a). Dessa forma, a alta diversidade genética comumente observada no gene que codifica a PvDBP, inclusive em regiões de epitopos de células B e T, poderia comprometer a eficácia de uma vacina antimalárica (Cole-Tobian & King, 2003). Esses resultados indicam a necessidade de caracterização da variabilidade genética da PvDBP e de uma melhor compreensão sobre a origem dessa diversidade, visando o desenvolvimento de uma vacina anti-PvDBP capaz de induzir anticorpos que bloqueiem a invasão do eritrócito.

É sugerido que a diversidade no gene que codifica a PvDBP resulte, principalmente, da pressão seletiva natural do sistema imune do hospedeiro (Cole-Tobian & King, 2003; Martinez et al., 2004). Entretanto, os estudos são inconclusivos quanto ao tipo de seleção natural e as regiões da proteína sob pressão seletiva. Um

outro ponto controverso é quanto a contribuição da recombinação genética na geração de diversidade no gene dbp (Cole-Tobian & King, 2003; Martinez et al., 2004). Compreender como esses fatores moldam o padrão de diversidade genética da PvDBP é relevante para a epidemiologia molecular da malária, a medida que possibilita o estabelecimento temporal e espacial do repertório antigênico dos isolados de *P. vivax* das regiões malarígenas.

Em adição a PvDBP, aspectos do receptor DARC também foram abordados neste estudo. Além do papel de DARC como um receptor para *P. vivax*, essa proteína também apresenta relevância clínica, pois está associada, em alguns casos, à incompatibilidade sanguínea (Horuk et al., 1993; Miller et al., 1976). Nesse sentido, o objetivo do estudo foi desenvolver uma metodologia de genotipagem de DARC mais rápida e de baixo custo e explorar a relação entre o genótipo DARC e suscetibilidade à infecção por *P. vivax*. Até o momento, essa é uma questão apenas parcialmente respondida, em que foi evidenciada uma diferença significativa quanto à prevalência da malária vivax entre indivíduos que apresentam um e dois alelos funcionais FY*A em uma região de alta transmissão de malária (Kasehagen et al., 2007).

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o padrão de diversidade genética do domínio de ligação da Duffy binding protein de isolados de *P. vivax* da Amazônia Legal brasileira.

3.1 Objetivos Específicos

Analisar a diversidade genética da DBP_{II} de isolados de *P. vivax* de diferentes regiões da Amazônia Legal brasileira.

Estimar a variação da intensidade da seleção natural e recombinação no gene que codifica a DBP_{II} em isolados de *P. vivax* do Brasil.

Determinar a distribuição dos SNPs e dos resíduos de aminoácidos sob pressão seletiva na estrutura tridimensional da PvDBP_{II}.

Desenvolver uma metodologia rápida para genotipagem do receptor DARC.

Avaliar a associação entre a prevalência dos alelos DARC e suscetibilidade à infecção por *P. vivax*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de Coleta das Amostras de Sangue

4.1.1 Amazônia Legal

As amostras de DNA utilizadas neste estudo foram extraídas do sangue periférico de indivíduos expostos à malária de diferentes municípios da Amazônia Legal brasileira: Acrelândia/AC, Augusto Correa/PA, Cuiabá/MT, Macapá/AP, Manaus/AM e Porto Velho/RO (Figura 4). As áreas de estudo são caracterizadas como regiões hipo a mesoendêmicas de malária, apresentando transmissão instável e sazonal (SVS, 2008). Nessas áreas, a distribuição da malária não é homogênea, mas predominantemente focal (Atanaka-Santos et al., 2006; SVS, 2008). Nos anos de coleta das amostras, entre 2003 e 2005, o número médio de casos de malária foi de 490.000 na Amazônia Legal brasileira (SVS, 2007).

No mesmo período, o risco de transmissão de malária na maioria das áreas de estudo, determinado pela incidência parasitária anual ou IPA (número de casos por 1000 habitantes) foi, em geral, superior as médias de 18,3 a 26,6 casos por mil habitantes para toda a região da Amazônia brasileira no período de 2003 a 2006 (SVS, 2007). Assim, a incidência parasitária anual de cada localidade no momento da coleta de sangue foi de: 166 em Acrelândia, 119 em Augusto Correa, 152 em Cuiabá, 9 em Macapá, 50 em Manaus e 139 em Porto Velho (SVS, 2005). Com exceção de Cuiabá e Porto Velho, todas as localidades corresponderam à região de infecção dos voluntários incluídos no estudo. Como algumas amostras coletadas em Cuiabá e Porto Velho não correspondiam a região de contágio, como declarado pelo doador no momento da coleta de sangue, os valores de IPA para essas localidades se referem à media dos valores de IPA das regiões de contágio.

Nas regiões estudadas, a transmissão de malária está associada a diferentes situações epidemiológicas. Ressalta-se as áreas periurbanas das cidades de Manaus, Macapá e Porto Velho, onde a transmissão de malária está associada principalmente à sua ocupação intensa e desordenada nos últimos anos (Barata, 1995; Cardoso & Goldenberg, 2007; SVS, 2007). Apenas os municípios de Manaus e Porto Velho concentraram 26,9% e 22,9% dos casos de malária da região Amazônica nos anos de 2003 e 2004, respectivamente (SVS, 2005). De modo geral, a transmissão de malária coincide com o processo de ocupação associado ao grau

de alteração do meio e exploração das fontes de riquezas naturais (Barata, 1995; Ferreira Gonçalves & Alecrim, 2004).

4.1.2 Região extra-Amazônica

Parte do estudo foi realizado com amostras de DNA extraídas do sangue periférico de indivíduos infectados por *P. vivax* no distrito de Souza, município de Rio Manso/MG. Nesta região, entre os meses de abril e maio de 2003 foi identificado, pela Secretaria de Estado de Minas Gerais e Coordenação de Gestão da Região Metropolitana de Belo Horizonte/MG, um pequeno foco de transmissão autóctone de malária por *P. vivax* (25 casos). A investigação epidemiológica realizada pelos órgãos encarregados de controlar o surto sugeriu que a transmissão se iniciou a partir de um único indivíduo que se infectou após visitar uma área endêmica de malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas (Cerbino et al., 2004).



Figura 4. Mapa do Brasil indicando a localização das áreas de coleta das amostras de sangue utilizadas neste estudo.

4.2 Amostras de Sangue

As amostras de DNA foram extraídas do sangue periférico de 202 indivíduos infectados por *P. vivax*, *P. falciparum* e não infectados por nenhuma espécie de plasmódio, residentes em diferentes regiões da Amazônia Legal brasileira e no distrito de Souza/MG. Adicionalmente, amostras de DNA foram extraídas do sangue total de 76 voluntários do Centro de Pesquisas René Rachou (Tabela 1). As amostras de sangue foram coletadas nas seguintes localidades: Acrelândia/AC (lat. -09°44'40"S, lon. 66°53'00"O, alt. 25m); Augusto Correa/PA (lat. 01°01'18"S, lon. 46°38'06"O, alt. 20m); Cuiabá/MT (lat. 15°35'45"S, lon. 56°05'49"O, alt. 165m); Macapá/AP (lat. 00°02'20"S, lon. 51°03'59"O, alt. 16m); Manaus/AM (20) (lat. 03°06'07"S, lon. 60°01'30"O, alt. 92m); Porto Velho/RO (lat. 15°38'42"S, lon. 56°05'52"O, alt. 85m) e; Souza/MG (lat. 20°13'13"S, lon. 44°16'16"O, alt. 1306m), onde ocorreu um surto de malária por *P. vivax* entre os meses de abril e maio de 2003.

As amostras provenientes do Acre foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Urbano Ferreira (USP) e descritas em Silva-Nunes e colaboradores (2006). As amostras provenientes de Rondônia e Mato Grosso foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Herman Soares Gil (IPEPATRO) e pelo Dr. Cor Jesús F. Fontes (UFMT), respectivamente. As demais amostras foram coletadas pelo nosso grupo. Após o consentimento por escrito dos voluntários selecionados para o estudo, foi coletado cerca de 5ml de sangue por punção venosa na presença de EDTA utilizando o sistema Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Áustria). Os seguintes critérios foram considerados para inclusão no estudo: (1) história de exposição prévia à malária; (2) ausência de sinais ou sintomas relacionados à malária grave; (3) idade igual ou superior a 15 anos e, para o sexo feminino, (4) indicativo de ausência de gravidez. A identificação da infecção por *P. vivax* foi feita por exame microscópico de gota espessa de sangue corada pelo Giemsa por técnicos treinados das Unidades de Saúde de cada cidade.

Este estudo foi conduzido após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Processos 02/2002 e 06/2004).

Tabela 1. Descrição das amostras de sangue coletadas de voluntários selecionados para o estudo.

Nº de Indivíduos	Localidade de Coleta (Cidade/UF)	Data da Coleta	Tipo de Infecção (Espécie de Plasmodium)
14 ^{a,b}	Macapá/AP	Novembro de 2004	P. vivax
20 ^{a,b}	Manaus/AM	Maio de 2003	P. vivax
18 ^{a,b}	Augusto Correa/PA	Outubro de 2005	P. vivax
20 ^{a,b}	Porto Velho/RO	2004	P. vivax
25 ^{a,b}	Cuiabá/MT	ilho - Dezembro de 2003 e Março - Julho de 2004	P. vivax
25 ^a	Acrelândia/AC	Março e Abril de 2004	P. vivax
29 ^b	Várias regiões da Amazônia brasileira	2003 - 2005	P. falciparum
23 ^b	Souza/MG	Abril e Maio de 2003	P. vivax
76 ^b	Belo Horizonte ^c	2003 - 2008	Não infectado
14 ^b	Várias regiões da Amazônia brasileira	2003 - 2005	Não infectado
14 ^b	Souza/MG	Abril e Maio de 2003	Não infectado

^a Amostras utilizadas na análise da variabilidade da PvDBP_{II}

^b Amostras utilizadas na genotipagem de DARC

^c Amostras coletadas de voluntários do CPqRR/FIOCRUZ

4.3 Extração de DNA

O sistema de purificação de DNA genômico Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, USA) foi utilizado na preparação das amostras de DNA de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, adicionou-se 9ml de solução de lise de hemácias (cloreto de amônio, EDTA, bicarbonato de sódio) a 3ml de sangue periférico, seguido pela incubação por 10min a temperatura ambiente e centrifugação a 2000 x g por 10min a 25°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento de células foi ressuscitado em 3ml de solução de lise celular (tris-hidroximetil aminometano, EDTA, dodecil sulfato de sódio). Em seguida, adicionou-se 1ml de solução de precipitação (acetato de amônio) ao lisado celular. A preparação foi homogeneizada por 20s em agitador de tubos (Vortex) e centrifugada a 2000 x g por 10min a 25°C. A precipitação do DNA foi realizada a partir da transferência do sobrenadante contendo o DNA solúvel para um tubo com 3ml de isopropanol. A amostra foi misturada por inversão e centrifugada a 2000 x g por 3min a 25°C. Após remoção do sobrenadante, o DNA foi lavado adicionando-se 3ml de etanol 70%, seguido pela centrifugação a 2000 x g por 1min a 25°C e descarte do etanol. Após a completa evaporação do etanol por 10-15min, o DNA foi hidratado com 250µl de solução de hidratação (tris-hidroximetil aminometano, EDTA) por 1h a 65°C e em seguida por 16h a temperatura ambiente. Posteriormente à extração, o DNA foi estocado a -20°C até o seu uso.

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase para Amplificação da PvDBP_{II}

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas para a amplificação de um fragmento de 675bp (nucleotídeos 870-1545; aminoácidos 290-515) dentro do domínio II da proteína Duffy Binding Protein de *P. vivax* (PvDBP_{II}). Os iniciadores utilizados (senso – 5' ATGTATGAAGGAAGCTTACGAAT 3' e anti-senso – 5' ACCTGCCGTCTGAACCTTTT 3') foram desenhados através do programa Oligo 6.4 (Molecular Biology Insights, Colorado, USA). As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20µl, utilizando 100-200ng da amostra de DNA, 0,5µM de cada iniciador, 1,25mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,75mM de MgCl₂, 1U da enzima platinum Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen, California, USA) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As amplificações foram conduzidas em

termocicladores automáticos Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e PTC100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Massachusetts, USA). As condições da PCR foram um ciclo de 3min a 94°C, seguido por cinco ciclos de 30s a 94°C, 35s a 58°C, 30s a 72°C, 15 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 54°C, 30s a 72°C, 22 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 61°C, 40s a 72°C e um ciclo de extensão final de 5min a 72°C.

Em seguida, foi realizada uma segunda reação de amplificação a partir do produto do primeiro PCR. Na segunda reação foram utilizados os mesmos iniciadores, porém para um volume final de 100µl: 2µl de DNA amplificado a partir da reação descrita anteriormente, 0,5µM de cada iniciador, 0,75mM de MgCl₂, 1,25mM dNTPs, 5U da enzima platinum Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen) e o seu tampão 1X. As condições da PCR foram um ciclo de 3min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 61°C, 1min a 72°C e um ciclo de extensão final de 5min a 72°C.

4.5 Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o sistema DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), baseado no método de terminação de cadeia com ddNTPs descrito por Sanger et al. (1977). Nas reações de seqüenciamento foram utilizados os produtos amplificados pela PCR, tratados com o sistema de purificação de PCR GFX-96 (Amersham Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, para a reação de seqüenciamento adicionou-se a cada poço de uma placa de 96 poços até 5µl de DNA (cerca de 70ng), 1µl de iniciador (3,3µM dos mesmos iniciadores utilizados na PCR) e 4µl de DYEnamic ET terminator mix contendo tampão, enzima, dNTPs e ddNTPs para um volume total de 10µl de reação. As reações foram conduzidas em termociclador automático Mastercycler Gradient (Eppendorf) programado para 35 ciclos com desnaturaçã a 95°C por 20s e anelamento e extensão a 60°C por 3min. O DNA foi precipitado adicionando-se 1µl de acetato de amônio 7,5M e 30µl de etanol 96%. O homogeneizado foi incubado por 20min a 25°C e centrifugado a 2500 x g por 45min a 25°C. O sobrenadante foi

removido por inversão da placa e o sedimento lavado com 100µl de etanol 70%. Após descarte do excesso de álcool, a placa foi centrifugada a 600 x g por 1 segundo a 25°C sobre papel absorvente e o restante do álcool deixado evaporar por cerca de 10min a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 10µl de tampão (70% formamida, 1mM EDTA) e armazenado a 4°C. As reações de seqüenciamento foram analisadas através de eletroforese capilar utilizando o seqüenciador automático de DNA MegaBACE (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) .

4.6 Análise das seqüências

Os polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados a partir do alinhando das seqüências da PvDBP_{II} com os programas ClustalW (Thompson et al., 1994) e Contig Assembly Program (CAP) (Huang, 1992), dentro do pacote de programas BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9 (Hall, 1999). No BioEdit, quando necessário foi realizada a edição manual do alinhamento. Para cada amostra analisada, a confirmação dos SNPs foi feita a partir de, no mínimo, três seqüenciamentos de cada uma das fitas senso e anti-senso de diferentes produtos da PCR.

Análises adicionais foram conduzidas utilizando 290 seqüências do gene dbpII depositadas no banco de dados GenBank (dados atualizados até 25 de setembro de 2008). Seqüências de genes ortólogos da PvDBP_{II} foram utilizadas como grupo externo na análise filogenética: a seqüência do gene da erythrocyte-binding protein (ebp) de *Plasmodium cynomolgi* (Y11396), a seqüência gênica da Duffy binding protein α de *P. knowlesi* (M90466) e as seqüências dos genes das proteínas β e γ de *P. knowlesi* (M90694, M90695).

A árvore filogenética dos haplótipos da dbpII de isolados de *P. vivax* do Brasil foi reconstruída pelo método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), utilizando o modelo de substituição nucleotídica distância-p (Nei & Kumar, 2000) implementado no programa MEGA v4.0 (Tamura et al., 2007). A consistência dos padrões de agrupamento na árvore foi avaliada através do método de bootstrap com 1000 repetições.

Os índices de diversidade genética intrapopulacional foram calculados usando o programa DnaSP v.4.10 (Rozas et al., 2003): o número de sítios segregantes (S), que depende do tamanho da amostra e do comprimento das seqüências; o número

de haplótipos (H); a diversidade nucleotídica (π) e seu desvio padrão e a diversidade haplotípica (Hd) e seu desvio padrão. A diversidade nucleotídica, definida como o número médio de diferenças nucleotídicas entre quaisquer duas seqüências amostradas aleatoriamente em uma população foi calculada de acordo com Nei (1987):

$$\pi = n/(n-1) \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

em que n é o número de seqüências analisadas, p_i é a freqüência da seqüência i na amostra e π_{ij} é a proporção de diferenças nucleotídicas entre as seqüências i e j. A diversidade haplotípica, definida como a probabilidade de amostrar aleatoriamente dois haplótipos distintos em uma população, foi calculada de acordo com Nei (1987):

$$Hd = [n/(n-1)] [1 - \sum_{i=1}^k p_i^2]$$

em que n é o número de isolados do parasito analisados e p_i é a freqüência do haplótipo i na amostra (Nei, 1987).

O índice de diversidade genética F_{ST} que estima a quantidade de diferenciação genética entre as populações foi calculado utilizando o programa Arlequin v.3.01 (Excoffier et al., 2005). A consistência das estimativas foi calculada pelo método de bootstrap utilizando 10000 repetições. A correlação entre distância genética (F_{ST}) e distância geográfica entre os pares de populações foi estabelecida através do coeficiente de correlação de Spearman.

O desequilíbrio de ligação entre os pares de SNPs identificados nas amostras do Brasil foi medido utilizando o quadrado do coeficiente de correlação (r^2) e visualizado com o programa Haploview (Barret et al., 2005). Somente os SNPs cuja freqüência era igual ou superior a 10% foram considerados nas análises.

A estimativa do parâmetro de recombinação populacional ρ para a dbpII foi realizada utilizando o programa PHASE v.2.1 (Li & Stephens, 2003). As estimativas de ρ foram obtidas a partir da execução no PHASE de duas rodadas de 500.000 iterações cada, sendo descartadas as primeiras 20.000 iterações (burn-in). O parâmetro ρ é definido pela expressão $4Ner$, em que r é a taxa de recombinação por geração e Ne é o tamanho efetivo da população. A taxa de recombinação por geração (r) é igual a probabilidade de ocorrência de um evento de recombinação durante a meiose e depende de fatores genômicos, tais como a seqüência local ou a estrutura do DNA. Em adição aos fatores genômicos, o parâmetro ρ também depende da história demográfica e, portanto, pode diferir substancialmente entre as

populações (Hellenthal & Stephens, 2006; Stumpf & McVean, 2003). O método estatístico implementado no PHASE para estimar p é descrito com detalhes em Li e Stephens (2003). Resumidamente, o método estima o parâmetro de recombinação a partir do padrão de desequilíbrio de ligação (LD), considerando todos os loci simultaneamente (Li & Stephens, 2003).

O método estatístico desenvolvido por Wilson e McVean (2006) e implementado no programa omegaMap foi utilizado para estimar o parâmetro de seleção ω e o parâmetro de recombinação p a partir das seqüências gênicas. O método emprega a estatística bayesiana para estimar os parâmetros de seleção e recombinação independentemente da reconstrução de uma árvore filogenética, reduzindo a taxa de falso-positivos na detecção de codons sob seleção positiva (Wilson & McVean, 2006). A distribuição posterior dos parâmetros foi obtida a partir da execução de dezesseis cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) de 90.000 iterações cada, sendo descartadas as primeiras 10.000 iterações (burn-in). O parâmetro de seleção é definido pela expressão d_N/d_S , em que d_N é o número de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo e d_S é o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo. Valores de ω menores que 1 sugerem ação da seleção purificadora, valores de ω acima de 1 sugerem ação da seleção positiva, enquanto que na ausência de seleção, o valor esperado de ω é 1.

4.7 Predição de epitopos in silico

A predição in silico de regiões na seqüência da PvDBP_{II} capazes de se ligar a vários alelos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II foi executada nos programas ProPred-I e ProPred, respectivamente. Esses programas implementam diversas matrizes que caracterizam a especificidade de ligação das moléculas do MHC de classe I e II. Inicialmente, o algoritmo gera peptídeos sobrepostos de 9 aminoácidos a partir da seqüência da PvDBP_{II}. Em seguida, atribui-se um valor para cada resíduo no peptídeo de acordo com os valores de referência das matrizes implementadas no programa. Dependendo do tipo de matriz, a soma ou o produto desses valores para cada peptídeo é comparado com um valor limiar determinado pelo algoritmo para cada alelo do MHC de classe I e II. Os peptídeos que apresentam um valor superior ao limiar são preditos como capazes de se ligarem às moléculas do MHC de classe I ou II (Singh & Raghava, 2001; Sturniolo

et al., 1999). Neste estudo, foram selecionados os epitopos ditos promíscuos, cuja capacidade de ligação ocorre com a maioria dos alelos do MHC de classe I e II implementados no programa.

4.8 Modelagem Molecular

A modelagem computacional da estrutura tridimensional da PvDBP_{II} foi feita por homologia estrutural utilizando como molde a estrutura cristalográfica do domínio Duffy binding like (DBL) da Duffy binding protein α de *P. knowlesi* (Pk α DBP) (código de acesso no banco de dados de proteínas, PDB: 2C6J) (Singh et al., 2006). O domínio Pk α DBP compartilha 71% de identidade com a PvDBP_{II} e apresenta uma estrutura na forma de boomerang, monomérica, com 12 alfa-hélices formando três subdomínios distintos.

Os modelos da PvDBP_{II} entre os aminoácidos N261 e S553 foram gerados pelo programa Modeller 8v2 (Sali & Blundell, 1993). A qualidade estereoquímica dos modelos obtidos foi avaliada com o programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993) e a visualização das estruturas foi feita no programa PyMol v1.0 (Wijeyesakere et al., 2007).

4.9 Fenotipagem do receptor DARC

O sistema ID-Card FYA/FYB (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Switzerland) foi utilizado para a fenotipagem de DARC (antígeno Duffy/receptor para quimiocinas) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, uma suspensão de hemácias 0,8% foi preparada adicionando-se 1ml de solução ID-Diluent 2 com 25 μ l de sangue total fresco em um tubo de 1,5ml. Os anticorpos policlonais humanos anti-Fy^a e anti-Fy^b foram adicionados aos ID-Cartões Fy^a e Fy^b, respectivamente, seguido pela adição de 50 μ l da suspensão de hemácias aos microtubos de cada ID-Cartão. Após incubação por 15min a 37°C, os ID-Cartões foram centrifugados a 1030 rpm por 10min a 25°C em centrífuga ID-Centrifuge 12 S II (DiaMed AG).

4.10 Genotipagem do Receptor DARC pela Reação em Cadeia da Polimerase Alelo-Específica (PCR-ASP)

A amplificação dos alelos FY*A, FY*B, FY*A^{ES} e FY*B^{ES} foi realizada através da reação em cadeia da polimerase, utilizando iniciadores alelo-específicos (Tabela 2) descritos por Olsson e colaboradores (1998). Os pares de iniciadores FyAB2/FyAREV, FyAB2/FyBREV2, GATAFy2/FyAREV e GATAFy2/FyBREV2 amplificam um fragmento de 711pb e foram utilizados para detecção dos alelos FY*A, FY*B, FY*A^{ES} e FY*B^{ES}, respectivamente. Para um volume final de reação de 25µl foi utilizado 200ng de DNA genômico, 0,2µM de cada iniciador, 200µM dNTPs, 4mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase (Promega Corporation, Wisconsin, USA) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As amplificações foram conduzidas em termociclador automático PTC100TM Programmable Thermal Controller e as condições da PCR foram: um ciclo de 5min a 95°C; quatro ciclos de 1min a 95°C, 1min a 69°C e 1min a 72°C; 31 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 68°C e 1min a 72°C e uma extensão final de 5min a 72°C.

Tabela 2. Relação dos iniciadores utilizados na genotipagem do receptor DARC por PCR alelo-específica (PCR-ASP) e PCR em tempo real (RT-PCR).

Iniciador	Metodologia ^a	Seqüência
FyAB2	PCR-ASP	5' CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT 3'
FyAREV	PCR-ASP	5' AGCTGCTTCCAGGTTGGCAC 3'
FyBREV2	PCR-ASP	5' AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT 3'
GATAFy2	PCR-ASP	5' CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC 3'
FY	RT-PCR	5' CTCAAGTCAGCTGGACTTCGAAGAT 3'
RYA	RT-PCR	5' AGCTGCTTCCAGGTTGGC <u>I</u> C 3'
RYB	RT-PCR	5' CTGCTTCCAGGTTGGC <u>G</u> T 3'
RABGATA	RT-PCR	5' AGGGGCATAGGGATAAGGGACT 3'
FAB	RT-PCR	5' CCCTCATTAGTCCTTGGCTCTT <u>I</u> T 3'
FGATA	RT-PCR	5'CCCGGGCCCGCCGCCCTCATTAGTCCTTGGCTCTT <u>I</u> C3'

^a Metodologia na qual o iniciador foi utilizado. Os iniciadores FyAB2, FyAREV, FyBREV2 e GATAFy2 foram descritos por Olsson e colaboradores (1998).

Nucleotídeo em negrito – nucleotídeo polimórfico que define os alelos FY*A, FY*B e o promotor selvagem e mutado

Nucleotídeo sublinhado – alteração introduzida imediatamente anterior ao nucleotídeo polimórfico

Nucleotídeo em itálico – cauda C/G adicionada na porção 5' do iniciador

4.11 Genotipagem do Receptor DARC pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-time PCR)

As reações em cadeia da polimerase foram feitas em placas de 96 poços para um volume final de 10 μ l, adicionando-se 1 μ l da amostra de DNA (50-100ng), 5 μ l de SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, California, USA) e 10pmoles de cada iniciador (desenhados conforme descrito abaixo). A amplificação e a detecção de fluorescência foram feitas no ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições utilizadas na PCR foram um ciclo de 10min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C. Ao final da amplificação foi realizado um ciclo de variação crescente da temperatura (de 60°C a 95°C), com monitoramento constante da fluorescência a 530nm. Os picos de dissociação referentes aos produtos da PCR foram visualizados em gráficos da derivada negativa da fluorescência em função da temperatura versus a temperatura (-dF/dT° vs. T°).

Os iniciadores foram desenhados através do programa Primer Express[®] v.2.0 (Applied Biosystems). Os pares de iniciadores FY/RYA e FAB/RABGATA foram utilizados na mesma reação, como uma reação de PCR multiplex, bem como os pares FY/RYB e FGATA/RABGATA. Os iniciadores RYA e RYB apresentam o polimorfismo G125A na extremidade 3' e juntamente com o iniciador senso FY aplicam os alelos FY*A e FY*B, respectivamente. Para detecção da mutação T-33C na região promotora do gene FY, foram desenhados os iniciadores FAB e FGATA, que amplificam juntamente com o iniciador RABGATA, o promotor selvagem e mutado, respectivamente. Como os iniciadores FAB/FGATA e RYA/RYB são semelhantes, foi introduzida uma alteração no nucleotídeo (sublinhado na tabela 2) imediatamente anterior ao nucleotídeo polimórfico (em negrito na tabela 2), com o objetivo de impedir a amplificação inespecífica dos alelos. A alteração impede o pareamento nucleotídico na extremidade 3' entre o iniciador não-específico e a fita molde de DNA. Uma segunda modificação no iniciador FGATA foi realizada a partir da adição de uma cauda C/G na região 5' do iniciador, com a finalidade de aumentar a diferença de tamanho e temperatura de dissociação dos produtos da PCR amplificados com o par de iniciadores FAB e FGATA.

4.12 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa Epi Info v.3.3.2 (Burton et al., 1990). Neste estudo, avaliou-se a associação entre a taxa de transmissão de malária nas áreas estudadas, determinada pela incidência parasitária anual (IPA), e os níveis de diversidade nucleotídica e haplotípica da PvDBP_{II}. Como essas variáveis não apresentavam distribuição normal a associação entre elas foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman. A comparação entre as médias do parâmetro ω estimada para codons em regiões de epitopos de células B ou T ou fora dessas regiões foi realizada utilizando o teste não-paramétrico Mann Whitney. A diferença na prevalência dos alelos e genótipos DARC entre os grupos de indivíduos infectados por *P. vivax* e o grupo não infectado ou infectado por *P. falciparum* foi avaliada pelo teste qui-quadrado (χ^2) corrigido por Mantel-Haenszel ou pelo teste exato de Fischer. O teste exato de Fischer foi utilizado nas comparações entre grupos com um número de amostras inferior a cinco. Em todos os testes realizados o nível de significância considerado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados estão descritos nos artigos publicados ou submetidos à publicação em revistas indexadas e são apresentados na seguinte ordem:

- 5.1 SOUSA, T. N., CERAVOLO, I. P., FONTES, C. J. F., COUTO, A., CARVALHO, L. H. and BRITO, C. F. A. (2006). The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146, 251-254.

- 5.2 SOUSA, T., TARAZONA-SANTOS, E., WILSON, D., MADUREIRA, A., FALCÃO, P., FONTES, C., DE SOUZA, J., COUTO, A. A., GIL, L., FERREIRA, M., CARVALHO, L. and BRITO, C. (2009). Recombination and positive selection on epitopes have shaped the haplotype structure of the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein. Artigo submetido.

- 5.3 SOUSA, T. N., SANCHEZ, B. A., CERAVOLO, I. P., CARVALHO, L. H. and BRITO, C. F. (2007). Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. *Vox Sang*, 92, 373-380.



Short communication

The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area

Tais N. Sousa^a, Isabela P. Cerávol^a, Cor Jésus Fernandes Fontes^b,
Álvaro Couto^c, Iuzia H. Carvalho^a, Cristiana F.A. Brito^{a,*}

^a Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte/MG., CEP-30190 002, Brazil

^b Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá/MT, Brazil

^c Centro de Referência em Tratamentos Naturais, Macapá/AP, Brazil

Received 30 August 2005; received in revised form 3 November 2005; accepted 23 November 2005

Available online 13 December 2005

Keywords: *Plasmodium vivax*; Malaria; Duffy binding protein; single nucleotide polymorphism

Erythrocyte invasion by malaria parasites is a multi-step process that is dependent on binding of parasite proteins to receptors on the erythrocyte surface. Duffy-negative individuals are resistant to *Plasmodium vivax* infection because erythrocyte invasion by *P. vivax* merozoites is absolutely dependent on binding to the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC), making the parasite ligand an important vaccine candidate [1]. The parasite ligand, *P. vivax* Duffy binding protein (DBP) is a 140kDa protein that belongs to the family of homologous Duffy binding-like erythrocyte binding proteins (DBL-EBP), located within the micronemes of *Plasmodium* merozoites [2,3]. The protein ectodomain have two cysteine-rich regions which are conserved among DBL-EBPs, the 5' (region II) and the 3' (region IV). The region II (DBP_{II}) contains the binding motifs necessary for adherence of DBP to DARC on the erythrocyte surface. The minimal binding motif of DBP_{II} has been previously mapped to a 170 aa stretch that includes cysteines 5–8 [4,5]. Previous studies demonstrated that although the cysteine positions and some hydrophobic amino acids residues are conserved, other amino acids are highly polymorphic in the ligand domain and this diversity varies geographically from region to region [6]. To date, several *P. vivax* *dbp* sequences were obtained from Papua New

Guinea (PNG) [7–9], Colombia [10] and South Korea isolates [11]. Those previous studies have identified the major polymorphic residues in DBP_{II} which occur within the ligand domain. The pattern of excessive polymorphisms and the high rate of non-synonymous polymorphisms in the ligand domain suggest that this allelic variation functions as a mechanism of immune evasion [6].

The polymorphisms in the ligand domain do not seem to interfere in erythrocyte receptor recognition [12], but some of them do alter immune recognition of DBP [13]. Through an in vitro cytoadherence assay, previous study in PNG has identified the major polymorphic residues which altered immune recognition of DBP [13]. These authors also demonstrated that some of those polymorphic residues occur frequently in association, particularly residues 417, 437 and 503, suggesting that they compose an important discontinuous epitope in DBP which might be the main target for inhibitory antibodies [13]. As development of *P. vivax* DBP-based vaccine must take into account *dbpII* alleles, it is important to access the levels of genetic diversity of *dbpII* between populations from distinct geographic regions.

In Brazil, *P. vivax* malaria corresponded to approximately 80% of the 400,000 malaria cases reported in 2003 and the largest majority of cases are found in Amazon areas [14]. Malaria in the Brazilian Amazon is hypoendemic to mesoendemic and transmission is unstable with seasonal fluctuations occurring throughout the year [15]. Aiming to contribute for current efforts on vaccine development, we analyze here the DBP variability in Brazilian Amazon isolates, identifying polymorphisms in the major residues of DBP_{II} ligand domain which were previously

Abbreviations: DBP, Duffy binding protein; DARC, Duffy antigen receptor for chemokines; DBL-EBP, Duffy binding-like erythrocyte binding protein; DBP_{II}, region II of Duffy binding protein; PNG, Papua New Guinea; PCR, Polymerase chain reaction

* Corresponding author. Tel.: +55 31 32953566; fax: +55 31 32953115.

E-mail address: cristiana@cpqrr.fiocruz.br (C.F.A. Brito).

demonstrated to be involved in the immune recognition of DBP [13].

Forty *P. vivax* isolates were obtained from patients from different regions in the Brazilian Amazon. Patent infection was confirmed by microscopic analysis on Giemsa-stained blood smears. All patients were adults of 16–58 years of age, mean age of 32. DNA was extracted from whole blood sample by using the PUREGENE DNA isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) according to manufacturer's protocol. DNA was used as a template in polymerase chain reaction (PCR) to amplify the fragment corresponding to nucleotide positions 504–1748 (aa 168–582 of the DBP-II). Platinum high fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen, La Jolla, CA) was used in PCR to reduce possible nucleotide mis-incorporation. Amplicons were purified using QiaQuick Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and directly sequenced using DYEnamic™ ET dye terminator kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and a MegaBacc 500 DNA sequencer (Amersham). The sequences were analyzed using Bioedit software (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) and aligned on Clustal W (clustalw.genome.jp) to identify the polymorphisms at residues 308, 384, 386, 417, 424, 437, 447 and 503 according to VanBuskirk et al. [13]. Duffy binding protein encoding gene sequences of *P. vivax* deposited in GenBank were compiled and also analyzed to comparison with our isolates: the sequence from a reference clone Sal-I [2]; a sequence from Belem isolate [10]; 125 sequences from Papua New Guinea isolates (PNG) [7–9]; 17 sequences from Colombia isolates (Col) [10]; and 14 sequences from South Korea (SK), corresponding to the consensus for 42 isolates [11].

The frequencies of variant codons of DBP, compared to the *P. vivax* laboratory reference clone Sal-I among Brazilian isolates are shown in Fig. 1A. To compare the variability of DBP from distinct geographic areas, we also compiled sequences

available from PNG, Colombia and South Korea. Analyses of the DBP-II sequences from Brazilian Amazon isolates indicated variability in almost all residues analyzed. All sequences from Brazilian isolates, as well as Sal-I and isolates from Colombia and South Korea have the residue S447, indicating absence of variability in that position. However, PNG isolates showed a high prevalence of the variant amino acid S447K (Fig. 1A). Variant amino acids among Brazilian isolates, compared to the Sal-I DBP sequence, were found in low frequencies (<50%) for R308S, K386N, N417K, L424I and W437R residues (Fig. 1A). The variant D384G was the most prevalent in our isolates, similar to results found in isolates from other malaria endemic areas (Fig. 1A). The major residues among PNG isolates directly involved in resistance to antibodies inhibition of erythrocyte binding were previously identified as residues 437 and 503, and 417 in minor intensity [13]. Among Brazilian isolates there was a low prevalence (<50%) of variants N417K and W437R, but more than 50% of our isolates are I503K (Fig. 1A). The association of the amino acids frequencies for codons 417, 437 and 503 previously demonstrated among PNG isolates was also investigated for Brazilian isolates (Fig. 1B). The variant N417K occurred in conjunction with W437R in all Brazilian isolates, similarly to the data obtained from analysis of PNG isolates in which those variants always occur concomitantly [13]. However, the variant I503K occur in conjunction with N417K only in a small proportion of Brazilian isolates, the same result was observed for I503K and W437R. The association analysis of the three residues together demonstrated that variant N417K always come together with one of the other two variants (W437R or I503K), as well as the variant W437R. However, the variant I503K occurs separately from the other two in 73% of Brazilian isolates (Fig. 1B). Therefore, it is demonstrated here the strong association of both N417/W437 and K417/R437, but none of them could be associated with any amino acid in codon

(A)	R308S	D384G	K386N	K386Q	K386R	N417K	L424I	W437R	S447K	I503K
Bra	12.5	85	12.5	0	0	27.5	32.5	27.5	0	55
Col	0	59	23	0	0	47	47	18	0	12
PNG	67	66	8	11	0	23	34	26	59	29
SK	0	64	5	0	2	98	100	100	0	100

(B)	With N417K	With W437R	With I503K	With either
N417K	—	100	54.5	100
W437R	100	—	54.5	100
I503K	27	27	—	27
L424I	85	85	—	85

Fig. 1. (A) Frequencies of the most commonly variant amino acids in *P. vivax* DBP-II, comparing to DBP Sal-I sequence (accession number: M61095) among isolates from malaria endemic areas: Brazilian Amazon isolates (Bra: described herein, $N=40$), Colombia isolates (Col: accession numbers: U50575–U50590, $N=17$), Papua New Guinea isolates (PNG: accession numbers: AF469515–AF469602, AF289635–AF289653, AF289480–AF289483, AF291996, L23069–L23075, U10103–U10107, $N=125$), and South Korea isolates (SK: accession numbers: AF215737–AF215738, AF220657–AF220668, $N=42$). The residues were numbered according to Fang et al. (1991) [2], with the first letter representing the amino acid in that position in Sal-I sequence, and the other letter the substituting amino acid. Grey boxes highlight the residues with $\geq 50\%$ of prevalence. (B) Association between the frequencies of major variant residues of Duffy binding protein region II (DBP-II) among *P. vivax* isolates from Brazilian Amazon areas involved in resistance to immune recognition.

Table 1
Variant families among 40 Brazilian *P. vivax* isolates corresponding to the grouping of the most commonly variant amino acids at DBPII

	308 ^a	384	386	417	424	437	447	503	Prevalence ^b (%)	Other areas/isolate ^c
I	R	D	K	N	L	W	S	I	5	Col, PNG, SAL-I
II	R	D	K	N	L	W	S	K	2.5	
III	R	D	K	K	I	R	S	K	7.5	PNG, SK
IV	R	G	K	N	L	W	S	I	22.5	Col
V	R	G	K	N	L	W	S	K	37.5	
VI	R	G	K	K	I	R	S	I	12.5	
VII	S	G	N	N	I	W	S	I	5	PNG
VIII	S	G	N	K	I	R	S	K	7.5	Belem

^a The residues were numbered according to Fang et al. (1991) [2]. The variant residues identical to the Sal-I isolate are underlined.

^b Prevalence of Brazilian isolates belonging to that variant family.

^c Col: isolates from Colombia [10]. PNG: isolates from Papua New Guinea [7–9]. SK: isolates from South Korea [11]. Sal-I: isolate from El Salvador [2]. Belem: isolate from Belem/Brazil [10].

503 although it was demonstrated for PNG isolates [13]. These results suggest the synergistic functional effect of 417 and 437 amino acids, maybe constituting a discontinuous epitope in DBP involved in the escape of the parasite against host immune system. The higher levels of variant amino acid found in codon 503, compared to other malaria endemic areas (PNG and Colombia) and the lack of association frequencies between N417K/W437R and I503K suggests that erythrocyte binding inhibition by antibodies might have some specificities depending on homologous recognition, whereas for Brazilian isolates besides N417 and W437 other amino acids could be more important than I503K, such as I.424I, which showed stronger association with N417K or W437R (Fig. 1B).

We also identified another 14 polymorphic residues at DBP ligand domain in our isolates compared to Sal-I sequence [2], which some of them are identical as previously described in other regions of the world (A191E, K371E, R378R, E385K and R390H). In addition, two polymorphisms previously reported in other regions are different from the polymorphisms identified in our isolates, although at the same positions (G220E and T404R). The others seven polymorphic residues seem to be unique among Brazilian Amazon isolates (N305N, S398T, M419I, I464I, Q486E, V497V and K558E).

By grouping the residues which are present at positions 308, 384, 386, 417, 424, 437, 447 and 503, we constructed eight partial variant families (I–VIII) representing the haplotypes present in Brazilian isolates (Table 1). Most of our isolates (72.5%) are grouped in three families, which are unique for South American isolates (IV, V and VI). This large number of isolates consisting of a diverse population of genetically distinct clones could reflect random recombination which occurs during mixed infections frequently observed in distinct malaria endemic areas [7,9,16]. Only 17.5% of our isolates share the family with PNG isolates and 7.5% with South Korean isolates. Taken together these data agree with geographic distribution of these endemic areas with a higher identity between South American isolates from Colombia and Brazil. Additionally, we could not identify among Brazilian isolates any variant families with those residues identical to PNG 7.18 neither PNG 27.16 isolates, which were previously demonstrated to have different role in antibodies inhibition of erythrocyte binding [13]. Concerning only the major residues

previously identified to be involved in immune recognition of DBP, 35% of Brazilian isolates have the amino acids combination identical to the highest inhibition pattern of erythrocyte binding (N417, W437 and I503) for PNG isolates using anti-Sal-I antibodies [13]. The lowest inhibition pattern (K417, R437 and K503) was found in 15% of our isolates and the remaining isolates showed identity to the intermediate patterns for inhibition of erythrocyte binding using anti-Sal-I antibodies [13].

The residues analyzed here were not directly involved in erythrocyte binding as recently confirmed [12,17]; however they were able to confer resistance to inhibitory antibodies against erythrocyte binding, particularly residues 417, 437 and 503 of PNG isolates [13]. Since these residues within DBP ligand domain were highly polymorphic it is suggested that these polymorphisms could be subject to immune pressure responsible to the parasite escape of host immune system. Previous study has confirmed that this strong positive selection pressure in DBPII ligand domain act promoting greater diversity [6]. The immune pressure drives the generation of new *P. vivax* DBP variants that is still able to bind erythrocyte but become resistant to inhibitory antibodies, suggesting that this DBP region is under positive pressure into critical residues and under negative pressure in the residues involved in receptor recognition [12,13,17]. Concerning the seven residues analyzed here, excluding residue 447 which was not polymorphic in our isolates, five of them produced a family change of the amino acid, when compared to the Sal-I isolate. All of these substitutions also resulted on the change of charge or accessibility to solvent. Thus, these putative changes in protein structure may alter antibody binding of a particular B epitope, thereby escaping the protective immune response of host [9]. Therefore, concerning the antibodies recognition it is very important to confirm the involvement of those residues and also of other unique polymorphisms identified among Brazilian samples in the mechanism of immune evasion.

Acknowledgments

We thank Luciano Moreira for critical reading of the manuscript. This work has been supported by UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/TDR, CNPq, and FAPEMIG.

References

- [1] Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, Fy^b. *N Engl J Med* 1976;295:302–4.
- [2] Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol* 1991;44:125–32.
- [3] Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7085–9.
- [4] Ranjan A, Chitnis CE. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14067–72.
- [5] Singh SK, Singh AP, Pandey S, Yazdani SS, Chitnis CE, Sharma A. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):193–8.
- [6] Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 2003;127:121–32.
- [7] Tsuboi T, Kappe SH, al-Yaman F, Prickett MD, Alpers M, Adams JH. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Infect Immun* 1994;62:5581–6.
- [8] Xamli J, Adams JH, King CL. The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111:253–60.
- [9] Cole-Tobian JL, Cortes A, Baisor M, et al. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the duffy binding protein. *J Infect Dis* 2002;186:531–9.
- [10] Ampudia E, Patarroyo MA, Patarroyo ME, Murillo LA. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1996;78:269–72.
- [11] Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim DW, Chung WC. Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. *Kor J Parasitol* 2001;39:143–50.
- [12] VanBuskirk KM, Sevova E, Adams JH. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15754–9.
- [13] VanBuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M, et al. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J Infect Dis* 2004;190:1556–62.
- [14] Funasa-Fundação Nacional de Saúde. Gerência Técnica de Malária, Ministry of Health, Brazil, 2002.
- [15] Camargo LMA, Dal Colletto GMD, Ferreira MU, et al. Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:32–8.
- [16] Walliker D. Malaria parasites: randomly interbreeding or 'clonal' populations? *Parasitol Today* 1991;7(9):232–5.
- [17] Hans D, Pottnik P, Bhattacharyya A, et al. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Mol Microbiol* 2005;55:1423–34.

Research Article

Recombination and Positive Selection on Epitopes Have Shaped the Haplotype Structure of the Ligand Domain of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein

Tais Nóbrega de Sousa¹, Eduardo Tarazona-Santos², Daniel J. Wilson³, Ana Paula Madureira¹, Paula R. K. Falcão⁴, Cór Jesús F. Fontes⁵, José Maria de Souza⁶, Álvaro A. R. D'A. Couto⁷, Luis H. S. Gil⁸, Marcelo U. Ferreira⁹, Luzia H. Carvalho and Cristiana F. A. Brito*

¹ Laboratory of Malaria, Centro de Pesquisa Rene Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil,

² Department of General Biology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil,

³ Department of Human Genetics, University of Chicago, Chicago, USA,

⁴ Laboratory of Bioinformatics, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Campinas, Brazil,

⁵ Department of Clinical Medicine, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Brazil,

⁶ Evandro Chagas Institute, Belém, Brazil,

⁷ Faculdade SEAMA, Macapá, Brazil,

⁸ Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais - IPEPATRO, Porto Velho, Brazil,

⁹ Department of Parasitology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Cristiana Ferreira Alves de Brito, Laboratory of Malaria, Rene Rachou

Research Institute, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo

Horizonte, Brazil, 30190-002. Phone: +55 31 33497772. Fax: +55 31 32953115.

E-mail: cristiana@cpqrr.fiocruz.br.

Key words: Plasmodium vivax; Duffy binding protein; genetic diversity; Recombination; diversifying selection; 3-D structure.

Running head: Positive selection in PvDBP_{II}

Abbreviations: DBP, Duffy binding protein; PvDBP, DBP of Plasmodium vivax; PvDBP_{II}, region II of PvDBP; DARC, Duffy antigen/receptor for chemokines; MCMC, Markov chain Monte carlo; API, annual parasitic index; LD, linkage disequilibrium; HPD, high posterior density.

Abstract

Plasmodium vivax Duffy Binding Protein (PvDBP), a major malaria-vaccine candidate, plays a key role in red blood cell invasion. The erythrocyte-binding domain of PvDBP, named region II (PvDBP_{II}) displays extensive sequence diversity, however remains controversial whether this diversity resulting from positive selection imposed by host immune responses. Part of the difficulty to detect positive selection on PvDBP_{II} might result from the use of analytic tools for dN/dS estimation based on phylogenetic reconstruction, that are considerably less robust in the presence of intragenic recombination, and which estimate natural selection in the whole sequence and not on individual codons. Recently was described a computational approach, called omegaMap based on a population genetics approximation to the coalescent with recombination to perform Bayesian inference on both the dN/dS ratio and the recombination rate, allowing each to vary along the sequence. Here, this approach was used to detect variation in both selection and recombination parameters across the PvDBP_{II} sequence. By using P. vivax isolates from different populations of the Brazilian Amazon, we found frequent recombination across PvDBP_{II}, leading to extensive haplotype diversity that is maintained in populations by positive natural selection. Of importance some of the polymorphic residues under selective pressure are juxtaposed, in a 3-D model of PvDBP_{II}, with erythrocyte-binding residues. Taken together, our results suggest that the host immune response is an important selection factor for mutations related to escape of the parasite. Polymorphisms of PvDBP_{II} should be taken into account when designing vaccines aimed at eliciting antibodies that are able to inhibit erythrocyte invasion.

Introduction

Plasmodium vivax malaria is a major public health challenge in Latin America, Asia and Oceania. Globally, 2.6 billion people are currently at risk of infection (Mendis et al. 2001; Guerra, Snow, Hay 2006) and 130-435 million clinical cases are estimated worldwide (Hay et al. 2004). In the Amazon Basin of Brazil, during the mid 1980s, *P. vivax* surpassed *P. falciparum* as the most frequent cause of clinical malaria, and currently *P. vivax* causes more than 400,000 malaria cases per year in Brazil (Loiola, da Silva, Tauil 2002).

Host blood cell invasion by different species of malaria parasites depends on numerous receptor-ligand interactions. Most parasite proteins known to be involved in such interactions are highly polymorphic and are potential targets of naturally acquired immunity. However, relatively little is known about the patterns of allelic polymorphism in surface proteins of the *P. vivax*. *P. vivax* merozoite invasion of erythrocyte relies on the interaction between the parasite ligand and the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC), which is present on the erythrocyte surface (Horuk et al. 1993). The parasite ligand is a micronemal type I membrane protein, called Duffy binding protein (DBP), or PvDBP in *P. vivax*. As demonstrated by a DBP gene-deletion experiment in *P. knowlesi* - the closely related malaria parasite that infect primates, including humans (Singh et al. 2005; Galinski, Barnwell 2009); DBP plays an important role in formation of the irreversible junction with erythrocytes, a key step of host cell invasion. A series of competitive binding and directed-mutagenesis strategies have demonstrated the importance of DBP/DARC interaction (Horuk et al. 1993; Chitnis et al. 1996; VanBuskirk et al. 2004a; Singh et al. 2005) and in fact, individuals lacking Duffy receptors on the erythrocyte surface are highly resistant to *P. vivax* invasion (Miller et al. 1976; Welch, McGregor, Williams 1977). Since antibodies against PvDBP inhibit in vitro binding of DBP-DARC and also block invasion of human erythrocytes (Michon, Fraser, Adams 2000; Grimberg et al. 2007; Ceravolo et al. 2008), this protein is a major candidate for vaccines against *P. vivax*.

The erythrocyte-binding motif of PvDBP was mapped to 170-amino acids stretch in the cysteine-rich region II of the protein (PvDBP_{II}), and is the most variable segment with 93% of the PvDBP polymorphic residues lying in this region of the protein (Ranjan, Chitnis 1999; VanBuskirk, Sevova, Adams 2004; Hans et al. 2005). Although most cysteines and some of the aromatic residues in PvDBP_{II} are involved in the erythrocyte binding and are evolutionarily conserved (Adams et al. 1990; Singh et al. 2003; VanBuskirk, Sevova, Adams 2004; Hans et al. 2005), several non-synonymous polymorphic residues within PvDBP_{II} have been identified from field isolates from Papua New Guinea (Tsuboi et al. 1994; Xainli, Adams, King 2000), Colombia (Ampudia et al. 1996), South Korea (Kho et al. 2001), Brazil (Sousa et al. 2006) and Thailand (Gosi et al. 2008). This observation is consistent with the positive natural selection acting on PvDBP_{II} and with the role of allelic variation as a mechanism of immune evasion. To formally test this hypothesis in a population genetics framework, several tests of neutrality has been applied to PvDBP_{II} data (Tajima's D; Fu and Li's D and F; McDonald-Kreitman), as well as comparisons of the rates of synonymous (d_S) and non-synonymous (d_N) substitutions based on the counting method of Nei-Gojobori (1986). However, these analyses have produced inconclusive results (Cole-Tobian, King 2003; Martinez et al. 2004), in part due to limitations of their assumptions. For instance, the Nei-Gojobori (1986) method to estimate d_N and d_S ignores the transition/transversion bias or the unequal base/codon frequencies, which may lead to biased results (Yang 2007). On the other hand, powerful phylogeny-dependent methods based on maximum likelihood estimates of d_N and d_S (Yang 2007) assume no recombination and have been developed to be applied to sequences from independent, divergent species, being not specific for intraspecific analysis (Kryazhimskiy, Plotkin 2008).

In this study, we overcome these problems by using a recently described probabilistic model called omegaMap (Wilson and McVean 2006). It uses a population genetics approximation to the coalescent with recombination (a natural model choice for population

data), and use reversible-jump Markov chain Monte Carlo (MCMC) to perform Bayesian inference on both the d_N/d_S ratio and the recombination rate, allowing each to vary along a DNA sequence. Being based on the Nielsen and Yang (1998) model of codon evolution, omegaMap incorporates information about transition/transversion ratio and codon frequencies from the data in a probabilistic framework. Specifically, we applied omegaMap approach to PvDBP_{II} to test the hypothesis that some residues in this genomic region evolved under positive natural selection. We found evidence for diversifying selection on a region of PvDBP_{II} containing B- and T-cell epitopes. Moreover, we integrated our analyses with computational modeling of the PvDBP_{II} 3-D structure, and evidenced that several important polymorphic residues, three of which were clearly under positive selection, map to the erythrocyte-binding cluster of PvDBP_{II}. These findings shed new light on our knowledge about the evolutionary history of PvDBP_{II}.

Materials and Methods

Parasite Isolates and Study Sites

We obtained 122 field isolates of *Plasmodium vivax* from six sites across the Brazilian Amazon: Cuiabá (Mato Grosso State [MT], $n = 25$), Acrelândia (Acre State [AC], $n = 25$), Manaus (Amazonas State [AM], $n = 20$), Augusto Correa (Pará State [PA], $n = 18$), Porto Velho (Rondônia State [RO], $n = 20$), and Macapá (Amapá State [AP], $n = 14$) (fig. 1 and table 1). Epidemiological data indicate that malaria transmission in these areas is generally hypo- to meso-endemic (Camargo et al. 1994; Duarte et al. 2004; Silva-Nunes et al. 2006). The samples were collected from the different regions as follows: AC, between March and April 2004; AM, May 2003; AP, November 2004; PA, October 2005; RO, from October to December 2004; and MT, from July 2003 to July 2004. At the time of blood sample collection, the annual parasite index (API: the number of positive blood smears per thousand inhabitants) of the contagion localities allowed classification of these areas as high risk (API

>50), medium risk (API 10 to 50) or low risk for malaria transmission (API <10) (Health 2005). In all but two regions, the individuals were locally infected. In Cuiabá/MT and Porto Velho/RO, individuals were infected elsewhere and the risk for malaria transmission reported here was calculated based on the average of API from contagion localities (table 1).

PvDBP_{II} Amplification and Sequencing

Genomic DNA was immediately extracted from whole blood samples using the PUREGENE DNA isolation kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN). The sequence encoding the PvDBP_{II}, corresponding to nucleotides 870 to 1545 (aa 290-515, reference sequence: Sal-I) (Fang et al. 1991), was amplified by PCR using high fidelity platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and primers forward: 5' ATGTATGAAGGAAGCTTACGAAT 3' and reverse: 5' ACCTGCCGTCTGAACCTTTT 3'. PCR products were purified using GFX-96 PCR kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and their sense and anti-sense strands were both sequenced, using the PCR primers and the DYEnamic™ ET dye terminator kit (Amersham Biosciences). The products were analyzed on a MegaBace automated DNA sequencer (Amersham Biosciences). Since we did not observe heterozygous sites in sequences, we infer that these came from patients with single infection or from the predominant variant of patient with multiple infection. All single segregating sites were confirmed with sequencing from independent PCR amplifications. We achieved six-fold sequence coverage for each of the analyzed isolate. The PvDBP_{II} gene polymorphisms identified among Brazilian Amazon isolates were compared to all DBP gene sequences of *P. vivax* in GenBank (last update on 25th September 2008). We used a neighbor-joining (NJ) method based on pairwise differences using P-distance to show relationships between haplotypes and their distribution across populations, using the following orthologous proteins as outgroups: Erythrocyte Binding Protein of *P. cynomolgi* (PcEBP, accession number Y11396) and Erythrocyte Binding Protein alpha, beta and gamma

of *P. knowlesi* (PkEBP α , β and γ , accession numbers M90466, M90694, M90695, respectively). Since the observed haplotype structure is compatible with recurrent mutation or recombination events, the NJ algorithm is insufficient for robust phylogenetic inference (Bandelt, Forster, Röhl 1999). With these limitations in mind, the NJ algorithm was used to visualize similarities between the observed haplotype groups.

PvDBP_{I1} sequences identified here were deposited in GenBank with accession numbers EU812839 to EU812960. Sequence alignments and comparisons were performed using the Clustal W multiple alignment algorithm in BioEdit Sequence Alignment editor using manual editing (Hall 1999; TA 1999).

Diversity analysis of PvDBP_{I1}

To estimate within-population diversity, we counted the number of segregating sites and observed haplotypes. We estimated the nucleotide diversity (π), haplotype diversity (H_d), and the corresponding standard deviations (SDs) using DnaSP 4.10 software (Rozas et al. 2003). We measured between-population differentiation using the pairwise fixation index F_{ST} with Arlequin 3.01 software (<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>) (Excoffier, Laval, Schneider 2005). The F_{ST} index (between-population component of the genetic variance, Wright 1951) was calculated assuming the Kimura 2-parameter mutation model (Wright 1951; Kimura 1980). We estimated the correlation between pairwise population genetic distances (F_{ST}) and geographical distances by the nonparametric Spearman's rank correlation.

Analysis of recombination and linkage disequilibrium

We estimated the recombination parameter ρ among contiguous sites across PvDBP_{I1} by the methods described in Li and Stephens (Li, Stephens 2003) using PHASE 2.1 software. The parameter ρ , that may be estimated by different statistical methods, depends both on the recombination rate and the effective population size, and therefore, is proportional to the

number of recombination events per generation to be expected in a population. The algorithm was run twice with 500,000 iterations, with a 20,000 iteration burn-in and a 1,000 thinning interval. We analyzed pair-wise linkage disequilibrium (LD) across PvDBP_{II} using the r^2 statistic (Hill, Robertson 1968) and its significance was assessed calculating LOD (logarithm (base 10) of odds) scores (Gabriel et al. 2002). LD was calculated only for SNPs with a minor allele frequency (MAF) higher than 0.1 in the total Brazilian sample. These calculations were performed and visualized using the program Haploview (Barrett et al. 2005).

Tests of neutrality

We used the method developed by Wilson and McVean (Wilson, McVean 2006) implemented in the omegaMap software to estimate the parameter $\omega = d_N/d_S$, where d_N is the rate of non-synonymous substitutions and d_S is the rate of synonymous substitutions. Estimates of the parameter ω are usually used as indicators of the action of natural selection on coding sequences. Under no selection ω is expected to be equal to 1, under negative selection the value is expected to be less than 1, and under positive selection the value is expected to be greater than 1. The estimation of ω was performed using a set of homologous sequences with omegaMap (Wilson, McVean 2006). This method employs a Bayesian approach to parameter estimation independent of phylogeny, and is therefore less prone to falsely detecting diversifying selection. The model uses a population genetic approximation to the coalescent with recombination, and uses reversible-jump Markov chain Monte Carlo (MCMC) to perform Bayesian inference of both ω and the recombination parameter ρ , allowing both parameters to vary along the sequence. In this study, analyses were conducted using 10 randomly chosen orderings of the haplotypes and the following priors: μ (synonymous transversion)= Improper inverse, κ (transition/transversion rate)= Improper inverse, ϕ (insertion/deletion rate)= Improper inverse. Since ω requires a proper prior, a log-normal distribution, centered around $\log(\omega) = 0$, was used with a wide standard deviation of 2.

An average block length of 20 codons was chosen to be around 10% of the sequence length. For ρ , there is no natural "reference" prior, so we used an informative prior based on Gunasekera et al. (Gunasekera et al. 2007): a log-normal distribution with parameters $\log(0.1)$ and 1. As we expect there to be less information regarding ρ than ω , we assumed for ρ an average block length of 40 codons to impose greater smoothing. The distance between recombination events is modelled probabilistically, not by fixing segments. The recombination parameter ρ is not assumed a priori but inferred directly from the data. Sixteen independent MCMC chains were run for 90,000 iterations, with a 10,000 iteration burn-in. The chains were compared for convergence and merged to obtain the posterior distributions. The results show the geometric mean for the posterior distribution of ω and ρ , and the 95% HPD (highest posterior density) interval. To determine the influence of our choice of priors on the posteriors, we repeated the analyses with alternative set of priors (μ = Exponential mean 0.02; κ = Exponential mean 2.0; ϕ = Exponential mean 0.1; ω = Exponential mean 1.0; ρ = Exponential Mean 0.14). Means for priors for μ , κ and ρ were chosen using the posterior distributions generated with the first prior set. A mean value of 1 was used for the ω prior based on a null hypothesis of selective neutrality. To integrate the evolutionary analysis with structural information, the posterior probability of selection at each codon was mapped onto our PvDBPII 3-dimensional structure (see below) to visualize the spatial distribution of selected sites.

Prediction of promiscuous T-cell epitopes

Since only few epitopes have been described for PvDBP (Xainli et al. 2002; Cole-Tobian, King 2003), we used an in silico analysis to infer new promiscuous PvDBP_I T-cell epitopes able to bind to several alleles of the host MHC molecules. To identify the MHC Class-I binding regions in PvDBP_I, we used ProPred-I (Singh, Raghava 2003). This program uses peptide-binding specific matrices for 47 MHC Class-I alleles. Using quantitative

matrices derived from published literature (Sturniolo et al. 1999), we used ProPred to predict MHC Class-II binding regions in PvDBP_{II} (Singh, Raghava 2001).

3-D structural model of PvDBP_{II}.

We performed homology modeling with the Modeller 8v2 software, using the X-ray structure of the *P. knowlesi* DBL domain as a template (Pk α -DBL) (PDB file: 2C6J, chain A) (Singh et al. 2006). This template shares 71% sequence identity with PvDBP_{II}. We modeled the 3-D structure of PvDBP_{II} between amino acids 261 and 553. The quality of these models was evaluated with PROCHECK v.3.5.4 software (Laskowski et al. 1993). Superpositioning and renderings were carried out with PyMol v1.0 software (Wijeyesakere, Richardson, Stuckey 2007).

Results

Polymorphisms in PvDBP_{II} among Brazilian Amazon Isolates

By sequencing 675 bp of PvDBP_{II} from 122 isolates from six different Brazilian Amazon regions (table 1), we identified 20 polymorphic sites in 19 out of 225 codons (fig. 2A and table S1, Supplementary Material online), with an overall nucleotide diversity of 0.0081 (table 2). We found a positive correlation between malaria transmission rates in each area (measured by annual parasitic index [API]) and both the nucleotide and haplotype diversity levels (Spearman correlation coefficients: $r_s = 0.811$, $P = 0.049$; $r_s = 0.828$, $P = 0.041$, respectively). Twenty percent of substitutions were synonymous. Most non-synonymous nucleotide replacements ($n = 14$) were non-conservative, with changes of the physical-chemical family of the respective amino acid. By comparing polymorphisms identified in our isolates to the 290 PvDBP_{II} sequences available in GenBank, we determined that only one was exclusive to our Brazilian sample: N305N (synonymous substitution of Asn on position 305), present in 10 isolates (fig. 2A and table S1, Supplementary Material online). The

substitutions observed in Brazil were arranged in 34 haplotypes (fig. 2B), corresponding to a mean haplotype diversity of 0.934 (table 2). The modal haplotype Hap19 was observed in all six sampled regions. PvDBP_{II} diversity between populations was quantified by F_{ST} values, ranging from 2.33 % to 30.29 %, with the highest values corresponding to the Amapa population (table 2). Moreover, the F_{ST} statistics were not correlated with geographic distances between Brazilian populations (Spearman correlation coefficient $r_s = 0.0750$, $P = 0.7905$).

Intragenic Recombination and Linkage Disequilibrium in PvDBP_{II}

We would expect that in the absence of recombination and recurrent mutations, the 20 described polymorphic sites observed would be arranged into a maximum of 21 haplotypes. Because we detected 34 haplotypes, we infer that recombination (and possibly recurrent mutations) has shaped the pattern of PvDBP_{II} variation seen in Brazilian populations. Using the software PHASE 2.1, the recombination parameter ρ was estimated to be 0.047 for the 675-bp stretch of PvDBP_{II}. Although this sequence is too short for robust inference of recombination hotspots, the PHASE algorithm suggested that the recombination rate might not be uniformly distributed across the region (fig. 3).

Consistently with the observed haplotype structure and ρ estimates, linkage disequilibrium (LD) across the PvDBP_{II} sequence is low in the Brazilian isolates (fig. S1A, Supplementary Material online). In fact, the analysis of the 12 SNPs with a MAF higher than 0.1 in the whole sample, showed that only 8 out of 66 pair wise combinations showed $r^2 > 0.50$ (fig. S1A, Supplementary Material online). The highest r^2 values were observed for several spatially close polymorphisms, some of them look like a block of LD encompassing the SNPs limited by N417K and I464I (fig. S1A, LOD scores always > 6.64). In particular, three residues within this set were spatially close in the 3-D model (417, 419 and 424; fig. 5A). Since the LD analysis could be affected by the population structure, we re-analyzed the

data without Amapa population, which is the most differentiated population as showed by highest F_{ST} values and a similar LD pattern was observed (fig. S1B, Supplementary Material online).

Evidences of Natural Selection on PvDBP_{II} and epitopes

To gain insight into the action of natural selection, we used the omegaMap approach (Wilson, McVean 2006), which is suitable for genomic regions such as the PvDBP_{II} gene, where recombination prevents reliable reconstruction of a phylogeny. Figure 4A shows the variation of the recombination parameter (ρ) through the PvDBP_{II} sequence, indicating that at least one region was clearly affected by recombination. Our analysis, that estimates ω and their HPD intervals, also revealed that natural selection does not act uniformly within the gene (fig. 4B). The sequence contains regions where purifying selection seems to predominate, regions with ω values close to 1 that appear to be neutral or less affected by selection and a central region which appears to be under positive natural selection. To determine the influence of our choice of priors on the posteriors, we repeated the analyses with alternative set of priors. Estimates for ρ and ω were qualitatively similar for the two set of priors used (fig. S2, Supplementary Material online).

Pathogen epitopes are responsible for host immune recognition, and it is of great interest to test the association between positive natural selection and the presence of T- and B-cell epitopes in PvDBP_{II}. We found that ω was higher for sites belonging to B- and T-cell epitopes (experimentally identified and predicted) than for non-epitope sites (Mann Whitney $U=2587.00$, $P < 0.0001$). We therefore conclude that relaxed purifying selection/positive natural selection preferentially acts on epitopes in PvDBP_{II}. In addition, all the epitopes in the region showing the strongest evidence of positive natural selection are surface exposed (fig. S3, Supplementary Material online) and also showed higher nucleotide diversity (0.0111 - 0.0464) than the value for whole PvDBP_{II} (0.0081) (see the legend of fig. 4B). In particular,

nucleotide diversity was the highest in the *in silico* predicted epitope Ia, which contained the three spatially close polymorphic residues (417, 419 and 424), and showed a clear signature of positive natural selection.

Spatial distribution of polymorphisms across PvDBP_{I1}

We used the crystallographic structure of PkEBL α to produce a computational model of PvDBP_{I1}. In Figure 5A, this model is represented as a space-filling model of PvDBP_{I1}, showing the essential, invariant and surface-exposed contact residues required for DARC recognition on human erythrocytes, as previously identified (Singh et al. 2006), and the polymorphic residues in our Brazilian Amazon samples. Although polymorphic residues were widely distributed throughout the sequence, the polymorphic residues at positions 417, 419, and 424, which are part of a block of high LD, are close to the erythrocyte-binding cluster of PvDBP_{I1}. Both K417 and I424 residues were prevalent in Brazil as well as in other studied areas (table S1), but only few data on LD are available for other populations.

We also show on the three-dimensional model of PvDBP_{I1} the residues according to the posterior probability of their estimated ω (fig. 5B). Interestingly, residues that seems to be less affected by selective pressures, shown in white, were distributed throughout the whole protein and residues associated with high ω (likely to have evolved under positive selection) in red, were juxtaposed to the proposed DARC-recognition site.

Discussion

Our analysis of nucleotide diversity in PvDBP_{I1} among 122 *P. vivax* isolates from Brazil provides strong evidence that (i) recombination plays an important role in determining the haplotype structure of PvDBP_{I1}, contributing to haplotype diversity, and (ii) natural selection acts differentially across the PvDBP_{I1} sequence. Despite of the small size of the analyzed region of the protein, this segment is highly polymorphic and functionally important,

and our goal was testing the action of natural selection in this region. Moreover, because of the presence of recombination the selection signal might not propagate across the sequence. Indeed, the gene appears to contain neutrally evolving codons as well as codons under selective pressures associated with low ω values (purifying selection) and high ω values (diversifying selection). The most striking conclusion is that diversifying natural selection acting on one PvDBP_{II} region containing previously identified and in silico predicted T- and B-cell epitopes. In particular, amino acid residues 417, 419, and 424, associated to high ω values map close to the erythrocyte binding cluster of the molecule.

Previous attempts to infer the action of natural selection in PvDBP_{II} with different neutrality tests, yielded inconclusive results. Cole-Tobian and King (2003) and Martinez et al (2004) showed evidence of positive selection pressure using estimation of the rates of substitution (synonymous and non-synonymous) using the Nei and Gojobori's method (Nei and Gojobori 1986). Both have also used Tajima's (Tajima 1989) and Fu-Li (Fu, Li 1993) neutrality tests, however these analysis showed mainly negative selection pressure acting on PvDBP_{II}. The contrasting detection of both negative and positive selection pressures in PvDBP_{II} may involve a balance between a functional restriction for maintaining structural constraint due to DBP's key role in the erythrocyte invasion and the antigen diversity as a response against host immune system. The comparisons between dN and dS estimated using the Nei-Gojobori (Nei, Gojobori 1986) method, as performed by Cole-Tobian and King (Cole-Tobian, King 2003) and Martinez et al. (Martinez et al. 2004), as well as the Wilson-McVean estimation applied in this study, compares the patterns of synonymous and non-synonymous substitutions. Thus, this type of test was less sensitive to the potential confounding effects of the demographic history of populations than neutrality tests based on the expected distribution of polymorphisms among classes of frequencies (i.e. allelic spectrum), such as Tajima's and Fu and Li's tests. Moreover, the recent Wilson-McVean method has four features that improve its performance in correctly identifying the effect of

diversifying selection. First, it assumes a more realistic mutational model (Nielsen, Yang 1998) that allows for different rates of transitions and transversions and for differences in codon frequencies. Second, its probabilistic approach allows estimating ω parameters as well as their HPD intervals, providing a measurement of uncertainty. Third and more important, the Wilson-McVean method uses a reversible-jump MCMC to explore the posterior distribution for ω allowing ω to vary along the length of the sequence. Although incorporating these more realistic assumptions implies a computational cost, our analyses show this is worthwhile. Indeed, the gene appears to contain neutrally evolving codons as well as codons under selective pressures associated with low ω values (purifying selection) and high ω values (diversifying selection), and the Wilson-McVean method has allowed us to map how diversifying selection has acted across PvDBP_{II} and to test the association between the presence of epitopes and the action of natural selection. Last but not least, recombination, that has been important in shaping PvDBP_{II} diversity, does not affect the performance of Wilson-McVean estimation. These features, the fact that we specifically examined a highly polymorphic and functionally important region of PvDBP (for which results of functional studies are available) and our complementary structural and epitopes analyses, partially overcome one of the limitations of our study: the small size of the studied region. Of course, a thorough examination of the entire PvDBP in different populations will provide a better understanding of how natural selection has modeled the different regions of the gene around the world, including Brazilian regions. However, on the basis of our results we anticipate that, if the observed level of recombination affects the entire gene, signatures of natural selection might not propagate across large genomic regions, but may be localized. Therefore, population genetics methods that are able to examine signatures of selection at localized regions may be more appropriate for the evolutionary analyses of PvDBP.

Our haplotypes have a strong population structure as demonstrated by high F_{ST} values (from 2.33 to 21.02), which could affect both recombination and linkage disequilibrium.

Despite of this population structure, our results regarding natural selection (ω inferences) and linkage disequilibrium may not be an artifact of population structure, although these analyses were performed on the entire samples. When we exclude the most differentiated population from the analyses (Amapa population), we still observe the same LD pattern, which indicate that this result is not an artifact of population structure. An important result of our study is that amino acid residues 417, 419, and 424, associated with high ω values and mapped near the DARC binding domain in the structural model, are in LD. These residues are also observed in LD in Papua New Guinea sample. Concerning the estimation of ω parameter, whether high ω values were an artifact of population structure, we expect F_{ST} to be higher for non-synonymous changes and a correlation among ω values and F_{ST} for non-synonymous polymorphisms. None of these expectations were observed. F_{ST} is actually higher for synonymous changes (data not shown). Therefore, there is no evidence that our results are artifacts of population structure.

Diversifying selection has been observed in different proteins involved in parasite-host interaction, and is generally attributed to the selective pressure of host immune response (Escalante et al. 2004). Contrasting with the pervasive role of purifying selection in protein evolution, we found that this generality is somewhat relaxed in certain epitopes. We inferred that the evolution, particularly in codons of epitopes 45, 48, 66, IIb, IIa and Ia is driven by diversifying selection, because of its higher ω values. These epitopes are surface exposed (Figure S2) and are less conserved interspecifically than intraspecifically (data not shown). Moreover, we have shown that codons mapping to epitopes have significantly higher ω values. In terms of population genetics, we consider at least three non-mutually exclusive possibilities. First, a high number of non-synonymous substitutions observed with respect to other proteins is not enough to claim evidence of diversifying selection, but may be associated with relaxed purifying selection or near-neutral evolution observed for specific codons. In this case, it is not necessary to invoke natural selection to explain the observed pattern. Second, it

is possible that inferential methods do not have sufficient statistical power to reject neutrality or detect the action of diversifying selection, particularly when the analysis is restricted to a few codons. In our study, this may be the case for epitopes 5, 16, 18, 20, 1b and 1c. Third, classical methods of estimating the ω parameter (Yang 1997; Yang et al. 2000) may produce false positive inferences of diversifying selection as often as 90% of the time, due to the false assumption of no recombination (Shriner et al. 2003). This high rate of false positive results may contribute to a bias that overemphasizes the action of host immune response as a source of diversifying selection. In this context, the use of appropriate methods for inference of natural selection is important and new methods such as that of Wilson-McVean, based on more realistic assumptions about molecular evolution, will contribute to appropriately assessing the role of diversifying selection on parasite diversity.

P. vivax immune evasion could be explained by a model based on the “just-in-time” release mechanism of PvDBP [46, 52]. This model proposes that DBP is released from micronemes immediately before binding to DARC, thereby avoiding immune inhibition by direct binding of antibodies to PvDBP. However, residues on the protein surface opposite to the erythrocyte binding domain remain exposed, and are immune system targets. Supporting this model was the observation that polymorphic residues occur on the opposite side of the erythrocyte binding domain [46]. Therefore, from the perspective of population genetics, it may be expected that positive natural selection posited by the host immune response would preferentially act on the protein surface opposite to the erythrocyte binding domain, and values of $\omega > 1$ would be concentrated in this side of the protein. Since our results do not match this expectation (Figure 5), our analysis of Brazilian isolates does not support the “just in time” release model. Notably, our results showed that stretches with high genetic diversity and residues under positive selection were present near the erythrocyte binding domain. These results would be expected under a model of immune escape, in which polymorphic residues near the binding site elude binding of inhibitory antibodies, implying that positive selection

acts preferentially on residues near the erythrocyte binding site. In fact, the polymorphic residues on positions 417, 419 and 424, which form a unit of LD and are associated to high ω values, are mapped near the erythrocyte binding domain. Residue on position 417 was also reported as part of a linked haplotype in PNG (N417K, W437R, I503K) (VanBuskirk et al. 2004b). This mechanism has been proposed for PvDBP [19, 24, 53, 54], and also for PfAMA1 [55]. Recent functional results from Grimberg and colleagues [12] strongly support this mechanism, and show that the antibodies involved in invasion-inhibitory activity also block PvDBP-DARC interaction.

A limitation of our study is that the tests of neutrality, while identifying areas of positive selection, cannot predict the effects that nucleotide polymorphisms will have to either parasite invasion or immune escape. Recent data from experimental and natural infections support our findings that PvDBP polymorphisms might have immunological relevance. By using rabbit immune-sera, VANBUSKIRK et al. (2004a) demonstrated that polymorphisms change DBP antigenic character and can compromise immune inhibition. Also, we have found evidence that in the Amazon area, a long-term exposure to malaria is required to allow production of anti-DBP antibodies able to inhibit the binding of different PvDBP_{II} variants to DARC (Ceravolo et al. 2008). These results support the hypothesis that immune responses against PvDBP are haplotype-dependent, as has been also proposed for the apical membrane antigen 1 of *P. falciparum* (PfAMA1), another micronemal protein vaccine candidate (Cortés et al. 2005). Taken together, these results suggest that vaccine strategies based on inhibitory anti-DBP antibodies can overcome the problem of antigen variability.

Conclusion

The pattern of low LD and the high level of recombination within the PvDBP_{II} gene suggest that meiotic recombination is a major factor influencing haplotype diversity in the Brazilian Amazon region.

These results stress the importance of using appropriate tests (such as the omegaMap approach (Wilson and McVean 2006) to infer the relative roles of forces such as natural selection and recombination in determining the pattern of diversity of parasite genes. These genes are often involved in the interaction with host immune systems, are strong candidates to be involved in co-evolutionary processes. We conclude that inferential methods in population genetics should complement functional studies of parasite invasion, and to allow a more rigorous approach to address the parasite-host interaction from different biological perspectives.

Supplementary Material

Supplementary table S1 and fig. S1, fig. S2 and fig. S3 are available at Molecular Biology and Evolution online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

Table S1 - PvDBP_{II} polymorphisms among Brazilian isolates

FIG. S1 - Patterns of linkage disequilibrium in the PvDBP_{II} encoding gene from Brazilian isolates. (A) Linkage disequilibrium was calculated for the entire dataset for which the frequency of the minor allele was at least 0.1. Pairwise LD was visualized using r^2 values and presented using the Haploview program. White: $r^2 = 0$; black: $r^2 = 1$; shades of grey: $0 < r^2 < 1$. The bracket indicates the cluster of amino acids with the highest r^2 . (B) LD was calculated as described previously however now without Amapa population, because of their highest F_{ST} values.

FIG. S2 - Spatial variation in recombination and selection parameters across the PvDBP_{II} using OmegaMap software. Analysis was performed using an alternative set of priors: μ = Exponential mean 0.02; κ = Exponential mean 2.0; ϕ = Exponential mean 0.1; ω = Exponential mean 1.0; ρ = Exponential Mean 0.14. Means for priors for μ , κ and ρ were chosen using the posterior distributions generated with the first prior set. (A) Recombination parameter estimates (ρ) were carried out using omegaMap software. The sitewise mean (solid line) and 95% HPD (highest posterior density) interval (dotted lines) are shown. (B) Omega parameter estimates (ω) were carried out using the omegaMap software package. The sitewise mean (solid line) and 95% HPD intervals (dotted lines) are shown.

FIG. S3 - Space-filling model of PvDBP₁₁ 3-D structure showing the epitopes. Previously identified epitopes 45, 48, 66 (Xainli et al. 2002; Cole-Tobian, King 2003) and in silico predicted T-cell epitopes IIb, IIa and Ia, that evolution were evolutionarily driven by diversifying selection (shown in purple). DARC binding residues are shown in yellow. Each image indicates the model rotation in the vertical plane indicated by arrows.

Acknowledgements

We thank the Brazilian patients for their substantial cooperation. We also thank PDTIS platform (Fiocruz) for DNA sequencing facilities, particularly, the technician Elisângela Monteiro Coser, and Daniel Coscarelli for providing a Brazilian geographical map. A portion of this work was carried out using the resources of the Computational Biology Service Unit from Cornell University, which is partially funded by the Microsoft Corporation.

Literature Cited

- Adams, J, D Hudson, M Torii, G Ward, T Wellem, M Aikawa, L Miller. 1990. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 63:141-153.
- Ampudia, E, M Patarroyo, M Patarroyo, L Murillo. 1996. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol Biochem Parasitol* 78:269-272.
- Bandelt, H, P Forster, A Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Barrett, JC, B Fry, J Maller, MJ Daly. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
- Camargo, L, M Ferreira, H Krieger, E De Camargo, L Da Silva. 1994. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. *Am J Trop Med Hyg* 51:16-25.
- Ceravolo, I, F Souza-Silva, C Fontes, E Braga, A Madureira, A Krettli, J Souza, C Brito, J Adams, L Carvalho. 2008. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol* 67:270-278.

- Chitnis, C, A Chaudhuri, R Horuk, A Pogo, L Miller. 1996. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med* 184:1531-1536.
- Cole-Tobian, J, C King. 2003. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 127:121-132.
- Cortés, A, M Mellombo, R Masciantonio, V Murphy, J Reeder, R Anders. 2005. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 73:422-430.
- Duarte, E, T Gyorkos, L Pang, M Abrahamowicz. 2004. Epidemiology of malaria in a hypoendemic Brazilian Amazon migrant population: a cohort study. *Am J Trop Med Hyg* 70:229-237.
- Escalante, A, O Cornejo, A Rojas, V Udhayakumar, A Lal. 2004. Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. *Trends Parasitol* 20:388-395.
- Excoffier, L, G Laval, S Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolut. Bioinf. Online*. p. 47-50.
- Fang, X, D Kaslow, J Adams, L Miller. 1991. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol* 44:125-132.
- Fu, Y, W Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709.
- Galinski, M, J Barnwell. 2009. Monkey malaria kills four humans. *Trends Parasitol*.
- Gosi, P, S Khusmith, T Khalambaheti, D Lanar, K Schaecher, M Fukuda, S Miller. 2008. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. *Malar J* 7:112.
- Grimberg, B, R Udomsangpetch, J Xainli, et al. 2007. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med* 4:e337.
- Guerra, C, R Snow, S Hay. 2006. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol* 22:353-358.
- Gunasekera, A, T Wickramarachchi, D Neafsey, I Ganguli, L Perera, P Premaratne, D Hartl, S Handunnetti, P Udagama-Randeniya, D Wirth. 2007. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol* 24:939-947.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hans, D, P Pattnaik, A Bhattacharyya, A Shakri, S Yazdani, M Sharma, H Choe, M Farzan, C Chitnis. 2005. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Mol Microbiol* 55:1423-1434.

- Hay, S, C Guerra, A Tatem, A Noor, R Snow. 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4:327-336.
- Health, HMOBSovi. 2005. Malaria Epidemiologic Situation in Brazil.
- Hill, W, A Robertson. 1968. The effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. *Genetics* 60:615-628.
- Horuk, R, C Chitnis, W Darbonne, T Colby, A Rybicki, T Hadley, L Miller. 1993. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 261:1182-1184.
- Kho, W, J Chung, E Sim, D Kim, W Chung. 2001. Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. *Korean J Parasitol* 39:143-150.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- Kryazhimskiy, S, J Plotkin. 2008. The population genetics of dN/dS. *PLoS Genet* 4:e1000304.
- Laskowski, RA, MW Macarthur, DS Moss, JM Thornton. 1993. Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26:283-291.
- Li, N, M Stephens. 2003. Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. *Genetics* 165:2213-2233.
- Loiola, C, C da Silva, P Tauil. 2002. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. *Rev Panam Salud Publica* 11:235-244.
- Martinez, P, C Suarez, P Cardenas, M Patarroyo. 2004. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: a modular evolutionary proposal. *Parasitology* 128:353-366.
- Mendis, K, B Sina, P Marchesini, R Carter. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64:97-106.
- Michon, P, T Fraser, J Adams. 2000. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 68:3164-3171.
- Miller, L, S Mason, D Clyde, M McGinniss. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295:302-304.
- Nei, M, T Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3:418-426.
- Nielsen, R, Z Yang. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics* 148:929-936.

- Ranjan, A, C Chitnis. 1999. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14067-14072.
- Rozas, J, J Sánchez-DelBarrio, X Messeguer, R Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Shriner, D, D Nickle, M Jensen, J Mullins. 2003. Potential impact of recombination on sitewise approaches for detecting positive natural selection. *Genet Res* 81:115-121.
- Silva-Nunes, M, RS Malafrente, BA Luz, E Souza, L Martins, S Rodrigues, J Chiang, P Vasconcelos, P Muniz, M Ferreira. 2006. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. *Cad Saude Publica* 22:1325-1334.
- Singh, A, H Ozwara, C Kocken, S Puri, A Thomas, C Chitnis. 2005. Targeted deletion of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during invasion. *Mol Microbiol* 55:1925-1934.
- Singh, H, G Raghava. 2001. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17:1236-1237.
- Singh, H, G Raghava. 2003. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics* 19:1009-1014.
- Singh, S, R Hora, H Belrhali, C Chitnis, A Sharma. 2006. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature* 439:741-744.
- Singh, S, A Singh, S Pandey, S Yazdani, C Chitnis, A Sharma. 2003. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. *Biochem J* 374:193-198.
- Sousa, T, I Cerávolo, C Fernandes Fontes, A Couto, L Carvalho, C Brito. 2006. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol* 146:251-254.
- Sturniolo, T, E Bono, JY Ding, et al. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nature Biotechnology* 17:555-561.
- TA, H. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tsuboi, T, S Kappe, F al-Yaman, M Prickett, M Alpers, J Adams. 1994. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Infect Immun* 62:5581-5586.

- VanBuskirk, K, J Cole-Tobian, M Baisor, E Sevova, M Bockarie, C King, J Adams. 2004a. Antigenic drift in the ligand domain of Plasmodium vivax duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J Infect Dis* 190:1556-1562.
- VanBuskirk, K, E Sevova, J Adams. 2004. Conserved residues in the Plasmodium vivax Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15754-15759.
- VanBuskirk, KM, JL Cole-Tobian, M Baisor, ES Sevova, M Bockarie, CL King, JH Adams. 2004b. Antigenic drift in the ligand domain of Plasmodium vivax Duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *Journal of Infectious Diseases* 190:1556-1562.
- Welch, S, I McGregor, K Williams. 1977. The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:295-296.
- Wijeyesekere, S, R Richardson, J Stuckey. 2007. Modeling the tertiary structure of the patatin domain of neuropathy target esterase. *Protein J* 26:165-172.
- Wilson, D, G McVean. 2006. Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics* 172:1411-1425.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Xainli, J, J Adams, C King. 2000. The erythrocyte binding motif of Plasmodium vivax duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol* 111:253-260.
- Xainli, J, M Baisor, W Kastens, M Bockarie, J Adams, C King. 2002. Age-dependent cellular immune responses to Plasmodium vivax Duffy binding protein in humans. *J Immunol* 169:3200-3207.
- Yang, Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13:555-556.
- Yang, Z, R Nielsen, N Goldman, A Pedersen. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155:431-449.

Table 1
Demographic and epidemiological characteristics of study isolates

P. vivax patient			Localities of Blood collection		
N	Male (%)	Mean age (years)	City/State	API ^a	Rate of Transmission ^b
14	62	30 (8-58)	Macapá / AP	9	Low risk
20	55	35 (17-58)	Manaus / AM	50	Medium risk
18	40	29 (6-90)	Augusto Correa/PA	119	High risk
20	80	32 (16-84)	Porto Velho / RO	139 ^c	High risk
25	76	30 (8-52)	Cuiabá / MT	152 ^c	High risk
25	48	27 (9-49)	Acrelândia / AC	166	High risk

^a Annual parasite index (number of positive exams per 1,000 inhabitants) of contagion localities at the meantime of blood collection

^b Stratification based on API: high risk (API>50); medium risk (API 10 to 50); low risk (API<10).

^c API calculated as media of APIs from the reported localities of contagion.

Table 2
Nucleotide and Haplotype Diversity of PvDBP_{II} gene and F_{ST} among Brazilian populations

Population	S ^b	π^c (SD)	H ^d	Hd ^e (SD)	F _{ST} (X100) ^f				
					AP	AM	PA	RO	MT
AP (N=14) ^a	11	0.0050 (0.0013)	6	0.747 (0.111)	-				
AM (N=20)	11	0.0057 (0.0009)	7	0.779 (0.082)	21.02*	-			
PA (N=18)	11	0.0070 (0.0004)	8	0.869 (0.049)	18.68*	15.56*	-		
RO (N=20)	17	0.0087 (0.0008)	16	0.979 (0.021)	30.29*	16.87*	11.02*	-	
MT (N=25)	16	0.0080 (0.0009)	14	0.897 (0.043)	14.51*	6.97	2.33	7.18*	-
AC (N=25)	13	0.0079 (0.0005)	11	0.917 (0.028)	26.59*	7.24*	14.68*	3.94	9.31*
Total (N=122)	20	0.0081 (0.0003)	34	0.934 (0.012)					

^a Number of analyzed isolates.

^b Number of segregating sites.

^c Average number of nucleotide substitutions per 1000 sites between pairs of sequences (standard deviation).

^d Number of Haplotypes.

^e Haplotype diversity (standard deviation).

^f F_{ST} index calculated using Arlequin 3.01

*P<0.05.

Table S1
Description of PvDBP_I polymorphisms among Brazilian isolates

Polymorphisms	Nucleotide ¹	915	924	997	1111	1123	1134	1151	1153	1156/ 1158 AAG	1169	1192	1211	1251	1257	1270	1309	1392	1456	1508
		AAT ² AAC	AGG AGT	CTT TTT	AAA GAA	AAT GAT	CGC CGT	GGT GAT	GAA AAA	AAT CAG	CAT CGT	TCT ACT	ACA AGA	AAT AAA	ATA ATG	TTA ATA	TGG CGG	ATC ATA	CAA GAA	ATA AAA
		AA N	305 R/S	308 L/F	333 K/E	371 N/D	375 R/R	378 G/D	384 E/K	385 K/N/Q	386 H/R	390 S/T	398 T/R	404 N/K	417 I/M	419 L/I	424 W/R	437 I/I	464 Q/E	486 Q/E
Region (N) ³	Haplotype																			
MT(1)/RO(2)	1		..T				..T		A..	..T		A..	.G.			A..				
MT(1)	2		..T				..T		A..	..T		A..	.G.			A..				G..
MT(1)	3						..T		A..	..T		A..	.G.			A..				
AC(1)/RO(1)	4			T..		G..	..T		A..	..T				..A		A..	C..			.A.
AC(4)/RO(1)	5			T..		G..	..T		A..	..T				..A		A..	C..			
AC(3)/RO(1)	6						..T		A..	..T							C..			.A.
AM(1)/RO(2)	7				G..				A..	..T	.G.			..A		A..	C..			.A.
AM(2)	8		..T		G..				A..	..T	.G.			..A		A..	C..			.A.
AC(1)/RO(1)	9				G..				A..	..T	.G.			..A		A..	C..			
RO(1)	10								A..	..T	.G.			..A		A..	C..			
RO(1)	11									..T				..A		A..	C..			.A.
RO(1)	12									..T	.G.						C..			.A.
AC(1)	13							.A.		..T	.G.						C..			.A.
AM(2)/PA(5)	14																			G..
AP(7)	15	..C																		G..
AP(2)/MT(1)/ RO(1)	16																			
AP(1)	17				G..															
AM(1)	18		..T																	.A.
AC(5)/AP(1)/ AM(9)/MT(6)/ PA(1)/RO(1)	19																			.A.

Figure Legends

FIG. 1 - Locations of blood collection in Brazil. Brazilian map showing the cities and their respective states: Amazonas (AM), Pará (PA), Amapá (AP), Acre (AC), Rondônia (RO) and Mato Grosso (MT). The areas where malaria is endemic to the country are shown in gray.

FIG. 2 - Variability in the PvDBP_I. (A) Frequencies of polymorphic amino acid residues for each Brazilian geographic region. The left letter indicates the more prevalent amino acid and the right letter the polymorphic amino acid at that position (number in the middle). Positions of amino acid residues are consistent with Fang et al. 1991 (Fang et al. 1991). The box indicates a substitution exclusive to Brazilian isolates. (B) Haplotype frequencies of PvDBP_I between Brazilian regions. The phylogenetic tree for the 34 haplotypes of PvDBP_I was reconstructed by the neighbor-joining (NJ) method based on pairwise differences using P-distance. Node significance was assessed through 1000 bootstrap replicates; only values $\geq 50\%$ are shown. Outgroups are EBP sequences of *Plasmodium cynomolgi* and DBP α , β and γ of *P. knowlesi*. The scale bar shows the frequency of each haplotype per region indicated in the horizontal boxes.

FIG. 3 - Spatial variation of recombination parameters across PvDBP_I. The factor by which the recombination rate between adjacent loci exceeds the background rate (ρ), estimated using Phase software.

FIG. 4 - Spatial variation in recombination and selection parameters across the PvDBP_I using OmegaMap software. (A) Recombination parameter estimates (ρ) were carried out using OmegaMap software. The sitewise mean (solid line) and 95% HPD (highest posterior density) interval (dotted lines) are shown. (B) Omega parameter estimates (ω) were carried

out using the omegaMap software package. The sitewise mean (solid line) and 95% HPD intervals (dotted lines) are shown. Short lines on the top of solid-line represent the peptides containing previously identified epitopes: 5, 16, 18, 20, 45, 48 and 66 (Xainli et al. 2002; Cole-Tobian, King 2003) and in silico predicted promiscuous epitopes for MHC class I: Ia [416-G(N/K)F(I/M)WICK(L/I)-424], Ib [482-KSYD(Q/E)WITR-490] and Ic [497-VLSNKF(I/K)SVKNAEK-510] and for MHC class II: IIa [408-YSVKKRLKG(N/K)-417] and IIb [418-F(I/M)WICK(L/I)NV-426]. Nucleotide diversity and standard deviation (π and SD) were calculated for each epitope sequence: 5 – 0.005 (0.0011); 16 – 0.002 (0.0008); 18 – 0.002 (0.0008); 20 – 0.002 (0.0008); 45 - 0.035 (0.0019); 48 – 0.030 (0.0023); 66 – 0.011 (0.0001); Ia – 0.046 (0.0022); Ib - 0.008 (0.0016); Ic – 0.012 (0.0003); IIa – 0.016 (0.0006); IIb – 0.028 (0.0017).

FIG. 5 - 3-D structure of PvDBP_I. (A) Space-filling model of PvDBP_I 3-D structure, showing the DARC-binding residues (Tyr 94, Asn 95, Lys 96, Arg 103, Leu 168 and Ile 175 – yellow) (Singh et al. 2006) and polymorphic residues identified from Brazilian isolates, which are close (blue) or not close (red) to the DARC-binding domain, other residues are shown in light gray. The image on the right represents the rotation of the image in the vertical plane indicated by the arrow. (B) Space-filling model of PvDBP_I 3-D structure color coded according to the posterior probability of positive selection at each codon, calculated using omegaMap. Green residues indicate high posterior probability (>93%) of positive selection. Codons that seem to be less affected by natural positive selection (<93%) are colored in white and DARC binding residues are shown in yellow. Residues in dark gray were not analyzed by omegaMap. Each image indicates the model rotation in the vertical plane indicated by arrows.

FIG. 1

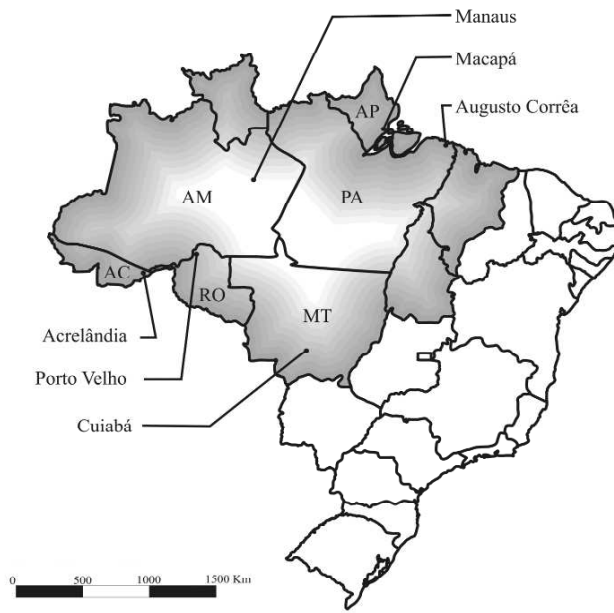


FIG. 2

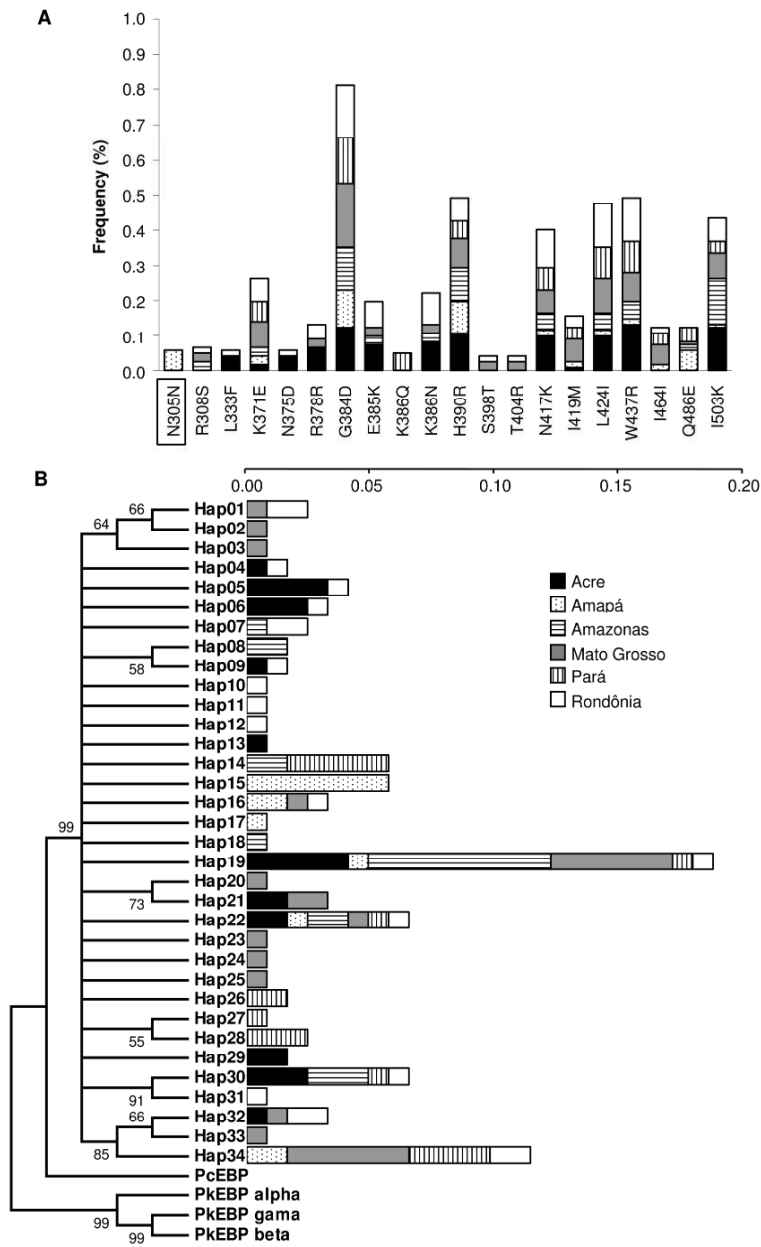


FIG. 3

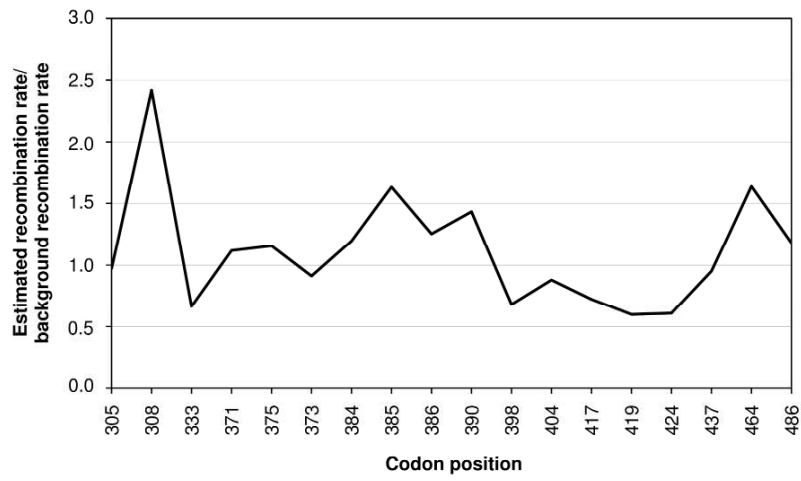


FIG. 4

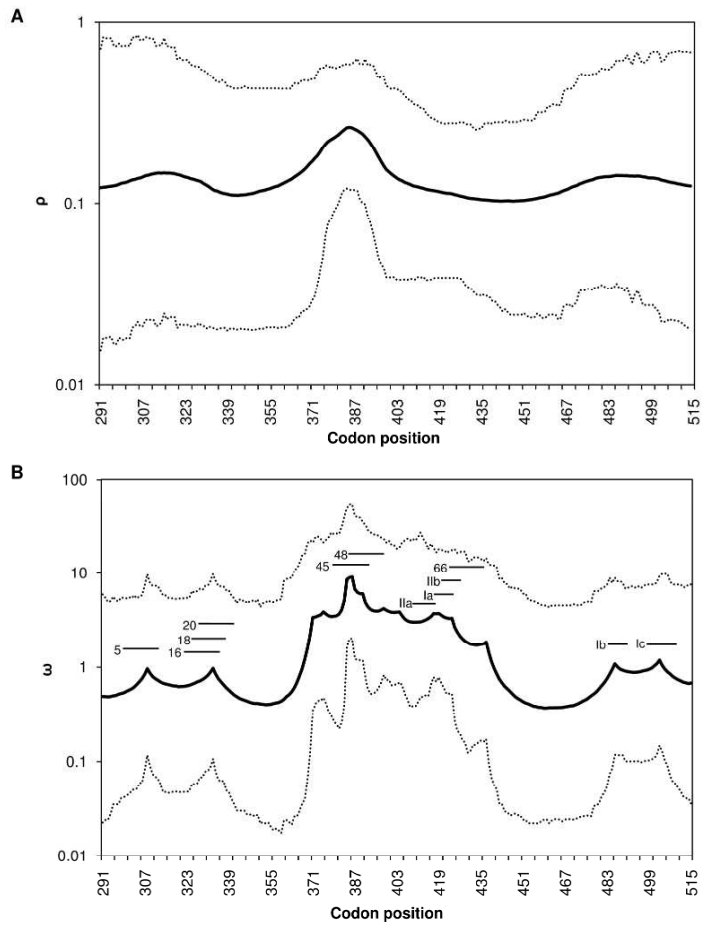


FIG. 5

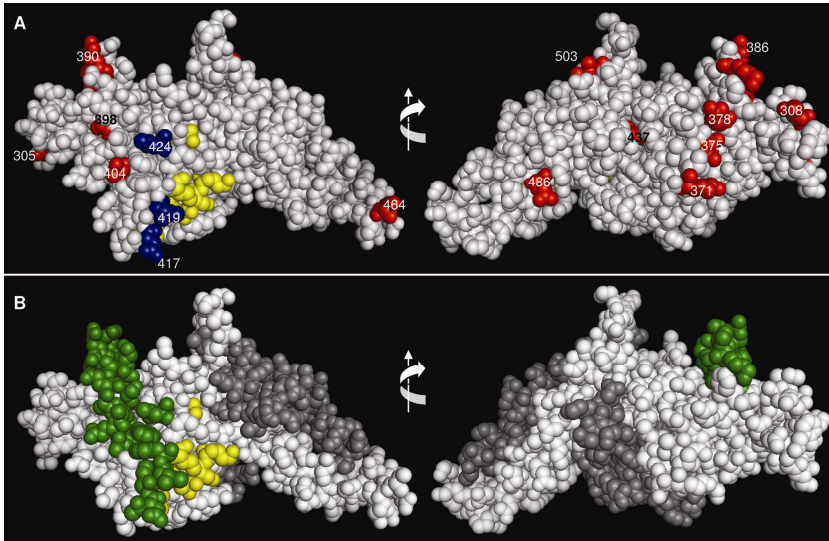
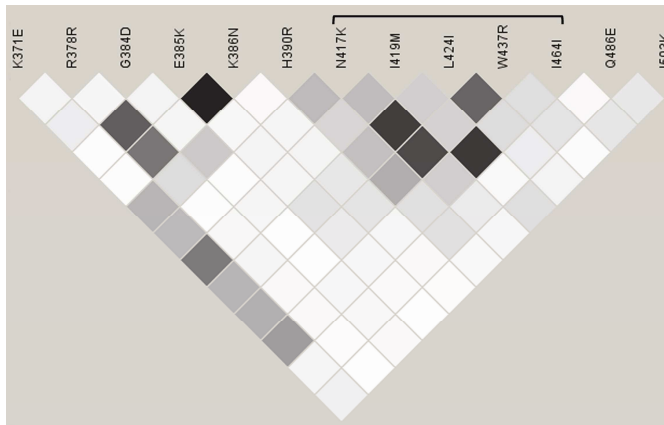


FIG. S1

A



B

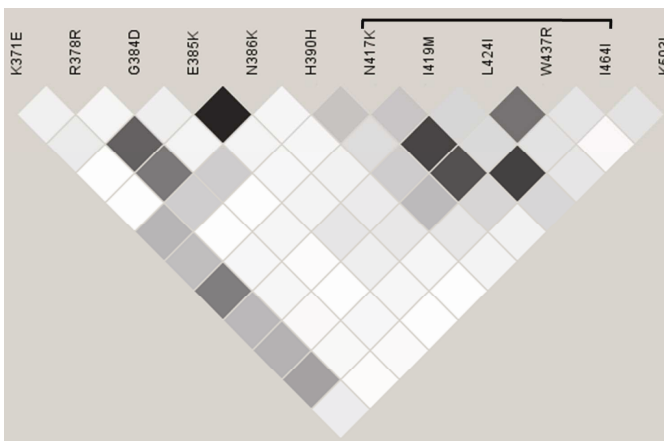


FIG. S2

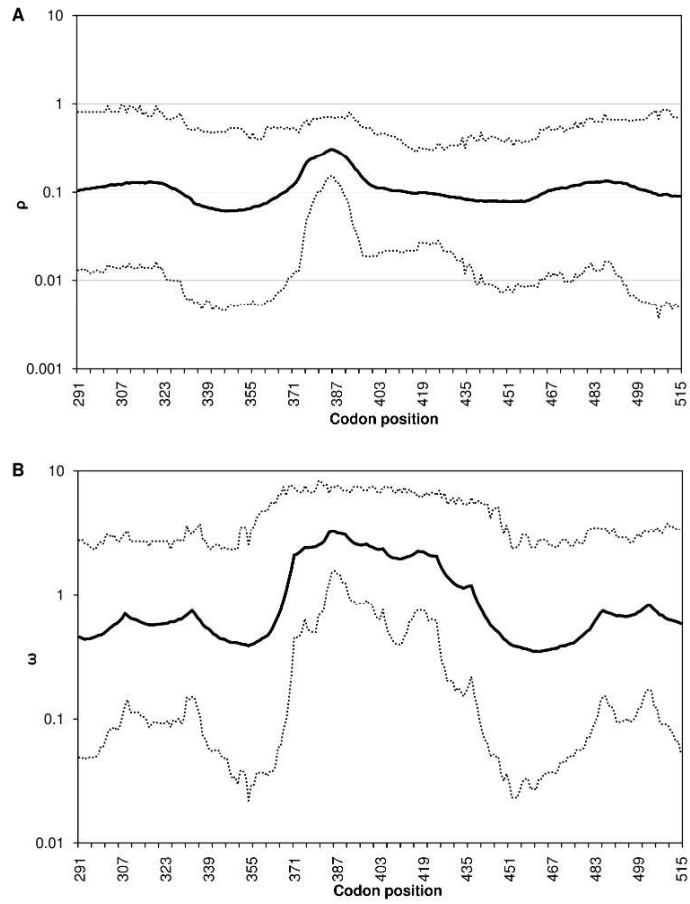
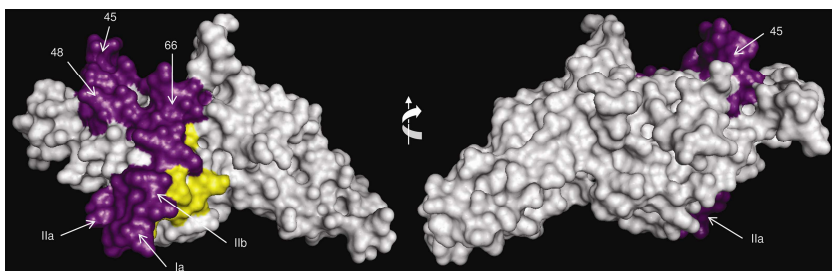


FIG. S3



ORIGINAL PAPER

Vox Sanguinis (2007) 92, 373–380

© 2007 The Author(s)
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd
DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.00902.x

Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor

T. N. Sousa, B. A. M. Sanchez, I. P. Cerávolo, L. H. Carvalho & C. F. A. Brito

Laboratory of Malaria, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil

Vox Sanguinis

Background and Objectives Duffy blood group is of major interest in clinical medicine as it is not only involved in blood-transfusion risks and occasionally in neonatal haemolytic disease, but it is also the receptor for the human malaria parasite *Plasmodium vivax* in the erythrocyte invasion. The aim of this study was to develop a rapid and inexpensive approach for high-throughput Duffy genotyping.

Materials and methods This paper reported the development of a Duffy genotyping assay based on multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) using SYBR Green I fluorescent dye.

Results By using this approach for Duffy genotyping we obtained the same results as that for the conventional allele-specific PCR, however, in a high-throughput assay. The Duffy genotyping of field samples demonstrated that *P. vivax*-infected individuals showed a significantly higher prevalence of two functional alleles than *Plasmodium falciparum*-infected and non-infected individuals. This finding corroborates the hypothesis that the presence of two functional alleles increases the risk of *P. vivax* infection.

Conclusion This methodology may be suitable for epidemiological studies, particularly for exploring the relationship between Duffy alleles and malaria susceptibility, and also for identification of transfusional incompatibility in blood banks.

Key words: DARC, Duffy blood group, malaria, *Plasmodium vivax*, real-time PCR, SYBR green fluorescent dye.

Received: 14 September 2006,
revised 28 December 2006,
accepted 8 January 2007,
published online 15 March 2007

Introduction

The Duffy blood group, also known as Duffy antigen receptor for chemokines (DARC), is of biological and clinical importance, as antibodies against Duffy antigens are responsible for some cases of transfusion incompatibility and haemolytic disease of the newborn [1,2]. Furthermore, besides being a

receptor for various chemokines, the Duffy antigen is the obligatory receptor for invasion of *Plasmodium vivax* malaria parasite [3,4].

The Duffy antigen was first reported in a polytransfused haemophiliac patient, who had an alloantibody against an antigen denoted as Fy^a [5]. The antithetical antigen, Fy^b, was described 1 year later [6]. Fy^a and Fy^b antigens are the products of two codominant alleles *FY^a* and *FY^b* on the chromosome 1 *FY* locus [7]. The single copy *FY* gene is composed of two exons, which encodes for a major product of 336 amino acids [8]. The two common alleles in Caucasians, *FY^a* and *FY^b*, differ by a single base substitution (125G>A) resulting in the replacement of a glycine with an aspartic acid at residue 42 in the extracellular domain of Duffy antigen [9,10].

T. N. Sousa and B. A. M. Sanchez contributed equally to this work.
Correspondence: Cristiana Ferreira Alves de Brito, Laboratory of Malaria, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, Brazil, 30190-002
E-mail: cristiana@cpqrr.fiocruz.br

Most West Africans and 68% of African Americans do not express Fy^a or Fy^b on their red blood cells (RBC), which results in resistance to *P. vivax* infection, because Duffy-negative RBCs cannot be invaded by this parasite [11,12]. The total absence of Fy^a and Fy^b on erythrocytes designate the Duffy-negative phenotype, conveyed by homozygosity for the FY*^BES allele (ES stands for erythroid silent) [13]. The FY*^BES allele differs from FY*^B allele by one substitution, -33T>C on the gene promoter [14]. This mutation disrupted a binding site for the erythroid transcription factor, GATA1, resulting in a lack of FY gene expression only in the erythroid lineage [15]. Recently, the same mutation was described for a new and rare allele also responsible for Duffy antigen negativity in erythroid lineage - FY*^AES - in a *P. vivax*-endemic region of Papua New Guinea; all individuals with this allele were heterozygous for FY*^A allele [16]. Other variations that cause reduction or totally abrogate the expression of the Duffy gene have also been described but only in very low prevalences [17-19].

The molecular characterization of FY alleles has led to the development of Duffy genotyping by polymerase chain reaction (PCR)-based approaches. The original method was based on PCR coupled to restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [20]. Later, Olsson *et al.* [21] described a technique based on allele-specific primers (PCR-ASP) using a heat-activated DNA polymerase. More recently, a real-time PCR protocol had also been described using the LightCycler[®] based on adjacent hybridization of labelled probes [22]. Here, we developed a less expensive assay by using an intercalating fluorescent dye, SYBR Green by real-time multiplex allele-specific PCR to identify the three major Duffy alleles: FY*^A, FY*^B, and FY*^BES. In order to validate our assay, we analyse Duffy alleles from *P. vivax*-infected, *P. falciparum*-infected, and non-infected individuals from Brazilian endemic areas.

Materials and methods

Blood samples and DNA extraction

Peripheral blood samples were collected from 252 donors: (i) 76 from our Research Institute, including five Duffy-negative individuals; and (ii) 176 field samples from Brazilian malaria endemic areas, which included 119 *P. vivax*-infected, 29 *P. falciparum*-infected, and 28 non-infected individuals. Blood was collected from these consenting volunteers as 5 ml samples in ethylenediaminetetraacetic acid. All individuals were adults of 16-72 years old, mean age of 32. DNA was extracted from whole blood samples by using the PureGene DNA isolation kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol.

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

(Report no. 002/2002), according to the Resolution of the Brazilian Council on Health - CNS 196/96.

Duffy phenotyping

The antithetical Fy^a and Fy^b antigens were determined from fresh blood samples by agglutination tests with anti-Fy^a and anti-Fy^b human polyclonal antibodies using ID cards, according to the manufacturer's instructions (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Switzerland).

PCR-ASP

The amplification of major FY alleles was performed using allele-specific primers (BioSynthesis, Heiden, Switzerland) as previously described [21]. PCR-ASP protocol was modified here to replace heat-activated polymerase with conventional *Taq* DNA polymerase. For each PCR reaction we used 200 ng genomic DNA, 0.2 μM of each primer, 200 μM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA), in a final volume of 25 μl. PTC-100[™] Thermal cycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) was programmed as follows: 95 °C for 5 min, followed by four cycles of 95 °C for 1 min, 69 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; and 31 cycles of 95 °C for 1 min, 68 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, with a 5 min final extension of 72 °C. PCR products were analysed in ethidium bromide-stained agarose gels. The PCR programme takes approximately 2 h and the post-PCR analysis, such as gel preparation and visualization, takes another 1 h.

Real-time PCR

Real-time PCRs were carried out in 96-well 0.2 ml thin-wall optical PCR plates with optical sealing tapes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The 10 μl reaction mixture contained 50-100 ng genomic DNA, 5 μl SYBR[®] Green PCR master mix (Applied Biosystems), and 10 pmole of each primer (BioSynthesis). The primers were designed using Primer express[®] software version 2.0 (Applied Biosystems) with modifications that are described in the Results. Amplification and fluorescence detection were performed using ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The PCR amplification profile was a cycle of 95 °C for 10 min, following by 35 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. After amplification, melting curves were observed from the dissociation curve resulting from continuous measurements of fluorescence (F) at 530 nm during which the temperature was gradually increased from 60 to 95 °C. Melting peaks of each amplified fragment were visualized by plotting the negative derivative of the fluorescence with respect to temperature against temperature (-dF/dT[°] vs. T[°]). The real-time PCR, including sample preparation, PCR

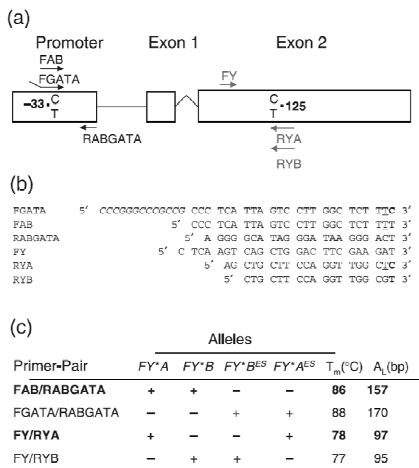


Fig. 1 Schematic diagram of primers for Duffy genotyping by real-time PCR. (a) Schematic representation of *FY* gene showing FAB/RABGATA and FGATA/RABGATA primer-pairs to detect the polymorphism -33I>C in gene promoter, amplifying the wild-type and mutated promoter, respectively. FY/RYA and FY/RYB primer-pairs to detect the polymorphism 125G>A in exon 2, which determines *FY**A and *FY**B alleles, respectively. (b) List of primer sequences showing the added C/G tail in *italics*, deliberate mismatches introduced underlined and polymorphic nucleotides in *bold*. (c) Table showing primer-pairs, alleles amplified (plus symbol), observed melting temperature of each amplicon (T_m) and amplicon length in base-pairs (A₁). *bold* indicates that primer pairs were used together in a multiplex reaction.

program, and analysis of results takes 2 h. Forty-eight samples were analysed per plate.

Statistical analysis

Statistical analysis was undertaken using χ^2 analysis Mantel-Haenszel corrected and Fischer 2-tailed for groups with less than five samples. All analyses were performed on Epi Info statistical software, version 3.3.2 [23].

Results

Primers design and real-time PCR optimization

Four sets of primers were designed for the genotyping of the major Duffy alleles (Fig. 1). For detection of the polymorphism to distinguish the *FY**A from *FY**B alleles, we designed RYA and RYB primers, with the polymorphic nucleotide in their extremely 3'-end, being C and T, respectively. These

primers were used with *FY* forward primer. In order to detect the Duffy promoter mutation, we designed primers FAB (wild-type promoter - WTP) and FGATA (mutated promoter - MUTp), with the polymorphic nucleotide in their extremely 3'-end, C and T, respectively. Each of these primers was used with RABGATA reverse primer. Because of significant homology between allele-specific primers, we introduced a deliberate mismatch between primers and template in the nucleotide exactly before the polymorphic site to prevent amplification of the non-matching allele (Fig. 1b). We added a C/G tail in the 5'-end of FGATA primer, to further enhance differences in both size and melting temperatures from the FAB primer (Fig. 1c). Because of different melting temperature of amplicons, we optimized the use of FY/RYA and FAB/RABGATA primer-pairs as a multiplex reaction in one tube, as well as FY/RYB and FGATA/RABGATA, which were used in another tube (Fig. 1c). Representative graphics of the results obtained for each genotype were shown in Fig. 2. There is an alternative genotype *FY**A^{ES}/*FY**B for the results showed on panel B (Fig. 2).

Comparison of real-time PCR and PCR using allele-specific primers

To measure the accuracy of real-time PCR, we previously identified 76 samples from our Research Institute by Duffy phenotyping, after which these samples were codified and the Duffy genotyping performed by using PCR-ASP and real-time PCR. Our results of Duffy genotyping on real-time PCR totally agree with those results obtained by using PCR-ASP (Table 1).

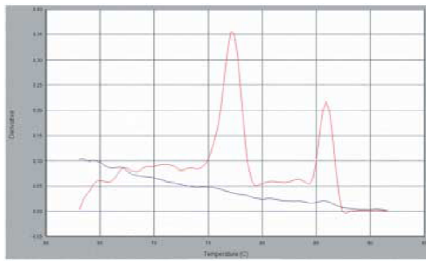
Comparative costs

Table 2 shows the comparison of costs to perform the different protocols described for the Duffy genotyping. Excluding the equipment, our methodology implies in the lowest final cost for Duffy genotyping.

Analysis of Duffy genotyping among field populations

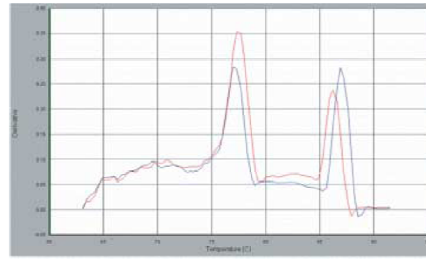
In order to validate our assay, we analysed field samples from Brazilian endemic areas, including *P. vivax*-infected, *P. falciparum*-infected, and non-infected individuals (Table 3). The last two groups were analysed together, as a control group because *P. falciparum* does not use Duffy pathway to invade erythrocytes [24]. As expected, none of the *P. vivax*-infected individuals were Duffy negative, *FY**B^{ES}/*FY**B^{ES}, however, this genotype was also not detected in our group of *P. falciparum*- and non-infected individuals from the endemic area. The primers efficacy was confirmed by using five Duffy-negative individuals from our institute. We observed a

(a)



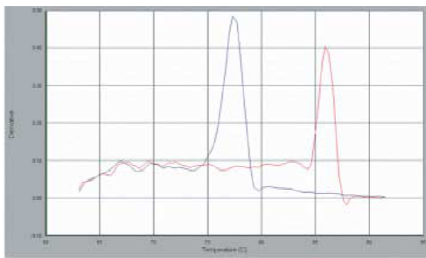
Tube 1 (red) FY^*A + WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B - MUTp -
 Genotype - FY^*A/FY^*A

(b)



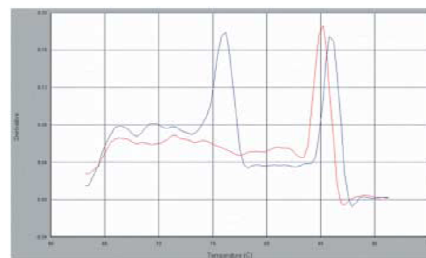
Tube 1 (red) FY^*A + WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp +
 Genotype - FY^*A/FY^*B^{ES} or FY^*A^{ES}/FY^*B

(c)



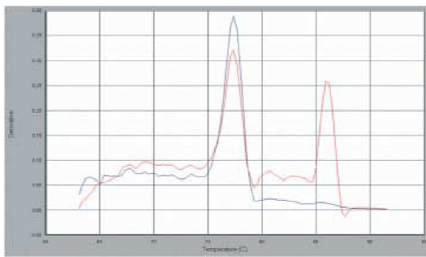
Tube 1 (red) FY^*A - WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp -
 Genotype - FY^*B/FY^*B

(d)



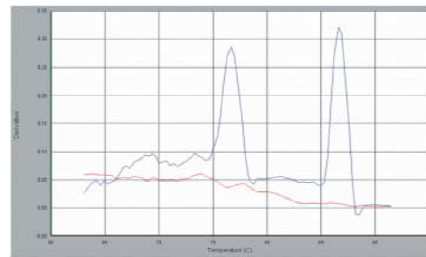
Tube 1 (red) FY^*A - WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp +
 Genotype - FY^*B/FY^*B^{ES}

(e)



Tube 1 (red) FY^*A + WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp -
 Genotype - FY^*A/FY^*B

(f)



Tube 1 (red) FY^*A - WTp -
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp +
 Genotype - FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}

Table 1 Comparison of Duffy genotyping by using real-time PCR with PCR-ASP

Real-time PCR	PCR-ASP						Total
	FY*A/FY*A	FY*A/FY*B ^{ES}	FY*B/FY*B	FY*B/FY*B ^{ES}	FY*A/FY*B	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	
FY*A/FY*A	10 ^a	0	0	0	0	0	10
FY*A/FY*B ^{ES}	0	7	0	0	0	0	7
FY*B/FY*B	0	0	17	0	0	0	17
FY*B/FY*B ^{ES}	0	0	0	17	0	0	17
FY*A/FY*B	0	0	0	0	20	0	20
FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	0	0	0	0	0	5	5
Total	10	7	17	17	20	5	76

^aIn bold there are the coincidental results for both assays.

Table 2 Comparative costs of different approaches for Duffy genotyping (in US\$)

	Conventional PCR		Real-time PCR	
	PCR-RFLP [20]	PCR-ASP [21]	LightCycler [22]	SYBR Green I (here in)
Equipment	20 000.00	20 000.00	60 000.00	42 000.00
PCR reagents	0.043	0.043	1.84	0.34
Polymerase	0.21	0.21/0.3/6 ^b		
Primers	0.002	0.0023	0.8	0.0319
Enzymes	0.65 ^c	NA	NA	NA
Results visualization	0.1	0.01	NA	NA
Consumables	0.098	0.098	0.18	0.075
Total/reaction ^d	1.10	0.32/0.49	2.82	0.45
Total/patient ^d	4.40	1.29/1.96	5.64	0.89

NA, not applicable.

^aConventional/heat-activated *Taq* DNA polymerase.

^bBy using enzymes *BanI* and *SstI*.

^cTotal cost for one reaction, except the equipment.

^dTotal cost for patient, considering four reaction for conventional PCR and two for real time PCR.

statistically significant higher frequency of FY*B^{ES} allele in non-*P. vivax*-infected individuals. The percentage of individuals expressing two functional alleles for Duffy antigen was significantly higher in *P. vivax*-infected than in non-*vivax* individuals (74% and 55%, respectively, $P = 0.006$ by χ^2 analysis).

Discussion

The Duffy genotyping method described here, based on SYBR Green I in real-time multiplex allele-specific PCR, can be used as a high-throughput discrimination of the three major

Duffy alleles. This approach takes advantage of the fluorescent property of SYBR Green I and of the melting curve analysis for the detection and discrimination of amplicons differing in length and nucleotide content. The insertion of deliberate mutation and addition of C/G tail allowed the discrimination of variant alleles and avoid false-positive detection [25].

Of importance, besides being reliable and sensitive, our approach to Duffy genotyping is as cost-effective as other PCR-based protocols. PCR-RFLP is time consuming due to the numerous steps, and because of the use of restriction enzymes, it is also very expensive. Moreover, the interpretation of the results on an agarose gel is not always very clear because of

Fig. 2 Representative graphs of Duffy genotyping by real-time PCR. Graphs show the profiles of studied genotypes, obtained using two multiplex reactions: in tube 1 (red lines) were used FAB/RABGATA and FY/RYA primer-pairs for amplification of wild-type Duffy promoter - WTP and FY*A allele; and in tube 2 (blue lines) were used FGATA/RABGATA and FY/RYB primer-pairs for amplification of mutated Duffy promoter - MUTp and FY*B allele. In the bottom of each graph is showing the results interpretation indicating the amplified alleles (plus symbol) and the genotype obtained.

Table 3 Duffy genotyping of *Plasmodium vivax*-infected and non-*vivax* individuals based on real-time multiplex allele-specific PCR using the SYBR Green I fluorescent dye

Phenotype (%)	Genotype (%)		Allele (frequency)			
	<i>P. vivax</i> individual ^a (n = 119)	<i>P. falciparum</i> /non-infected individual ^b (n = 57)	<i>P. vivax</i> individual (n = 119)	<i>P. falciparum</i> /non-infected individual (n = 57)	<i>P. vivax</i> individual (n = 119)	<i>P. falciparum</i> /non-infected individual (n = 57)
Fy(a+b-)	27	26	FY*A/FY*A 15 FY*A/FY*B ^{ES} 12	7 19	FY*A 0.39 FY*B 0.49	0.35 0.42
Fy(a-b+)	38	37	FY*B/FY*B 24 ^c FY*B/FY*B ^{ES} 14 ^d	11 26	FY*B ^{ES} 0.13 ^e FY*A ^{ES} 0	0.23 0
Fy(a+b+)	35	37	FY*A/FY*B 35	37		
Fy(a-b-)	0	0	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES} 0	0		

^a*Plasmodium vivax*-infected individuals from Brazilian malaria endemic areas.

^b*P. falciparum*-infected and non-infected individuals from the same endemic areas.

^c χ^2 analysis $P = 0.031$.

^d χ^2 analysis $P = 0.036$.

^e χ^2 analysis $P = 0.022$.

the presence of non-specific bands, incomplete digestion, or even contamination, because every single step increases the risk of error. On the other hand, PCR-ASP has been carried out using a heat-activated DNA polymerase to avoid non-specific products. However, it is a very expensive enzyme to use in routine laboratory tests as it nearly doubles expenses (Table 2). In order to decrease this cost, we have successfully standardized the protocol using a conventional *Taq* DNA polymerase. However, although this approach was not expensive, it is still a time-consuming assay because it requires a post-PCR handling, as it is inadequate for large-scale analysis.

Duffy genotyping based on real-time PCR overcame these drawbacks because it enables specific amplification and detection of amplicons without post-PCR manipulations. Methods based on fluorescent probes are not time consuming and are easier to optimize; however, the use of labelled probes increase the expenses five times. For that reason, SYBR Green I-based methods are much less expensive.

To validate our assay we analysed field samples from Brazilian malaria endemic areas. Considering that for erythrocyte invasion the *P. vivax* parasite needs, at least, one functional Duffy antigen being expressed on RBCs, and that the merozoite invasion is significantly reduced when only one allele is expressed, we postulated that differences in Duffy allele prevalences could reflect susceptibilities to *P. vivax* infection [4,26]. Although, the Duffy phenotype prevalences of our samples were similar to the prevalences of Caucasian Portuguese, the genotype and allele frequencies were quite different, being the *FY*B^{ES}* allele more prevalent in our samples [22]. Comparing the *FY* allele frequencies of

different ethnic populations from Brazil, our individuals showed a mixture of Amerindian parentage and European parentage [27,28]. Based on the lack of *FY*B^{ES}/FY*B^{ES}* genotype described here, our data differ from a previous study carried out in Brazil (Rondonia State), where the prevalence of this genotype corresponds to 12% of the *P. falciparum*- and/or *P. malaric*-infected individuals [29]. These differences might be due to the distinct genetic background of the populations that were studied, because in the Rondonia study, Amerindians were not included, and in our study, according to physical characteristics, most individuals seems to be Amerindian related. In conclusion, *P. vivax*-infected individuals have in comparison to *P. falciparum*-infected and non-infected individuals a higher prevalence of two functional alleles and lower frequency of *FY*B^{ES}* allele. These findings corroborate the hypothesis that the presence of two functional alleles increases the risk of *P. vivax* infection [26].

Since the real-time PCR is performed with the GATA-1 and the *FY*A/FY*B* analysis being performed separately, our protocol is not able to confirm whether GATA-1 mutation is in *cis* with *FY*A* or *FY*B* allele. However, we are assuming that GATA-1 mutation occurred in *cis* with *FY*B* allele because the *FY*A^{ES}* allele is rare [16]. Then, the protocol that we described here is a valuable tool to identify the most common Duffy genotypes.

Finally, this new real-time approach, which is feasible and easy to perform in a high-throughput scale, will improve and facilitate malaria epidemiological studies in different endemic areas of the world. Also, this protocol should be helpful in blood banks to prevent red blood cell alloimmunizations, including those induced by blood incompatibilities between

Fy(a+) and Fy(b+) homozygous individuals. As well, this genotyping protocol should be important to identify circumstances in which there are no immunization risk, such as Fy^aA^{ES} or Fy^aB^{ES} individuals receiving, respectively, Fy(a+) and Fy(b+) blood transfusions. In this case, the blood tolerance is due to the Duffy antigen expression in non-RBC tissues of recipients.

Acknowledgements

We would like to thank the financial support of Tropical Diseases Research/World Health Organization, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz.

References

- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH: A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993; 261:1182-1184
- Szabo MC, Soo KS, Zlotnik A, Schall TJ: Chemokine class differences in binding to Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1995; 270:25348-25351
- Anstee DJ, Mollison PL, Klein HG, Caplan L: *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11th edn. Oxford, Blackwell Publishing, 2006
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH: The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976; 295:302-304
- Cutbush M, Mollison PL: The Duffy blood group system. *Heredity* 1950; 4:383-389
- Ikin EW, Mourant AE, Pettenkofer HJ, Blumenthal G: Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fyb. *Nature* 1951; 168:1077-1078
- Mathcw S, Chaudhuri A, Murty VV, Pogo AO: Confirmation of Duffy blood group antigen locus (FY) at 1q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 67:68
- Pogo AO, Chaudhuri A: The Duffy blood group system and its extensions in nonhuman primates; in Blancher A, Klein J & Socha WW (eds): *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates*. Berlin, Springer-Verlag, 1997
- Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S: Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 1995; 85:622-626
- Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ: Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995; 90:823-829
- Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y: Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fy^a/Fy^b blood group polymorphism. *Hum Genet* 1995; 95:407-410
- Sanger R, Race RR, Jack J: The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy(a-b-). *Br J Haematol* 1955; 1:370-374
- Welch SG, McGregor IA, Williams K: The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71:295-296
- Pogo AO, Chaudhuri A: The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol* 2000; 37:122-129
- Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C: Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995; 10:224-228
- Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatman BA, Kazura JW: Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13973-13977
- Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y: Arg99Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood* 1998; 92:2147-2156
- Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, Sausais L, Gomensoro-Garcia AE, Hannon J, Rosenberger S, Poole J, Burgess G, Pogo O, Reid M: New genotypes in Fy(a-b-) individuals. nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. *Br J Haematol* 2000; 108:448-454
- Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, Saad ST, Costa FF, Reid ME: A novel FY allele in Brazilians. *Var Sang* 2004; 87:190-195
- Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO: The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 1995; 85:615-621
- Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL: A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion* 1998; 38:168-173
- Araujo F, Pereira C, Aleixo A, Henriques I, Monteiro F, Meireles E, Lacerda P, Cunha-Ribeiro LM: Rapid genotyping of the major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using Real-Time fluorescence polymerase chain reaction. *Immunohematology* 2001; 17:42-44
- Sullivan KM, Foster DA: Useful software in epidemiology and public health. *Epidemiol Monitor* 1990; 11:7-10
- Gaur D, Mayer DC, Miller LH: Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol* 2004; 34:1413-1429
- Dall'Ozzo S, Andres C, Bardos P, Watier H, Thibault G: Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in Real-Time multiplex allele-specific PCR. *J Immunol Meth* 2003; 277:185-192
- Michon P, Woolley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH: Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett* 2001; 495:111-114
- Da Silva WA Jr, Bortolini MC, Meyer D, Salzano FM, Elion J, Krishnamoorthy R, Schneider MP, De Guerra DC, Layrisse Z,

- Castellano HM, Weimer ID, Zago MA: Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. *Am J Phys Anthropol* 1999; 109:425-437
- 28 Palatnik M, Silva Junior WA, Estalote AC, de Oliveira JE, Milech A, Zago MA: Ethnicity and type 2 diabetes in Rio de Janeiro, Brazil, with a review of the prevalence of the disease in Amerindians. *Hum Biol* 2002; 74:533-544
- 29 Cavasini CE, Tarelho Pereira FJ, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU: Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondonia, Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:591-595

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos de *P. vivax* é complexo e envolve várias etapas. A interação da Duffy binding protein de *P. vivax* com o receptor DARC constitui a principal via de invasão do eritrócito (Miller et al., 1976). A ligação PvDBP-DARC parece ser essencial na etapa de formação de uma junção entre as membranas do eritrócito e do merozoíto, uma etapa chave do processo de invasão que compromete o parasito, de maneira irreversível, a entrar no eritrócito (Miller, 1989; Singh et al., 2005). Portanto, há um grande interesse no desenvolvimento de uma vacina anti-*P. vivax* capaz de induzir anticorpos que bloqueiem a interação PvDBP-DARC e, conseqüentemente, a invasão do eritrócito.

Uma vacina direcionada para um antígeno do parasito de fase eritrocítica, como a PvDBP, seria potencialmente eficaz em controlar a doença, reduzindo a sua morbidade e mortalidade (Todryk & Hill, 2007). A idéia de que é possível desenvolver uma vacina anti-PvDBP se baseia, principalmente, nas observações de que indivíduos naturalmente expostos à infecção por *P. vivax* apresentam anticorpos anti-PvDBP_{II} capazes de bloquear a invasão dos eritrócitos *in vitro* e que a imunização de animais induz altos títulos de anticorpos anti-PvDBP_{II} inibitórios (Ceravolo et al., 2008; Grimberg et al., 2007; King et al., 2008; Moreno et al., 2008). Diante dessas evidências, estão em andamento ensaios clínicos para avaliação da toxicidade, imunogenicidade e eficácia de uma vacina anti-PvDBP_{II} em humanos (Chitnis & Sharma, 2008). A alta variabilidade da PvDBP_{II} pode, contudo, comprometer os resultados destes ensaios, sugerindo a necessidade de estratégias que considerem a variabilidade antigênica da PvDBP_{II} no desenvolvimento de uma vacina. Nesse sentido, é essencial a identificação de regiões na proteína que sejam capazes de induzir uma resposta imune que eficientemente controle a infecção pelo plasmódio, mas que ao mesmo tempo, não comprometam a eficácia da vacina em decorrência da variabilidade genética comumente observada na PvDBP_{II}.

6.1 Identificação de polimorfismos na DBP_{II} potenciais alvos de anticorpos em isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira

O presente estudo foi pioneiro na identificação dos polimorfismos de base única (SNPs) e caracterização da diversidade genética do domínio de ligação da Duffy binding protein em isolados de *P. vivax* da região Amazônica brasileira. Inicialmente foram analisados oito polimorfismos da PvDBP_{II} em 40 isolados de *P. vivax* do Brasil (Sousa et al., 2006, Artigo 1). Alguns desses polimorfismos haviam sido anteriormente caracterizados por VanBuskirk e colaboradores (2004a) como sendo capazes de alterar o reconhecimento imune da proteína. No Brasil, a freqüente associação entre os resíduos nas posições 417, 424 e 437 sugere que esses aminoácidos constituam um epitopo descontínuo na PvDBP_{II} alvo de anticorpos inibitórios. Por outro lado, na Papua Nova Guiné uma forte associação foi observada entre os resíduos nas posições 417, 437 e 503 (VanBuskirk et al., 2004a). Esses resultados sugerem que a variação na pressão seletiva exercida pelo sistema imune possa refletir em diferenças no padrão de SNPs entre os isolados de *P. vivax* da Papua Nova Guiné e do Brasil.

Com a elucidação do modelo tridimensional da PvDBP_{II}, baseado na estrutura cristalográfica da proteína ortóloga de *P. knowlesi*, foi possível identificar que o resíduo I503K não ocorre em proximidade ao N417K e W437R na estrutura da PvDBP_{II} (observação pessoal). Contudo, Vanbuskirk e colaboradores (2004a) demonstraram que, principalmente os resíduos W437 e I503 são capazes de inibir a ligação dos eritrócitos a PvDBP_{II} in vitro. Possivelmente, ao contrário do que foi proposto por Vanbuskirk e colaboradores (2004a), esses resíduos não constituem um único epitopo conformacional, mas distintos epitopos alvos de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}. Corroborando essa idéia, recentemente um peptídeo (aa 503-522) que se liga a várias moléculas de MHC de classe II foi identificado experimentalmente, sugerindo que o resíduo I503K é parte de um epitopo linear na PvDBP_{II} (Saravia et al., 2008).

6.2 A variabilidade genética da DBP_{II} de isolados de *P. vivax* do Brasil é moldada pela recombinação e seleção natural

Na segunda etapa deste estudo, foram analisadas 122 seqüências de isolados de *P. vivax* de seis regiões da Amazônia Legal brasileira com a finalidade de melhor caracterizar a diversidade genética da PvDBP_{II}. No total, foram descritos 20 sítios polimórficos no gene dbpII e identificados 34 haplótipos. A alta diversidade haplotípica e a taxa de recombinação elevada em algumas regiões da dbpII como inferido pelos programas PHASE e omegaMap sugerem claramente que a recombinação genética tem contribuído para a geração e/ou manutenção da variabilidade nesse antígeno do parasito (Sousa et al., 2008, Artigo 2).

Adicionalmente, evidenciou-se que a diversidade genética da PvDBP_{II} difere entre os isolados amostrados nas várias localidades da Amazônia brasileira, sendo observada uma correlação positiva entre a taxa de transmissão de malária e a diversidade nucleotídica e haplotípica. Assim, as seqüências da PvDBP_{II} de isolados de *P. vivax* de Acrelândia/AC, região com intensa transmissão de malária, como indicado pelo alto valor da incidência parasitária anual (IPA), também apresentaram elevada diversidade nucleotídica e haplotípica. É interessante notar que nessa mesma área, Ferreira e colaboradores (2007a), utilizando dados de microssatélites, estimaram uma proporção de 49% de indivíduos com infecção múltipla. Como a infecção múltipla pode favorecer a recombinação genética entre parasitos genotipicamente distintos durante a reprodução sexuada no mosquito, os resultados de Ferreira e colaboradores (2007a) reforçam as evidências de que a recombinação tem um papel importante na determinação da estrutura haplotípica da PvDBP_{II} (Sousa et al., 2008, Artigo 2).

Os resultados obtidos também sugerem que a pressão exercida pelo sistema imune do hospedeiro é responsável por selecionar positivamente os SNPs e manter a diversidade genética no domínio de ligação da PvDBP. Desse modo, a diversidade nucleotídica e o valor do parâmetro de seleção natural omega (ω) foram maiores nas regiões da proteína preditas *in silico* ou experimentalmente definidas como epitopos de células B e T. A utilização da abordagem proposta por Wilson-McVean e implementada no programa omegaMap permitiu estimar adequadamente o efeito da seleção natural em codons individuais da PvDBP_{II} e concluir que a seleção natural positiva ou a seleção purificadora relaxada agem em determinados resíduos, preferencialmente naqueles que constituem epitopos.

6.3 Predição in silico de epitopos de células B e T e mapeamento na estrutura tridimensional da PvDBP_{II} de polimorfismos próximos ao sítio funcional da proteína

Com o objetivo de auxiliar na identificação de potenciais regiões da proteína para serem utilizadas em vacinas, realizou-se a predição de epitopos promíscuos de células B e T na seqüência da PvDBP_{II} in silico, em adição à análise de epitopos previamente determinados experimentalmente (Cole-Tobian & King, 2003; Xainli et al., 2002). Entre os epitopos analisados, o peptídeo de ligação ao MHC de classe I predito in silico como epitopo promíscuo, Ia, que inclui os resíduos polimórficos N417K, I419M e L424I, apresentou a maior diversidade nucleotídica e uma clara evidência de seleção natural positiva (Sousa et al., 2008, Artigo 2). No estudo anterior, uma freqüente associação entre N417K e L424I foi evidenciada na seqüência da PvDBP_{II} de isolados de *P. vivax* do Brasil (Sousa et al., 2006, Artigo 1). Os três resíduos estão inseridos dentro de um bloco de moderado desequilíbrio de ligação na PvDBP_{II} e espacialmente próximos na estrutura tridimensional, reforçando a idéia de que eles constituem um único epitopo na PvDBP_{II}. Adicionalmente, esses resíduos foram mapeados próximos ao sítio de ligação da proteína com o seu receptor (Sousa et al., 2008, Artigo 2). Resultados experimentais obtidos por Vanbuskirk e colaboradores (2004a) sugerem que polimorfismos em alguns resíduos, incluindo o N417K, alteram o caráter antigênico e a sensibilidade aos anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}.

Em conjunto, os dados corroboram a hipótese de que *P. vivax* pode invadir eficientemente o eritrócito ao escapar da resposta imune do hospedeiro direcionada para regiões funcionalmente importantes da PvDBP_{II}. Nesse modelo de evasão imune, alguns polimorfismos adjacentes ao sítio de ligação podem impedir a ligação de anticorpos inibitórios, protegendo o sítio funcional da PvDBP_{II} (Cole-Tobian & King, 2003; McHenry & Adams, 2006; Tsuboi et al., 1994).

6.4 Evidências sugerem que os polimorfismos na PvDBP_{II} são alvos de anticorpos bloqueadores da interação PvDBP_{II}-DARC

Os resultados experimentais obtidos pelo nosso grupo de pesquisa reforçam a idéia de que os polimorfismos na PvDBP_{II} apresentam relevância imunológica (Ceravolo et al., 2008; Artigo em anexo). Algumas evidências indicam que a resposta imune pode ser específica para uma variante da proteína, isto é, variante-específica e que os polimorfismos são capazes de alterar a imunogenicidade da PvDBP_{II} (Ceravolo et al., 2008, Artigo em anexo; VanBuskirk et al., 2004a). No Brasil, demonstrou-se que a imunidade anti-PvDBP_{II} pode ser direcionada para um alelo específico em indivíduos não imunes (Ceravolo et al., 2008; Artigo em anexo). Apenas os indivíduos expostos a várias infecções por *P. vivax* apresentavam anticorpos capazes de bloquear a ligação de diferentes variantes da PvDBP_{II} ao receptor DARC (Ceravolo et al., 2008). Esses resultados corroboram aqueles obtidos por Vanbuskirk e colaboradores (2004a), que demonstraram que a substituição por mutagênese sítio-dirigida de alguns resíduos da PvDBP_{II} foi suficiente para alterar a capacidade do soro de coelho imunizado com a PvDBP_{II} de bloquear a interação proteína-receptor.

Como já demonstrado anteriormente, os polimorfismos na PvDBP_{II} não parecem ter um efeito direto na interação proteína-receptor (VanBuskirk et al., 2004b). A partir de um ensaio de citoaderência *in vitro*, em que variantes da PvDBP_{II} foram expressas na superfície de células COS-7, identificou-se vários resíduos capazes de abolir completamente a ligação da PvDBP_{II} a DARC. Esses resíduos críticos invariáveis ocorrem em oito grupamentos descontínuos, flanqueados por resíduos que, quando mutados, interferem parcialmente na ligação PvDBP_{II}-DARC (Hans et al., 2005; VanBuskirk et al., 2004b). Como vários resíduos parecem ser críticos na ligação da PvDBP_{II} a DARC, é sugerido que o sítio de ligação da PvDBP_{II} pode ser consideravelmente maior do que o descrito por Singh e colaboradores (2006) e mostrado na figura 6 em Sousa e colaboradores (2008; Artigo 2) (McHenry & Adams, 2006). Todos os resíduos críticos para a ligação são conservados entre os isolados de *P. vivax*, com exceção do N305N e N375D (VanBuskirk et al., 2004b; observação pessoal). Contudo, se a substituição do resíduo de asparagina por um ácido aspártico na posição 375 em isolados de campo de *P. vivax* interfere diretamente na ligação PvDBP_{II}-DARC ainda deve ser avaliado.

Ao contrário do que é observado na PvDBP_{II} e EBA-175 de *P. falciparum*, cada mutação no domínio DBL dos parálogos de *P. falciparum* BAEBL e JESEBL pode alterar as propriedades de ligação dessas proteínas aos seus receptores na superfície do eritrócito (Mayer et al., 2002; 2004). A BAEBL apresenta apenas quatro posições variantes, todas no domínio DBL F1, enquanto na JESEBL foram identificados cinco polimorfismos no domínio DBL, três em F1 e dois em F2. Essas proteínas parecem se ligar a diferentes receptores na superfície dos eritrócitos e os estudos de Mayer e colaboradores (2002; 2004) sugerem que as mutações no domínio DBL é que definem a especificidade da ligação.

Desse modo, forças seletivas distintas parecem produzir padrões variados de diversidade genética nos domínios DBL. O primeiro padrão de polimorfismos corresponde ao exemplificado para a PvDBP_{II} e EBA-175, em que são selecionados vários polimorfismos que parecem permitir o escape do parasito do reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Contudo não se pode excluir a possibilidade de que alguns polimorfismos na PvDBP_{II} sejam positivamente selecionados por aumentarem a afinidade da ligação da proteína ao seu receptor. Por outro lado, o padrão polimórfico descrito para a BAEBL e JESEBL parece resultar da seleção de mutações que alteram a especificidade de ligação entre a proteína do parasito e o receptor eritrocítico. Como consequência, *P. falciparum* pode invadir os eritrócitos utilizando diferentes vias de invasão (VanBuskirk et al., 2004b).

6.5 A suscetibilidade à infecção por *P. vivax* está associada à densidade do receptor DARC na superfície do eritrócito

Além das propriedades inerentes à proteína do parasito, aspectos associados ao receptor eritrocítico também podem interferir na interação PvDBP_{II}-DARC, como por exemplo, o nível de expressão de DARC na superfície dos eritrócitos. Como demonstrado previamente, os indivíduos que apresentam dois alelos DARC funcionais expressam o dobro de proteína em comparação aos indivíduos com um único alelo funcional (Woolley et al., 2000; Yazdanbakhsh et al., 2000; Zimmerman et al., 1999). Conseqüentemente, a proporção de eritrócitos que se ligam à PvDBP_{II} expressa na superfície de células COS-7 in vitro é maior para os eritrócitos que exibem os genótipos FY*A/FY*A e FY*B/FY*B (Michon et al., 2001).

Neste estudo, avaliou-se a associação entre prevalência dos alelos DARC e suscetibilidade à infecção por *P. vivax* na Amazônia Legal brasileira a partir da genotipagem de DARC utilizando uma nova metodologia baseada no PCR em tempo real, em um sistema multiplex com iniciadores alelo-específicos. Para a genotipagem, o corante SYBR Green I foi utilizado em substituição às sondas marcadas, facilitando a otimização da PCR e reduzindo o custo em comparação aos métodos de genotipagem já descritos (Sousa et al., 2007, Artigo 3).

A genotipagem de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária no Brasil indicou uma porcentagem significativamente maior de indivíduos com dois alelos DARC funcionais no grupo de pessoas infectadas com *P. vivax* em comparação ao grupo infectado com *P. falciparum* ou não infectado. Esse resultado sugere que os indivíduos com os genótipos FY*A/FY*A, FY*B/FY*B e FY*A/FYB apresentam um risco aumentado em 2,5 vezes de se infectarem por *P. vivax* em relação aos indivíduos FY*A/FY*B^{ES}, FY*B/FY*B^{ES} (Odds ratio= 2,49, IC 95%= 1,28-4,84, P= 0,006) (Sousa et al., 2007, Artigo 3). Um nível semelhante de proteção contra a infecção por *P. vivax* também foi associado ao genótipo FY*A/FY*A^{ES} em crianças não-imunes à malária na Papua Nova Guiné (Kasehagen et al., 2007). Em conjunto, esses dois estudos são pioneiros na evidência de uma associação significativa entre prevalência dos alelos DARC e suscetibilidade à infecção por *P. vivax*.

7 CONCLUSÕES

O domínio de ligação da Duffy binding protein (DBP_{II}) é bastante polimórfico entre os isolados de *P. vivax* da Amazônia Legal brasileira, sendo observada uma correlação positiva entre a taxa de transmissão de malária e a diversidade nucleotídica e haplotípica no gene dbpII.

A recombinação tem contribuído para a extensa diversidade haplotípica da PvDBP_{II} em isolados do parasito no Brasil, sendo essa diversidade mantida na população pela seleção natural positiva.

A seleção natural positiva age principalmente em regiões de epitopos na PvDBP_{II}, selecionando mutações que impedem o reconhecimento da proteína do parasito pelo sistema de defesa do hospedeiro.

Os resíduos polimórficos estão distribuídos na estrutura tridimensional da PvDBP_{II} e ocorrem, inclusive, em proximidade ao sítio de ligação da proteína. É sugerido que os polimorfismos adjacentes ao sítio de ligação possam impedir a ligação de anticorpos inibitórios, protegendo o sítio funcional da PvDBP_{II}.

Uma maior prevalência de dois alelos DARC funcionais foi observada entre indivíduos infectados por *P. vivax*, em relação aos indivíduos não infectados ou infectados com *P. falciparum*, corroborando a hipótese de que a presença de dois alelos DARC funcionais aumentaria o risco de infecção por *P. vivax*.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 - Ceravolo I. P. , Sanchez B. A. M. , Sousa T. N. , Guerra B. M. , Soares I. S. , Braga E. M. , McHenry A. M. , Adams J. H. , Brito C. F. A. , Carvalho L. H. (2009). Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(2): 502-510. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x

8.2 Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou

Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection

I. P. Ceravolo,* B. A. M. Sanchez,*

T. N. Sousa,* B. M. Guerra,*

I. S. Soares,[†] E. M. Braga,[‡]A. M. McHenry,[§] J. H. Adams,[§]

C. F. A. Brito* and L. H. Carvalho*

*Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação

Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas

Gerais, [†]Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP,

[‡]Instituto de Ciências Biológicas, Universidade

Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,

Brazil, and [§]University of South Florida, Tampa,

FL, USA

Summary

The Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* (DBP) is a critical adhesion ligand that participates in merozoite invasion of human Duffy-positive erythrocytes. A small outbreak of *P. vivax* malaria, in a village located in a non-malarious area of Brazil, offered us an opportunity to investigate the DBP immune responses among individuals who had their first and brief exposure to malaria. Thirty-three individuals participated in the five cross-sectional surveys, 15 with confirmed *P. vivax* infection while residing in the outbreak area (cases) and 18 who had not experienced malaria (non-cases). In the present study, we found that only 20% (three of 15) of the individuals who experienced their first *P. vivax* infection developed an antibody response to DBP; a secondary boosting can be achieved with a recurrent *P. vivax* infection. DNA sequences from primary/recurrent *P. vivax* samples identified a single *dbp* allele among the samples from the outbreak area. To investigate inhibitory antibodies to the ligand domain of the DBP (cysteine-rich region II, DBP_{II}), we performed *in vitro* assays with mammalian cells expressing DBP_{II} sequences which were homologous or not to those from the outbreak isolate. In non-immune individuals, the results of a 12-month follow-up period provided evidence that naturally acquired inhibitory antibodies to DBP_{II} are short-lived and biased towards a specific allele.

Keywords: allele-specific, antibody response, duffy binding protein, malaria, *Plasmodium vivax*

Accepted for publication 9 March 2009

Correspondence: L. H. Carvalho, Centro de

Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo

Cruz (FIOCRUZ), Malaria Laboratory, Av.

Augusto de Lima 1715, 30190-002, Belo

Horizonte, MG, Brazil.

E-mail: lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br

Introduction

The Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* (DBP) is a critical adhesion ligand that participates in merozoite invasion of human Duffy/Duffy antigen receptor for chemokines (DARC)-positive erythrocytes [1,2]. DBP belongs to a family of homologous Duffy binding-like erythrocyte binding proteins (DBL-EBP) located within the micronemes of *P. vivax* and *P. knowlesi* merozoites [3]. The functional binding domains of DBL-EBP lie in region II, and for *P. vivax* the critical binding residues have been mapped to a central 170-amino acid stretch that includes cysteines 5–8 [4–6]. The gene encoding the *P. vivax* DBP region II (DBP_{II}) is highly polymorphic, and this diversity varies geographically from region to region [7–13]. The pattern of excessive polymorphism is consistent with a high selection pressure on the DBP gene and suggests that allelic variation functions as a mechanism of immune evasion [14,15].

Invasive merozoites are believed to sequester microneme proteins until merozoites contact the target erythrocyte,

presumably as a mechanism to reduce exposure of DBP to immune inhibition [16]. Currently, available data on humoral immune responses to DBP in human populations demonstrate that anti-DBP antibodies increase with exposure to *P. vivax* [17–20], and this immune response includes antibody activity that blocks adherence of DBP_{II} to its receptor on erythrocytes [18,21]. The same antibodies that block the DBP_{II}-DARC interaction also inhibit *P. vivax* erythrocyte invasion [22], which is proof-of-concept that anti-PvDBP antibodies can inhibit merozoite invasion. Of importance, children residing in hyperendemic areas for *P. vivax* develop anti-DBP inhibitory antibodies that seem to confer protection against blood-stage infection [23].

As most studies on the DBP antibody response reported to date have been carried out in areas where malaria is highly endemic, there is a scarcity of data on the responses to exposure to a single infection and about the persistence of this antibody response in the absence of reinfection. An outbreak of *P. vivax* malaria, in a village located in a non-malarious area of Brazil, offered us an opportunity to

investigate the DBP immune response among individuals who had their first and brief exposure to malaria. In the outbreak area, we hypothesized that a first exposure to *P. vivax* malaria induces an anti-DBP antibody response that blocks the interaction between DBP and its receptor on erythrocyte. To analyse this neutralizing antibody response, we used an *in vitro* cytoadherence assay that uses the putative ligand domain of the DBP (region II, DBP_{II}) expressed on the surface of cultivated mammalian cells [18]. To investigate whether neutralizing antibodies recognize DBP_{II} in a strain-specific manner, we analysed polymorphisms within the critical binding motif of *P. vivax* DBP_{II} from the outbreak isolates, and performed inhibition of cytoadherence assays with DBP_{II} sequences which are homologous or not to that from the outbreak area. In this study, carried out with non-immune individuals, we provide evidence that naturally acquired neutralizing antibodies to DBP_{II} can be strain-specific and are relatively short-lived in the absence of reinfection.

Materials and methods

The *P. vivax* malaria outbreak

Between April and May 2003, 25 cases of *P. vivax* malaria were diagnosed for the first time in a small community, Souza, located 70 km from Belo Horizonte, Minas Gerais State, a non-endemic area of Brazil [24,25]. Malaria has never been reported in this area and the Brazilian endemic region, the Amazon area, is 2000 km away. According to the Minas Gerais Department of Health, the source of the infection was a man from the community who had returned from the Amazon, infected by *P. vivax*, in January 2003. The subsequent outbreak in Souza began in April 2003, and entomological surveys incriminated the vector *Anopheles darlingi* as responsible for local malaria transmission [24]. The first human malaria case detected in the outbreak area, named S14, remained at the hospital for about 10 days, until a malaria diagnosis could be established. Because malaria infection had never been reported in the outbreak area previously, the physicians failed to consider malaria on presentation of this patient. After the first case, all patients were treated promptly with chloroquine (1.5 g for 3 days) plus primaquine (30 mg daily for 7 days), and a second round of treatment was given in case of relapses and/or recrudescence (3-day course of chloroquine and 15-day course of primaquine). Control activities also included an active search for acute malaria by thick blood smears and outdoor/indoor spraying of residual insecticide (cypermethrine) [25]. The outbreak was considered of short duration (50–60 days), with the last malaria case diagnosed on 21 May 2003; since then, local/regional Departments of Health have maintained entomological and epidemiological surveillance of the area.

Anti-DBP response following single *P. vivax* infection

Table 1. Demographic, immunological and genetic data of individuals who had been enrolled in the study carried out in the *Plasmodium vivax* malaria outbreak area.

Characteristics	Cases (n = 15)	Non-cases (n = 18)
Age, years (mean ± s.d.) ^a	32 ± 13	34 ± 19
Antibody response, n (%) [†]		
MSP1-19	12 (80%)	0 (0%)
DBP _{II-IV}	3 (20%)	0 (0%)
DARC functional alleles, n (%) [‡]		
One (Fy ^{*A} or Fy ^{*B})	6 (40%)	6 (33%)
Two (Fy ^{*A} and/or Fy ^{*B})	9 (60%)	12 (67%)
None (Fy ^{*B^{ES}}) [§]	0	0

^aDifference not significant ($t = 0.02$, $P > 0.05$). [†]Number (%) of individuals with a positive antibody response at the time of first cross-sectional survey. [‡]The frequencies of individuals bearing the functional alleles Fy^{*A} and Fy^{*B} (Fy^{*A} and Fy^{*B} antigens on erythrocytes respectively) were similar between cases and non-cases ($P > 0.05$). [§]Homozygosity for the Fy^{*B^{ES}} (ES, erythroid silent) allele abrogates Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) antigen expression on the erythrocyte surface, and designates the DARC negative phenotype. DBP, Duffy binding protein; MSP, merozoite surface protein-1; s.d., standard deviation.

Volunteers and blood collection

Cross-sectional surveys were carried out after discussions with the community about the objectives of the project and its protocols. Individuals who had been infected with *P. vivax* were enrolled in the study if they met the following criteria: (i) informed written consent in accordance with guidelines for human research, as specified by the Brazilian National Council of Health (Resolution 196/96); (ii) residence in the outbreak area; (iii) a minimum age of 15 years; (iv) if women, an indicator of the absence of pregnancy; and (v) a willingness to remain in the outbreak area during the intervening year. As shown in Table 1, a total of 15 individuals met the inclusion criteria (aged 32 ± 13 years). We also included relatives and neighbours who were considered to be exposed to the risk of infection ($n = 18$; 34 ± 19 years). The latter group had had neither symptoms nor blood parasites by direct examination of Giemsa-stained thick smears. Of the 33 volunteers, 32 did not recall previous history of malaria, temporary residence in malaria-endemic areas or travel to the endemic area during their lifetime. A single volunteer with confirmed malaria in the outbreak area (S1) recalled previous malaria infection, temporary residence in the endemic (gold-mining) area, and travelling to the Amazon during the 6 months preceding the outbreak. We collected 5 ml blood samples (ethylenediamine tetraacetic acid) from all subjects. At the time of blood collection, Giemsa-stained thick blood smears were examined for parasites and nested polymerase chain reaction (PCR) assays for malaria diagnosis were conducted later in our laboratory. Blood samples were used to obtain plasma and for DNA preparation. Three, 6, 9 and 12

I. P. Ceravolo et al.

months after the first survey, four other identical cross-sectional surveys were carried out. The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Reports 002/2002 and 07/2006), according to the Resolution of the Brazilian Council on Health-CNS 196/96.

Microscopy and *Plasmodium* diagnosis by nested PCR

Well-trained microscopists examined 200 fields of Giemsa-stained thick blood smears. DNA was extracted from 300 μ l of individual whole-blood samples by using a genomic DNA purification kit (Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's protocol. Parasite species identification was performed by nested PCR amplification of the small subunit ribosomal RNA (18S SSU rRNA) genes, as described previously [26].

The DARC genotyping

Extracted DNA was used to detect the three common alleles at the *FY* locus – *FY*A*, *FY*B*, *FY*B³⁵* (*ES*, erythroid silent) – using real-time PCR with allele-specific primers, essentially as we have described recently [27].

Recombinant proteins and serological assay

Two recombinant *P. vivax* proteins were used to detect total immunoglobulin G (IgG) antibodies. The recombinant DBP, which includes amino acids 132–771 (regions II–IV, DBP_{II-IV}), was expressed as a soluble glutathione S transferase (GST) fusion protein of 140 kDa, as described previously [17,20]. The recombinant protein representing the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1 of *P. vivax* (MSP1-19), which represents amino acids 1616–1704 of the MSP1 of *P. vivax*, has been described elsewhere [28]. To assess IgG antibodies against DBP_{II-IV} and MSP1-19, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out, as described previously [20], with serum samples at 1 : 100. For the recombinant proteins DBP_{II-IV} (5 μ g/ml) and MSP1-19 (1 μ g/ml), the final optical density (OD) at 492 nm was calculated by subtracting the OD obtained with GST (antigen control). The results were expressed as an index of reactivity (IR = OD₄₉₂ values of test sample divided by the value of the cut-off). Cut-off points were set at three standard deviations above the mean OD₄₉₂ of sera from 30 individuals who had never been exposed to malaria. Values of IR > 1.0 were considered positive.

The *P. vivax* DBP_{II} amplification and sequencing

Extracted DNA was used as a template in the PCR to amplify the fragment corresponding to nucleotide positions 870–1545 (amino acids 290–515) of the DBP_{II}, as described previ-

ously [13]. Platinum high fidelity *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used in PCR to reduce possible nucleotide mis-incorporation. Amplicons were purified using the GFX-96 PCR kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and sequenced directly using DYEnamic™ ET dye terminator kit (Amersham Biosciences) and MegaBace 500 automated DNA sequencer (Amersham Biosciences). The sequences were analysed using Bioedit sequence alignment editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) to identify DBP_{II} polymorphisms relative to the SAL-1 sequence [29].

The DBP-pEGFP constructs

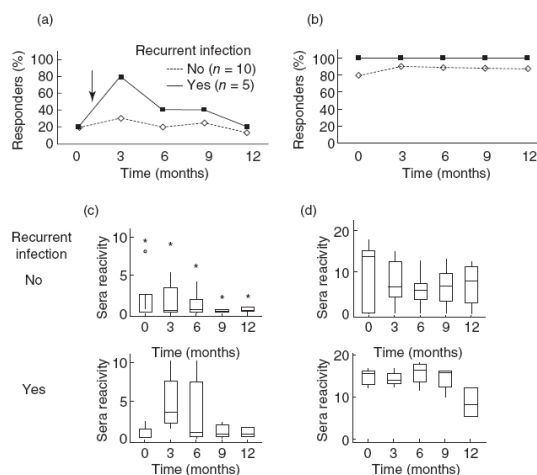
Region II of DBP (DBP_{II}) from a *P. vivax* laboratory reference clone (Sal-1) [29] has been subcloned previously into the pEGFP-N1 plasmid (Clontech, Mountain View, CA, USA), with a flanking signal sequence from the herpes simplex virus glycoprotein D1 (HSVgD1) [18]. This targets expression to the surface of the transfected COS cells as a green fluorescent protein (GFP) fusion protein. An additional GFP construct with the DBP_{II} sequence from the outbreak *P. vivax* isolate was made by subcloning a fragment corresponding to aa 198–522 of region II into pEGFP-HSVgD1 plasmid, using primers described previously [30]. Recombinant plasmids were purified by use of an endotoxin-free plasmid DNA purification system (Qiagen, Valencia, CA, USA).

COS cell transfection and erythrocyte-binding assays

Recombinant plasmids were transfected into COS-7 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) using lipofectamine and PLUS-reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocols. Briefly, COS-7 cells in six-well culture plates (1.5 \times 10⁶ cells/well) were transfected with plasmids (0.5 μ g/well)–liposome complexes (5% plus-reagent and 3% lipofectamine) in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma, St Louis, MO, USA) without serum. After 6 h of cell exposure to DNA-liposome complexes (37°C, 5% CO₂), transfection medium was replaced by DMEM with 10% of fetal bovine serum (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). At 24 h after transfection, the efficiency of transfection was assessed by fluorescence; the recombinant protein expression levels were similar between the Sal-1 and outbreak DBP_{II} variants (data not shown). Forty-eight hours after transfection, the erythrocyte-binding assays were performed as described previously [21]. For this, anti-serum was added at 1 : 20 (1 h at 37°C, 5% CO₂) followed by incubation with 10% of human O* erythrocytes suspension (2 h, room temperature). Unbound erythrocytes were removed by washing and binding was quantified by counting rosettes (10–20 fields, 200 \times). Positive rosettes were defined as adherent erythrocytes covering more than 50% of the cell surface.

Anti-DBP response following single *P. vivax* infection

Fig. 1. Antibody responses to Duffy binding protein (DBP_{II-IV}) (a,c) and merozoite surface protein-1 (MSP1-19) (b,d) among individuals who had confirmed *Plasmodium vivax* infection in the outbreak area, and developed ($n = 5$) or not ($n = 10$) recurrent *P. vivax* infections (↓) during the 12-month follow-up period. In (a) and (b), the percentage of responders to DBP_{II-IV} or MSP1-19, respectively, as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In (c) and (d), box-plot representations of sera reactivity to DBP_{II-IV} or MSP1-19 respectively; sera reactivity were expressed as index of reactivity (IR) at 492 nm, IR > 1 being considered positive. Box-plots: solid line across the box is the median, and the 25th and 75th percentiles were represented by the bottom and the top of each box respectively; the vertical lines represent the range, with outliers marked by asterisks (S14) or circle (S38).



For each assay, pooled plasma samples from Souza residents, characterized as non-responders by ELISA, were used as a negative control (100% binding). The percentage inhibition was calculated as $100 \times (Rc - Rt)/Rc$, where Rc is the average of the number of rosettes in the control wells and Rt is the average of the number of rosettes in the test wells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Epi-Info 2002 software (CDC, Atlanta, GA, USA) or MiniTab statistical software (Minitab Inc., State College, PA, USA). Differences in means were tested by Student's *t*-test or one-way analysis of variance. Differences in proportions were evaluated by Yates's χ^2 or Fisher's exact tests. *P*-values < 0.05 were considered significant.

Results

Antibody responses to DBP_{II-IV} and MSP1-19 at enrollment

Thirty-three individuals participated in the five cross-sectional surveys, 15 with previously confirmed *P. vivax* infection in the outbreak area (cases) and 18 who had not experienced malaria infection (non-cases). At the first cross-sectional survey, 20% (three of 15) of malaria cases had antibodies to DBP_{II-IV} (Table 1); in contrast, the MSP1-19 was recognized initially by 80% (12 of 15) of these individuals. The remaining 18 individuals (non-case) did

not develop a detectable antibody response against either anti-DBP_{II-IV} or anti-MSP1-19. Although 'resistance' to vivax malaria would result from the lack of DARC glycoprotein on red blood cells, none of the individuals studied were homozygous for the allele *FY*B^{ES}*. Therefore, we concluded that absence of DARC on RBCs was not responsible for refractoriness to *P. vivax* infection in this group (Table 1).

Relationship between malaria status and anti-DBP antibodies during a 12-month follow-up period

Although DBP was recognized initially by 20% of individuals who had had a *P. vivax* infection, a secondary boosting could be achieved with a new episode of malaria, making 80% into responders at this time (Fig. 1a). Nevertheless, in those individuals the frequency of responders decreased a few months after the clinical attack. By analysing the levels of anti-DBP antibodies during the 12-month follow-up, we observed a wide range of antibody responses among study participants (Fig. 1c), which made the difference between groups without statistical significance (recurrent *versus* no recurrent infection). Of interest, during the follow-up period, the levels of anti-DBP antibodies were relatively higher in a single individual (Fig. 1c, asterisk in each time-point of the follow-up); this result was not unexpected, because this patient (S14) remained at the hospital for about 10 days until a malaria diagnosis could be established. Despite individual variations, the levels of anti-DBP decreased markedly within the first 6 months of the follow-up.

I. P. Ceravolo et al.

Table 2. Variant amino acids in Duffy binding protein (DBP_{II}) from the *Plasmodium vivax* outbreak isolates, compared with the *P. vivax* laboratory reference clone Sal-1.

Isolate ^a	Codon position							
	371	384	385	386	417 ^b	424	437	503
Sal-1, reference clone	K	D	E	K	N	L	W	I
Outbreak								
Primary infection	E	G	K	N	K	I	R	K
Recurrent infection	E	G	K	N	K	I	R	K

^aSal-1 sequence, accession number: M61095; outbreak sequence, accession numbers: EU870443-EU870445. ^bGrey areas highlight polymorphisms in DBP_{II} that compromise efficiency of rabbit anti-DBP serum to inhibit DBP_{II}-Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) interaction [7]. Also, analysis of 122 Brazilian *P. vivax* isolates demonstrates that residues 417 and 424 form part of a cluster surrounding the DARC-binding site (Sousa & Brito, unpublished results).

Altogether, eight of 15 (53%) malaria cases developed anti-DBP antibodies during the follow-up period. The serological response to MSP1-19 was distinctly different (Fig. 1b). Regardless of the occurrence of a relapse and/or recrudescence, the MSP1-19 was a relatively highly immunogenic protein for most individuals who had malaria, with 14 of 15 (93%) positives for anti-MSP1-19 IgG antibodies. However, decreasing levels of antibody reactivity to MSP1-19 was more evident in the group who did not develop a recurrent *P. vivax* infection (Fig. 1d). No one from the uninfected group (non-cases) developed antibodies against either anti-DBP or anti-MSP1-19 (data not shown).

Because the antibody response against DBP decreased few months after the clinical attack, we also investigated antibodies against another *P. vivax* apical antigen and vaccine candidate, the apical membrane antigen-1 (AMA-1) [31]. Our results demonstrated that although the profile of AMA-1 immune response was similar to that obtained with DBP, AMA-1 appears to be more immunogenic, with 53% (eight of 15) of responders at the beginning of the study and with all individuals converting into responders at the time of a new episode of malaria (see *Supporting information*, Fig. S1). However, the frequencies as well as the levels of anti-AMA-1 antibodies were lower in those individuals who did not develop a recurrent *P. vivax* infection (see *Supporting information*, Fig. S1b).

The DBP_{II} polymorphisms and inhibitory activity of naturally acquired anti-DBP antibodies

To characterize the *P. vivax* isolates responsible for the malaria outbreak, we analysed DNA sequences from primary and recurrent infections and identified a single *dbp* allele in the outbreak area (Table 2). This allele differed, at multiple codons, from the *P. vivax* laboratory reference clone Sal-1, including differences in three polymorphic codons (417, 437 and 503) suggested to play a synergistic functional effect on DBP_{II} inhibitory binding [7].

To investigate the specificities of the anti-DBP outbreak plasmas to inhibit the erythrocyte-binding function of the protein, we performed erythrocyte-binding assays using

COS-7 cells expressing sequences of DBP_{II} which are identical or not to those of the outbreak isolate. Previously, this *in vitro* assay proved to be a suitable alternative tool for the live-cell invasion inhibition assay [22]. For that, plasma samples of those eight individuals who had developed conventional anti-DBP antibodies, at any time-point of the follow-up period, were tested for inhibition of DBP_{II}-DARC binding (Fig. 2). Three months after the first malaria attack, when the majority of responders were detected, seven of eight individuals had developed inhibitory antibodies against the homologous DBP_{II} sequence, while sera of two (S1 and S31) presented inhibitory activity against the heterologous sequence (Fig. 2a). Despite the occurrence of recurrent infections, most of these individuals lost their anti-DBP inhibitory antibody response within 6 months of follow-up. A single exception was an individual (S1) who had had previous malaria infection during frequent trips to the malaria-endemic area, and who developed inhibitory antibodies against homologous and heterologous DBP_{II} sequences. Beyond the frequency of response, the levels of inhibitory antibodies were also related to the DBP_{II} sequence; the greatest levels were observed with COS cells expressing the homologous DBP_{II} sequence, and no cross-reactivity could be detected at 1 : 40 sera dilution (Fig. 2b).

Discussion

Naturally occurring antibodies to DBP are prevalent in individuals living in areas where *vivax* malaria is endemic [17,19,20], and these antibodies can block the DBP_{II}-DARC interaction [18,21,23] and inhibit *P. vivax* erythrocyte invasion [22]. In previous studies, carried out in malaria-endemic areas, we and others have found strain-transcendent inhibitory responses to DBP_{II} [21,23]. However, those previous studies could not dismiss the possibility that DBP_{II} cross-variant inhibitory activity reflected only an accumulation of antibodies to strain-specific epitopes. Here, we have examined antibody responses of non-immune individuals after a brief initial malaria infection during a malaria outbreak outside the endemic area. Our study demonstrates that DBP has low immunogenicity

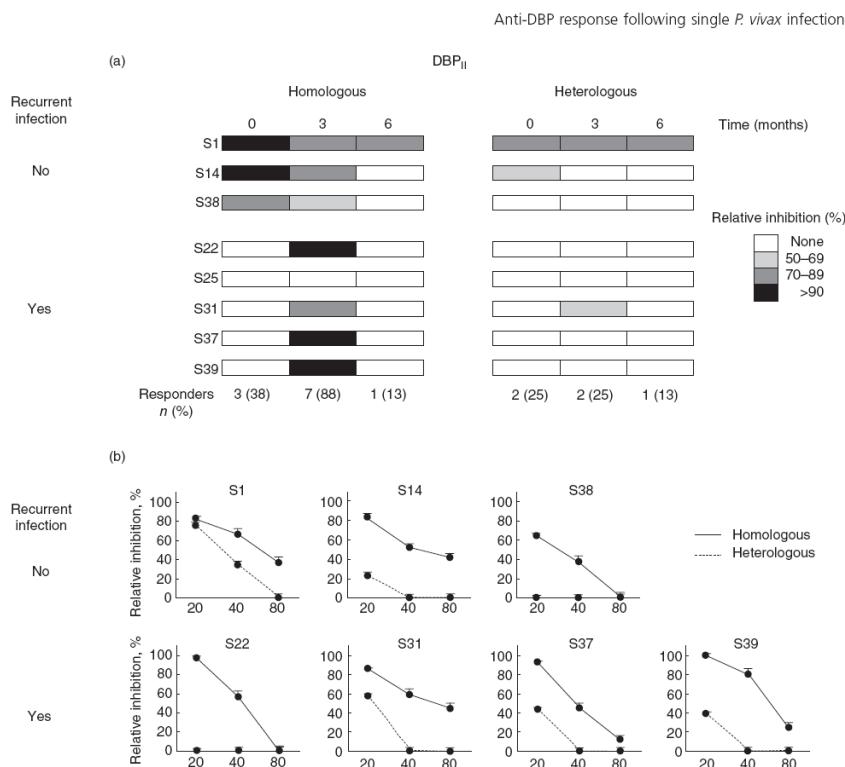


Fig. 2. Inhibition of Duffy binding protein–Duffy antigen receptor for chemokine (DBP_H–DARC) binding by outbreak plasma samples from eight individuals who developed conventional anti-DBP antibodies during the follow-up period. Erythrocyte binding assays were carried out with COS cells expressing the outbreak (homologous) or Sal-1 (heterologous) DBP_H sequences, and individual samples were grouped according to the occurrence (S22, S25, S31, S37, S39) or not (S1, S14, S38) of a recurrent *Plasmodium vivax* infection. (a) Results of each subject (at 1 : 20 plasma dilution), at enrollment (time zero), and 3 and 6 months later; values at the bottom of the figure represent the overall frequency of responders for each cross-sectional survey. (b) Titration of the inhibitory antibody responses against homologous or heterologous DBP_H sequences, using those seven positive samples from the second cross-sectional survey (3-month follow-up). The x-axis represents antibody titers.

and induces a short-term humoral immune response that is lost within 6 months of follow-up. In general, this profile of antibody response is similar to that detected to another apical *P. vivax* vaccine candidate, AMA-1, in which the ELISA positivity rates dropped during the first 9 months of follow-up (*Supporting information*). Nevertheless, during the follow-up period the frequencies of AMA-1 responders were usually higher than those obtained to DBP, especially among those individuals with recurrent *P. vivax* infections. The possibility that AMA-1 is more immunogenic than DBP could be explained by those findings demonstrating that AMA-1 is expressed in both pre-erythrocytic (sporozoite)

and erythrocytic (merozoite) stages of malaria parasites [32], while DBP is a merozoite-specific protein.

Of importance, single *P. vivax* exposure appears to induce an anti-DBP inhibitory response that is biased towards a specific DBP allele. The longevity of this DBP inhibitory antibody response is different from that observed among some asymptomatic children residing in a *P. vivax* hyperendemic area [23], in which the anti-DBP inhibitory antibody response was remarkably stable over the 12-month follow-up period. Together, these findings suggest that vaccines based on DBP_H should consider short-term antibody responses in non-immune individuals.

I. P. Ceravolo et al.

The poorer, unstable antibody responses against DBP during the outbreak follow-up period is in contrast to the stronger, stable response to MSP1-19, which is a much more abundant blood-stage molecule than DBP. Regardless of the presence of recurrent *P. vivax* infections, the frequency of responders to MSP1-19 was similar at all five time-points, albeit at a lower magnitude in those without recurrent *P. vivax* infections, as described previously [33]. This longer-term stability of antibodies against *P. vivax* MSP1 has been well documented [34,35], including its persistence for 30 years after malaria exposure [36]. In none of the study individuals did the absence of DARC on erythrocytes play a role in the anti-DBP or anti-MSP1-19 responses.

In the Souza community, where the outbreak occurred, the period of malaria transmission was short (approximately 50 days), being interrupted by treatment of all patients with anti-malarial drugs (chloroquine and primaquine) and the comprehensive spraying of residual insecticide [25]. Considering that the control intervention of the outbreak was so thorough, the origin of the second attack of *P. vivax* in five individuals, about 2 months after the first malaria episode, is unclear. Typically, these infections may have had two origins: (i) a recrudescence originating from asexual blood-stage parasites that survived drug treatment; or (ii) a relapse arising from the dormant liver stages, hypnozoites [37]. The recurrences for the *P. vivax* appear to be more probably relapses, as treatment regimens used in the outbreak area were effective in clearing parasitaemias and there was a long period until the blood-stage infections reappeared. To analyse whether the isolate causing the secondary attack was genetically different from the isolate of initial infections, we compared DNA sequences from primary and recurrent *P. vivax* infections. Molecular analysis demonstrated that a single *dbp* allele was detected in the outbreak area (GenBank Accession numbers: EU870443–EU870445). The *dbp* outbreak allele belongs to allelic family VII, one of the eight DBP_{II} variant families identified in a preliminary analysis of 40 *P. vivax* Brazilian isolates [13].

Although the activation of heterologous hypnozoite populations seems to be the most common cause of relapse in patients with vivax malaria [38,39], the presence of a single *dbp* outbreak allele is consistent with either a relapse or a recrudescence. In contrast to previous studies in Asia, the *P. vivax* transmission in the outbreak area originated from a single patient who had had a *P. vivax* relapse after returning from the Amazon area [24,25]. In fact, our results are similar to a previous study of *P. vivax* relapses in Brazil which demonstrated, using the MSP1 molecule as a genetic marker, that parasites from the primary attack were identical to those in relapses [40].

An important finding of our study is the discovery of how parasite genetic diversity relates to naturally acquired neutralizing antibodies against DBP. The results demonstrated that the phylogenetically distant Sal-1 variant was significantly less sensitive to immune inhibition of its DARC

binding activity than was the homologous effect against the DBP_{II} allele of the outbreak variant. Significant antibody cross-reactivity was observed in a single individual (S1), a result which was attributed to past cured infections in a gold-mine worker who had a history of previous malaria illnesses in a malaria-endemic area. Although it is not possible at this time to characterize the fine specificity of the inhibitory anti-DBP antibodies, these data demonstrate that variation in few polymorphic residues compromising the inhibitory efficacy of these antibodies. Further work will be necessary to identify the main epitopes recognized by naturally acquired antibodies to DBP in humans.

Altogether, our results indicate that polymorphisms change DBP antigenic character and can compromise immune inhibition, as suggested previously using rabbit immune sera [7]. Of importance, the outbreak and Sal-1 alleles do not share the trio of polymorphic residues (at codons 417, 437 and 503) shown to collectively alter sensitivity to inhibitory antibodies. Overall, these results point towards strain specificity in the natural immune response against DBP. Consistent with this hypothesis, the only individuals in the Amazon area who were observed previously to acquire anti-DBP antibodies that inhibit binding of different DBP_{II} variants to erythrocytes were people who had had long-term exposure [21]. Consequently, it is not surprising that only 9% of asymptomatic children residing in a *P. vivax* hyperendemic area had acquired a significant anti-DBP inhibitory antibody response that transcended strain-specificity [23].

Even though the current data demonstrate that individuals exposed briefly to *P. vivax* developed anti-DBP antibodies which exert a receptor-blocking effect, the magnitude of the inhibitory antibody response was very low compared with that from individuals with long-term exposure to malaria; in the outbreak area, inhibitory activity was achieved with immune sera diluted up to 1 : 80, whereas in the Amazon endemic area inhibitory antibodies could still be detected at a 1 : 1280 sera dilution [21]. It is possible that the low levels of immune response in the outbreak area could be due to the short and brief exposure to parasite blood stages. In fact, in this area, a secondary antibody boost was achieved with a recurrent *P. vivax* infection. Also, our previous data in the Amazon area indicate accumulative exposure to *P. vivax* as the strongest predictor of the presence of anti-DBP antibodies [21]. None the less, it is currently unclear how effective such natural antibody responses may be in preventing disease in this population. A long-term prospective study in a non-immune population is needed to determine the protective nature of the inhibitory anti-DBP_{II} antibodies in terms of anti-disease immunity.

Recently, it has been predicted that the hypervariable region of DBP_{II} is located on sites remote from the DARC binding site, implying that polymorphism cannot alter the capacity of the protein to bind DARC-positive erythrocytes [41,42]. Another line of evidence suggests that those few

polymorphic residues surrounding the DARC binding domain might elude binding of inhibitory antibody [7,16]. The second model seems to explain why antibodies to DBP can inhibit reticulocyte invasion by *P. vivax* effectively [22]. The results presented here provide strong evidence that the DARC and antibody binding sites have sufficient overlap for antibodies to inhibit binding and provide support for the role of allelic diversity in anti-DBP immune responses.

Acknowledgements

We thank Vania D. A. Cerbino (Minas Gerais Regional Department of Health) and other members of the local malaria control team from the Minas Gerais State Secretariat of Health and Sanitation for their logistic support in the fieldwork. This work is supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, PAPES IV (CNPq-400086/2006-9), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG-CBB-880/06). L. H. C. is supported by a research fellowship from CNPq.

References

- 1 Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol* 1989; **69**:340–50.
- 2 Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976; **295**:302–4.
- 3 Adams JH, Hudson DE, Torii M *et al.* The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 1990; **63**:141–53.
- 4 Ranjan A, Chitnis CE. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**:14067–72.
- 5 Singh SK, Singh AP, Pandey S, Yazdani SS, Chitnis CE, Sharma A. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. *Biochem J* 2003; **374**:193–8.
- 6 VanBuskirk KM, Sevova E, Adams JH. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:15754–9.
- 7 VanBuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M *et al.* Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J Infect Dis* 2004; **190**:1556–62.
- 8 Tsuboi T, Kappe SH, al-Yaman F, Prickett MD, Alpers M, Adams JH. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Infect Immun* 1994; **62**:5581–6.
- 9 Xainli J, Adams JH, King CL. The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol* 2000; **111**:253–60.

Anti-DBP response following single *P. vivax* infection

- 10 Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 2003; **127**:121–32.
- 11 Ampudia EM, Patarroyo A, Patarroyo ME, Murillo LA. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1996; **78**:269–72.
- 12 Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim DW, Chung WC. Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. *Korean J Parasitol* 2001; **39**:143–50.
- 13 Sousa TN, Ceravolo IP, Fontes CJF, Couto A, Carvalho LH, Brito CF. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol* 2006; **146**:251–4.
- 14 Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 2003; **127**:121–32.
- 15 Martinez P, Suarez CF, Cardenas PP, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: a modular evolutionary proposal. *Parasitology* 2004; **128**:353–66.
- 16 McHenry AM, Adams JH. The crystal structure of *P. knowlesi* DBPalpha DBL domain and its implications for immune evasion. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**:487–91.
- 17 Fraser T, Michon P, Barnwell JW *et al.* Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 1997; **65**:2772–7.
- 18 Michon P, Fraser T, Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 2000; **68**:3164–71.
- 19 Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M *et al.* Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 2003; **71**:2508–15.
- 20 Ceravolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM *et al.* Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005; **72**:675–81.
- 21 Ceravolo IP, Souza-Silva EA, Fontes CJ *et al.* Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol* 2008; **67**:270–8.
- 22 Grimberg BTR, Udomsangpetch J, Xainli A *et al.* *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med* 2007; **4**:e337.
- 23 King CL, Shakri AR, Marcotty A *et al.* Naturally acquired Duffy-binding protein protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**:8363–8.
- 24 Cerbino VDA, Zumpano JF, Leopoldo FL *et al.* Follow-up of control measures during the *P. vivax* malaria outbreak in Rio Manso, Minas Gerais. *Rev Bras Med Trop* 2004; **37**:269.
- 25 Zumpano JFR, Chaves MOC, Silva RB *et al.* Study of *P. vivax* malaria relapses in Sousa District, Rio Manso municipality, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Med Trop* 2004; **37**:267.
- 26 Snounou GS, Viriyakosol XP, Jarra ZW *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; **61**:315–20.
- 27 Sousa TN, Sanchez BA, Ceravolo IP, Carvalho LH, Brito CF. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for

I. P. Ceravolo et al.

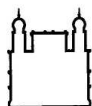
- genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. *Vox Sang* 2007; **92**:373–80.
- 28 Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine* 2001; **20**:385–96.
- 29 Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem. Parasitol* 1991; **44**:125–32.
- 30 Chitnis CE, Miller LH. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 1994; **180**:497–506.
- 31 Mufalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect* 2008; **10**:1266–73.
- 32 Florens L, Washburn MP, Raine JD et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002; **419**:520–6.
- 33 Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MCS et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; **102**:335–9.
- 34 Braga EM, Fontes CJ, Krettl AU. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis* 1998; **177**:1132–5.
- 35 Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettl AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res* 2005; **95**:420–6.
- 36 Lim KJ, Park JW, Yeom JS et al. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res* 2004; **92**:384–9.
- 37 Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin. Parasitol* 1989; **1**:1–19.
- 38 Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis* 2007; **195**:927–33.
- 39 Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis* 2007; **195**:934–41.
- 40 Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis* 1998; **177**:511–15.
- 41 Singh SK, Hora R, Belrhali H, Chitnis CE, Sharma A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature* 2006; **439**:741–4.
- 42 Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol* 2008; **24**:29–34.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Antibody responses to the apical membrane antigen-1 (AMA-1) among individuals who had confirmed *Plasmodium vivax* infection in the outbreak area, and developed ($n = 5$) or not ($n = 10$) recurrent *P. vivax* infections (\downarrow) during the 12-month follow-up period. (a) The percentage of responders to AMA-1, as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); (b) box-plot representations of sera reactivity; sera reactivity were expressed as index of reactivity (IR) at 492 nm, IR > 1 being considered positive. Box-plots: solid line across the box is the median, and the 25th and 75th percentiles were represented by the bottom and the top of each box respectively. The recombinant protein AMA-1 was produced as described previously [31].

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Dra. Cristiana Brito
Laboratório de Malária
Centro de Pesquisa René Rachou
Belo Horizonte, MG

O coordenador do projeto "Estudo da variabilidade genômica em isolados de *Plasmodium vivax* de diferentes regiões do Brasil" com parecer favorável nº 06/2004 pelo CEPESH-CPqRR em 29 de novembro de 2004, solicita parecer do Comitê sobre a extensão de projeto de pesquisa apresentado ao curso de Pós-Graduação do Centro de Pesquisa René Rachou da estudante Tais Nóbrega de Sousa, intitulado "Análise da variabilidade de duas proteínas do *Plasmodium vivax* candidatas à vacina antimalárica: a proteína de ligação ao antígeno Duffy e o antígeno apical de membrana 1".

Diante do exposto, adicionado a obediência aos critérios estabelecidos na resolução CNS 196/96, recomendamos a extensão ao projeto original.

Extensão do projeto: **APROVADO**

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2004.


Alyano José Romanha
Coordenador do CEPESH-CPqRR

Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ
Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel: (0055) (31) 3295-3566 (ramal 180) - Fax: (0055) (31) 3295-3115
e-mail: romanha@cpqrr.fiocruz.br

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J., HUDSON, D., TORII, M., WARD, G., WELLEMS, T., AIKAWA, M. and MILLER, L. (1990). The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*, 63, 141-153.
- ADAMS, J. H., SIM, B. K. L., DOLAN, S. A., FANG, X. D., KASLOW, D. C. and MILLER, L. H. (1992). A family of erythrocyte binding-proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 7085-7089.
- AMINO, R., THIBERGE, S., MARTIN, B., CELLI, S., SHORTE, S., FRISCHKNECHT, F. and MÉNARD, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*, 12, 220-224.
- AMPUDIA, E., PATARROYO, M. A., PATARROYO, M. E. and MURILLO, L. A. (1996). Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78, 269-272.
- ANDERSON, T., HAUBOLD, B., WILLIAMS, J., ESTRADA-FRANCO, J., RICHARDSON, L., MOLLINEDO, R., BOCKARIE, M., MOKILI, J., MHARAKURWA, S., FRENCH, N., WHITWORTH, J., VELEZ, I., BROCKMAN, A., NOSTEN, F., FERREIRA, M. and DAY, K. (2000). Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, 17, 1467-1482.
- AREVALO-HERRERA, M., CASTELLANOS, A., YAZDANI, S. S., SHAKRI, A. R., CHITNIS, C. E., DOMINIK, R. and HERRERA, S. (2005). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in Aotus monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 25-31.
- ATANAKA-SANTOS, M., CZERESNIA, D., SOUZA-SANTOS, R. and OLIVEIRA, R. (2006). Epidemiological trends of malaria in the State of Mato Grosso, from 1980 to 2003. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39, 187-192.
- AWADALLA, P. (2003). The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nat Rev Genet*, 4, 50-60.
- BAIRD, J. (2007). Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*, 23, 533-539.
- BARATA, R. (1995). Malaria in Brazil: trends in the last ten years. *Cad Saude Publica*, 11, 128-136.
- BARNWELL, J., GALINSKI, M. I. F., U and CRISANTI, A. (1998). Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Sherman, IW (ed. PRESS, A.), pp. 93-120.
- BARNWELL, J. and WERTHEIMER, S. (1989). *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog Clin Biol Res*, 313, 1-11.
- BARRET, J., FRY, B., MALLER, J. and DALY, M. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 263-265.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. A malária no Brasil. Brasília: MS/SVS/DTG, 2005. 18p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf> Acesso em: 30 novembro 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, ano de 2006. Brasília: MS/SVS/DTG, 2007. 2p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2007_web.pdf> Acesso em: 30 novembro 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, ano de 2007. Brasília: MS/SVS/DTG, 2008. 2p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf> Acesso em: 30 novembro 2008.
- BREMAN, J. and HOLLOWAY, C. (2007). Malaria surveillance counts. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 36-47.
- BURTON, A., DEAN, J. and DEAN, A. (1990). Software for data management and analysis in epidemiology. *World Health Forum*, 11, 75-77.
- CARDOSO, R. and GOLDENBERG, P. (2007). Malaria in Amapá State, Brazil, 1970-2003: background and control. *Cad Saude Publica*, 23, 1339-1348.
- CARLTON, J. (2003). The Plasmodium vivax genome sequencing project. *Trends Parasitol*, 19, 227-231.
- CARLTON, J., ADAMS, J., SILVA, J., BIDWELL, S., LORENZI, H., CALER, E., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S., MERINO, E., AMEDEO, P., CHENG, Q., COULSON, R., CRABB, B., DEL PORTILLO, H., ESSIEN, K., FELDBLYUM, T., FERNANDEZ-BECERRA, C., GILSON, P., GUEYE, A., GUO, X., KANG'A, S., KOOIJ, T., KORSINCZYK, M., MEYER, E., NENE, V., PAULSEN, I., WHITE, O., RALPH, S., REN, Q., SARGEANT, T., SALZBERG, S., STOECKERT, C., SULLIVAN, S., YAMAMOTO, M., HOFFMAN, S., WORTMAN, J., GARDNER, M., GALINSKI, M., BARNWELL, J. and FRASER-LIGGETT, C. (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. *Nature*, 455, 757-763.
- CARTER, R. (2003). Speculations on the origins of Plasmodium vivax malaria. *Trends Parasitol*, 19, 214-219.
- CASTILHO, L., RIOS, M., PELLEGRINO, J. J., SAAD, S., COSTA, F. and REID, M. (2004). A novel FY allele in Brazilians. *Vox Sang*, 87, 190-195.
- CAVASINI, C., TARELHO PEREIRA, F., RIBEIRO, W., WUNDERLICH, G. and FERREIRA, M. (2001). Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34, 591-595.
- CAVASINI, C. E., DE MATTOS, L. C., COUTO, A. A. D., BONINI-OMINGOS, C. R., VALENCIA, S. H., NEIRAS, W. C. D., ALVES, R. T., ROSSIT, A. R. B., CASTILHO, L. and MACHADO, R. L. D. (2007). Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 1042-1044.
- CERAVOLO, I. P., BRUNA-ROMERO, O., BRAGA, E. M., FONTES, C. J., BRITO, C. F., SOUZA, J. M., KRETTLI, A. U., ADAMS, J. H. and CARVALHO, L. H. (2005). Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 675-681.

- CERAVOLO, I. P., SOUZA-SILVA, F. A., FONTES, C. J., BRAGA, E. M., MADUREIRA, A. P., KRETTLI, A. U., SOUZA, J. M., BRITO, C. F., ADAMS, J. H. and CARVALHO, L. H. (2008). Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol*, 67, 270-278.
- CERBINO, V. D. A. Z., J.F.; LEOPOLDO, F.L.; OLIVEIRA, V.M.R.; HENEIDE, R.A.D; CHAVES, K.M.; ROCHA, M.O.C.; DAYRELL, M.; NOBI, R.C.A. (2004). Evolução e controle do surto de malária por *P. vivax* em Rio Manso, Minas Gerais. *Rev. Bras. Med. Trop.*, 37, 269.
- CHAUDHURI, A., POLYAKOVA, J., ZBRZEZNA, V. and POGO, A. (1995). The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood*, 85, 615-621.
- CHAUDHURI, A., POLYAKOVA, J., ZBRZEZNA, V., WILLIAMS, K., GULATI, S. and POGO, A. (1993). Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10793-10797.
- CHAUDHURI, A., ZBRZEZNA, V., JOHNSON, C., NICHOLS, M., RUBINSTEIN, P., MARSH, W. and POGO, A. (1989). Purification and characterization of an erythrocyte membrane protein complex carrying Duffy blood group antigenicity. Possible receptor for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* malaria parasite. *J Biol Chem*, 264, 13770-13774.
- CHITNIS, C., CHAUDHURI, A., HORUK, R., POGO, A. and MILLER, L. (1996). The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med*, 184, 1531-1536.
- CHITNIS, C. and SHARMA, A. (2008). Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol*, 24, 29-34.
- CHITNIS, C. E. and MILLER, L. H. (1994). Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med*, 180, 497-506.
- CHOE, H., MOORE, M., OWENS, C., WRIGHT, P., VASILIEVA, N., LI, W., SINGH, A., SHAKRI, R., CHITNIS, C. and FARZAN, M. (2005). Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Mol Microbiol*, 55, 1413-1422.
- COLE-TOBIAN, J. and KING, C. L. (2003). Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127, 121-132.
- COLE-TOBIAN, J. L., CORTES, A., BAISOR, M., KASTENS, W., JIA, X. L., BOCKARIE, M., ADAMS, J. H. and KING, C. L. (2002). Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the Duffy binding protein. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 531-539.
- CORNEJO, O. and ESCALANTE, A. (2006). The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*, 22, 558-563.
- COWMAN, A. and CRABB, B. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124, 755-766.

- CUI, L., ESCALANTE, A., IMWONG, M. and SNOUNOU, G. (2003). The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol*, 19, 220-226.
- DE SOUZA-NEIRAS, W. C., DE MELO, L. M. S. and MACHADO, R. L. D. (2007). The genetic diversity of *Plasmodium vivax* - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 245-254.
- LANGHI, D.M., ALBUQUERQUE, S., COVAS, D.T., PEREZ, C.A. and BORDIN, J.O. (2004a). The presence of FYA null allele in inhabitants of an endemic region and in blood donors from Brazil. *Rev Bras Hemat Hemot*, 26, 268-269.
- LANGHI, D.M., ALBUQUERQUE, S., COVAS, D.T., PEREZ, C.A. and BORDIN, J.O. (2004b). The Presence of FYAnull Alele of Duffy Blood Group System in Blood Donors and Individuals from a Malarial Endemic Region of Brazil. In *ASTMH Annual Meeting*, Vol. Poster Session 927-II (ed. 927-II, P. S.).
- DUARTE, E. and FONTES, C. (2002). Association between reported annual gold mining extraction and incidence of malaria in Mato Grosso-Brazil, 1985-1996. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35, 665-668.
- DURASINGH, M., TRIGLIA, T., RALPH, S., RAYNER, J., BARNWELL, J., MCFADDEN, G. and COWMAN, A. (2003). Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*, 22, 1047-1057.
- ESCALANTE, A., CORNEJO, O., FREELAND, D., POE, A., DURREGO, E., COLLINS, W. and LAL, A. (2005). A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1980-1985.
- ESCALANTE, A., CORNEJO, O., ROJAS, A., UDHAYAKUMAR, V. and LAL, A. (2004). Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. *Trends Parasitol*, 20, 388-395.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. and SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- FANG, X., KASLOW, D., ADAMS, J. and MILLER, L. (1991). Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol*, 44, 125-132.
- FENG, X. R., CARLTON, J. M., JOY, D. A., MU, J. B., FURUYA, T., SUH, B. B., WANG, Y. F., BARNWELL, J. W. and SU, X. Z. (2003). Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8502-8507.
- FERREIRA GONÇALVES, M. and ALECRIM, W. (2004). Non-planned urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 6, 156-166.
- FERREIRA, M. and HARTL, D. (2007). *Plasmodium falciparum*: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol*, 115, 32-40.
- FERREIRA, M. U., KARUNAWEEERA, N. D., DA SILVA-NUNES, M., DA SILVA, N. S., WIRTH, D. F. and HARTL, D. L. (2007a). Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural amazonia. *Journal of Infectious Diseases*, 195, 1218-1226.

- FERREIRA, M. U., ZILVERSMIT, M. and WUNDERLICH, G. (2007b). Origins and evolution of antigenic diversity in malaria parasites. *Current Molecular Medicine*, 7, 588-602.
- FRASER, T., MICHON, P., BARNWELL, J. W., NOE, A. R., AL-YAMAN, F., KASLOW, D. C. and ADAMS, J. H. (1997). Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun*, 65, 2772-2777.
- GALINSKI, M. and BARNWELL, J. (1996). *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol Today*, 12, 20-29.
- GALINSKI, M., MEDINA, C., INGRAVALLO, P. and BARNWELL, J. (1992). A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell*, 69, 1213-1226.
- GAUR, D., MAYER, D. and MILLER, L. (2004). Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol*, 34, 1413-1429.
- GAUTHIER, C. and TIBAYRENC, M. (2005). Population structure of malaria parasites: the driving epidemiological forces. *Acta Trop*, 94, 241-250.
- GENTON, B., D'ACREMONT, V., RARE, L., BAEA, K., REEDER, J., ALPERS, M. and MÜLLER, I. (2008). *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*, 5, e127.
- GOSI, P., KHUSMITH, S., KHALAMBAHETI, T., LANAR, D., SCHAECHER, K., FUKUDA, M. and MILLER, S. (2008). Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. *Malar J*, 7, 112.
- GREENWOOD, B., BOJANG, K., WHITTY, C. and TARGETT, G. (2005). Malaria. *Lancet*, 365, 1487-1498.
- GREENWOOD, B. M., FIDOCK, D. A., KYLE, D. E., KAPPE, S. H. I., ALONSO, P. L., COLLINS, F. H. and DUFFY, P. E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 1266-1276.
- GRIMBERG, B. T., UDOMSANGPETCH, R., XAINLI, J., MCHENRY, A., PANICHAKUL, T., SATTABONGKOT, J., CUI, L., BOCKARIE, M., CHITNIS, C., ADAMS, J., ZIMMERMAN, P. A. and KING, C. L. (2007). *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *Plos Medicine*, 4, 1940-1948.
- GUERRA, C., GIKANDI, P., TATEM, A., NOOR, A., SMITH, D., HAY, S. and SNOW, R. (2008). The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med*, 5, e38.
- GUNASEKERA, A. M., WICKRAMARACHCHI, T., NEAFSEY, D. E., GANGULI, I., PERERA, L., PREMARATNE, P. H., HARTL, D., HANDUNNETTI, S. M., UDAGAMARANDENIYA, P. V. and WIRTH, D. F. (2007). Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 939-947.
- HADLEY, T. and PEIPER, S. (1997). From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*, 89, 3077-3091.

- HALL, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- HANS, D., PATTAIAK, P., BHATTACHARYYA, A., SHAKRI, A. R., YAZDANI, S. S., SHARMA, M., CHOE, H., FARZAN, M. and CHITNIS, C. E. (2005). Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Molecular Microbiology*, 55, 1423-1434.
- HAY, S., GUERRA, C., TATEM, A., NOOR, A. and SNOW, R. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*, 4, 327-336.
- HELLENTHAL, G. and STEPHENS, M. (2006). Insights into recombination from population genetic variation. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 565-572.
- HORUK, R., CHITNIS, C., DARBONNE, W., COLBY, T., RYBICKI, A., HADLEY, T. and MILLER, L. (1993a). A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*, 261, 1182-1184.
- HOWELL, D., SAMUDRALA, R. and SMITH, J. (2006). Disguising itself--insights into *Plasmodium falciparum* binding and immune evasion from the DBL crystal structure. *Mol Biochem Parasitol*, 148, 1-9.
- HUANG, X. (1992). A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*, 14, 18-25.
- IMWONG, M., NAIR, S., PUKRITTAYAKAMEE, S., SUDIMACK, D., WILLIAMS, J. T., MAYXAY, M., NEWTON, P. N., KIM, J. R., NANDY, A., OSORIO, L., CARLTON, J. M., WHITE, N. J., DAY, N. P. J. and ANDERSON, T. J. C. (2007). Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and south America. *International Journal for Parasitology*, 37, 1013-1022.
- IMWONG, M., SUDIMACK, D., PUKRITTAYAKAMEE, S., OSORIO, L., CARLTON, J. M., DAY, N. P. J., WHITE, N. J. and ANDERSON, T. J. C. (2006). Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1116-1018.
- IWAMOTO, S., OMI, T., KAJII, E. and IKEMOTO, S. (1995). Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood*, 85, 622-626.
- JONGWUTIWES, S., PUTAPORNTIP, C., IWASAKI, T., FERREIRA, M., KANBARA, H. and HUGHES, A. (2005). Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol*, 22, 1733-1739.
- KARUNAWEEERA, N. D., FERREIRA, M. U., MUNASINGHE, A., BARNWELL, J. W., COLLINS, W. E., KING, C. L., KAWAMOTO, F., HARTL, D. L. and WIRTH, D. F. (2008). Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*, 410, 105-112.
- KASEHAGEN, L., MUELLER, I., KINIBORO, B., BOCKARIE, M., REEDER, J., KAZURA, J., KASTENS, W., MCNAMARA, D., KING, C., WHALEN, C. and ZIMMERMAN, P. (2007). Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes. *PLoS ONE*, 2, e336.
- KHO, W., CHUNG, J., SIM, E., KIM, D. and CHUNG, W. (2001). Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. *Korean J Parasitol*, 39, 143-150.

- KILLMANN, S. (1964). On the size of normal human reticulocytes. *Acta Med Scand*, 176, 529-533.
- KING, C., MICHON, P., SHAKRI, A., MARCOTTY, A., STANISIC, D., ZIMMERMAN, P., COLE-TOBIAN, J., MUELLER, I. and CHITNIS, C. (2008). Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8363-8368.
- LASKOWSKI, R., MACARTHUR, M., MOSS, D. and THORNTON, J. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 26, 283-291.
- LI, J., COLLINS, W. E., WIRTZ, R. A., RATHORE, D., LAL, A. and MCCUTCHAN, T. F. (2001). Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 35-42.
- LI, N. and STEPHENS, M. (2003). Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. *Genetics*, 165, 2213-2233.
- MACHADO, R., POVOA, M., CALVOSA, V., FERREIRA, M., ROSSIT, A., DOS SANTOS, E. and CONWAY, D. (2004). Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis*, 190, 1547-1555.
- MALLINSON, G., SOO, K., SCHALL, T., PISACKA, M. and ANSTEE, D. (1995). Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol*, 90, 823-829.
- MARQUES, A., PINHEIRO, E. and DE SOUZA, A. (1986). Dispersion of cases of malaria in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 38, 51-75.
- MARTINEZ, O., SUAREZ, C. F., CARDENAS, P. P. and PATARROYO, M. A. (2004). *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: a modular evolutionary proposal. *Parasitology*, 128, 353-366.
- MAYER, D., MU, J., FENG, X., SU, X. and MILLER, L. (2002). Polymorphism in a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand changes its receptor specificity. *J Exp Med*, 196, 1523-1528.
- MAYER, D., MU, J., KANEKO, O., DUAN, J., SU, X. and MILLER, L. (2004). Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand JESEBL/EBA-181 alters its receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2518-2523.
- MCHENRY, A. M. and ADAMS, J. H. (2006). The crystal structure of *P. knowlesi* DBP alpha DBL domain and its implications for immune evasion. *Trends in Biochemical Sciences*, 31, 487-491.
- MENDIS, K., SINA, B. J., MARCHESINI, P. and CARTER, R. (2001). The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64, 97-106.
- MICHON, P., FRASER, T. and ADAMS, J. H. (2000). Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*, 68, 3164-3171.

- MICHON, P., WOOLLEY, I., WOOD, E., KASTENS, W., ZIMMERMAN, P. and ADAMS, J. (2001). Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett*, 495, 111-114.
- MICHON, P. A., AREVALO-HERRERA, M., FRASER, T., HERRERA, S. and ADAMS, J. H. (1998). Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 597-599.
- MILLER, L. (1989). Malaria. Binding of infected red cells. *Nature*, 341, 18.
- MILLER, L., MASON, S., CLYDE, D. and MCGINNISS, M. (1976). The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*, 295, 302-304.
- MILLER, L., MASON, S., DVORAK, J., MCGINNISS, M. and ROTHMAN, I. (1975). Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*, 189, 561-563.
- MONS, B. (1990). Preferential invasion of malarial merozoites into young red blood cells. *Blood Cells*, 16, 299-312.
- MORENO, A., CARO-AGUILAR, I., YAZDANI, S., SHAKRI, A., LAPP, S., STROBERT, E., MCCLURE, H., CHITNIS, C. and GALINSKI, M. (2008). Preclinical assessment of the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. *Vaccine*, 26, 4338-4344.
- MOTA, M., HAFALLA, J. and RODRIGUEZ, A. (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*, 8, 1318-1322.
- MOTA, M., PRADEL, G., VANDERBERG, J., HAFALLA, J., FREVERT, U., NUSSENZWEIG, R., NUSSENZWEIG, V. and RODRÍGUEZ, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291, 141-144.
- MU, J., AWADALLA, P., DUAN, J., MCGEE, K., JOY, D., MCVEAN, G. and SU, X. (2005a). Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*, 3, e335.
- MU, J., AWADALLA, P., DUAN, J., MCGEE, K., KEEBLER, J., SEYDEL, K., MCVEAN, G. and SU, X. (2007). Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet*, 39, 126-130.
- MU, J., JOY, D., DUAN, J., HUANG, Y., CARLTON, J., WALKER, J., BARNWELL, J., BEERLI, P., CHARLESTON, M., PYBUS, O. and SU, X. (2005b). Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol Biol Evol*, 22, 1686-1693.
- MZILAHOWA, T., MCCALL, P. and HASTINGS, I. (2007). "Sexual" population structure and genetics of the malaria agent *P. falciparum*. *PLoS ONE*, 2, e613.
- NEI, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*, New York.
- NEI, M. and KUMAR, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, New York.
- OH, S. and CHISHTI, A. (2005). Host receptors in malaria merozoite invasion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 295, 203-232.
- OHTA, T. (1996). The current significance and standing of neutral and neutral theories. *Bioessays*, 18, 673-677; discussion 683.

- OLSSON, M., SMYTHE, J., HANSSON, C., POOLE, J., MALLINSON, G., JONES, J., AVENT, N. and DANIELS, G. (1998). The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol*, 103, 1184-1191.
- OMI, T., IWAMOTO, S. and KAJII, E. (1997). Identification of the truncated Duffy mRNAs in erythroid cells. *Int J Hematol*, 66, 153-158.
- ORD, R., TAMI, A. and SUTHERLAND, C. (2008). *ama1* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS ONE*, 3, e3366.
- ORLANDI, P., KLOTZ, F. and HAYNES, J. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(α 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *J Cell Biol*, 116, 901-909.
- PASVOL, G., WEATHERALL, D. and WILSON, R. (1980). The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol*, 45, 285-295.
- PRUDÊNCIO, M., RODRIGUEZ, A. and MOTA, M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 4, 849-856.
- PRUENSTER, M., MUDDE, L., BOMBOSI, P., DIMITROVA, S., ZSAK, M., MIDDLETON, J., RICHMOND, A., GRAHAM, G., SEGERER, S., NIBBS, R. and ROT, A. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol*, 10, 101-108.
- PRUENSTER, M. and ROT, A. (2006). Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans*, 34, 1005-1008.
- PUTAPORNTIP, C., JONGWUTIWES, S., IWASAKI, T., KANBARA, H. and HUGHES, A. L. (2006). Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146, 105-108.
- RANJAN, A. and CHITNIS, C. (1999). Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14067-14072.
- RAYNER, J., VARGAS-SERRATO, E., HUBER, C., GALINSKI, M. and BARNWELL, J. (2001). A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med*, 194, 1571-1581.
- RIOS, M., CHAUDHURI, A., MALLINSON, G., SAUSAIS, L., GOMENSORO-GARCIA, A., HANNON, J., ROSENBERGER, S., POOLE, J., BURGESS, G., POGO, O. and REID, M. (2000). New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. *Br J Haematol*, 108, 448-454.
- ROGERSON, S. and CARTER, R. (2008). Severe vivax malaria: newly recognised or rediscovered. *PLoS Med*, 5, e136.
- ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J., MESSEGUER, X. and ROZAS, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.

- RYAN, J. R., STOUTE, J. A., AMON, J., DUNTON, R. F., MTALIB, R., KOROS, J., OWOUR, B., LUCKHART, S., WIRTZ, R. A., BARNWELL, J. W. and ROSENBERG, R. (2006). Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 575-581.
- SAITOU, N. and NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406-425.
- SALI, A. and BLUNDELL, T. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 234, 779-815.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- SANTOS-CIMINERA, P.D., 2005. Molecular Epidemiology of Epidemic Severe Malaria caused by *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil, p. 309. Doctoral Thesis, Uniformed Services University of the Health Sciences. Bethesda, MD, USA.
- SANTOS-CIMINERA, P., ALECRIM, M., ROBERTS, D. and QUINNAN, G. J. (2007). Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil. *Acta Trop*, 102, 38-46.
- SARAVIA, C., MARTINEZ, P., GRANADOS, D., LOPEZ, C., REYES, C. and PATARROYO, M. (2008). Identification and evaluation of universal epitopes in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 1279-1283.
- SIM, B., CHITNIS, C., WASNIEWSKA, K., HADLEY, T. and MILLER, L. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, 264, 1941-1944.
- SINDEN, R. (2002). Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol*, 4, 713-724.
- SINGH, A., OZWARA, H., KOCKEN, C., PURI, S., THOMAS, A. and CHITNIS, C. (2005). Targeted deletion of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during invasion. *Mol Microbiol*, 55, 1925-1934.
- SINGH, H. and RAGHAVA, G. (2001). ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*, 17, 1236-1237.
- SINGH, S., HORA, R., BELRHALI, H., CHITNIS, C. and SHARMA, A. (2006). Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*, 439, 741-744.
- STUBBS, J., SIMPSON, K., TRIGLIA, T., PLOUFFE, D., TONKIN, C., DURAISINGH, M., MAIER, A., WINZELER, E. and COWMAN, A. (2005). Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*, 309, 1384-1387.
- STUMPF, M. and MCVEAN, G. (2003). Estimating recombination rates from population-genetic data. *Nat Rev Genet*, 4, 959-968.
- STURM, A., AMINO, R., VAN DE SAND, C., REGEN, T., RETZLAFF, S., RENNENBERG, A., KRUEGER, A., POLLOK, J., MENARD, R. and HEUSSLER, V. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290.

- STURNIOLO, T., BONO, E., DING, J., RADDRIZZANI, L., TUERECI, O., SAHIN, U., BRAXENTHALER, M., GALLAZZI, F., PROTTI, M., SINIGAGLIA, F. and HAMMER, J. (1999). Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol*, 17, 555-561.
- SUH, I. B., HOFFMAN, K. J., KIM, S. H., SONG, K. J., SONG, J. W., LEE, J. S. and LIM, C. S. (2001). The analysis of *Plasmodium vivax* Duffy receptor binding domain gene sequence from resurgent Korea isolates. *Parasitology Research*, 87, 1007-1010.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24, 1596-1599.
- TAUIL, P. (1986). Comments of the epidemiology and control of malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81, 39-41.
- THOMPSON, J., HIGGINS, D. and GIBSON, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-4680.
- THOMPSON, J., TRIGLIA, T., REED, M. and COWMAN, A. (2001). A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Mol Microbiol*, 41, 47-58.
- TJITRA, E., ANSTEY, N., SUGIARTO, P., WARIKAR, N., KENANGALEM, E., KARYANA, M., LAMPAH, D. and PRICE, R. (2008). Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*, 5, e128.
- TODRYK, S. and HILL, A. (2007). Malaria vaccines: the stage we are at. *Nat Rev Microbiol*, 5, 487-489.
- TOLIA, N., ENEMARK, E., SIM, B. and JOSHUA-TOR, L. (2005). Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 122, 183-193.
- TOURNAMILLE, C., COLIN, Y., CARTRON, J. P. and LEVANKIM, C. (1995a). Disruption of a gata motif in the duffy gene promoter abolishes erythroid gene-expression in duffy negative individuals. *Nature Genetics*, 10, 224-228.
- TOURNAMILLE, C., FILIPE, A., BADAUT, C., RIOTTOT, M., LONGACRE, S., CARTRON, J., LE VAN KIM, C. and COLIN, Y. (2005). Fine mapping of the Duffy antigen binding site for the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Mol Biochem Parasitol*, 144, 100-103.
- TOURNAMILLE, C., FILIPE, A., WASNIOWSKA, K., GANE, P., LISOWSKA, E., CARTRON, J., COLIN, Y. and LE VAN KIM, C. (2003). Structure-function analysis of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of antibody and chemokine binding sites. *Br J Haematol*, 122, 1014-1023.
- TOURNAMILLE, C., LE VAN KIM, C., GANE, P., BLANCHARD, D., PROUDFOOT, A., CARTRON, J. and COLIN, Y. (1997). Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding. *J Biol Chem*, 272, 16274-16280.

- TOURNAMILLE, C., LE VAN KIM, C., GANE, P., CARTRON, J. and COLIN, Y. (1995b). Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum Genet*, 95, 407-410.
- TOURNAMILLE, C., LE VAN KIM, C., GANE, P., LE PENNEC, P., ROUBINET, F., BABINET, J., CARTRON, J. and COLIN, Y. (1998). Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood*, 92, 2147-2156.
- TRAN, T. M., OLIVEIRA-FERREIRA, J., MORENO, A., SANTOS, F., YAZDANI, S. S., CHITNIS, C. E., ALTMAN, J. D., MEYER, E. V. S., BARNWELL, J. W. and GALINSKI, M. R. (2005). Comparison of IgG reactivities to Plasmodium vivax merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 244-255.
- TRIGLIA, T., DURASINGH, M., GOOD, R. and COWMAN, A. (2005). Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 55, 162-174.
- TRIGLIA, T., THOMPSON, J., CARUANA, S., DELORENZI, M., SPEED, T. and COWMAN, A. (2001). Identification of proteins from Plasmodium falciparum that are homologous to reticulocyte binding proteins in Plasmodium vivax. *Infect Immun*, 69, 1084-1092.
- TSUBOI, T., KAPPE, S. H., AL-YAMAN, F., PRICKETT, M. D., ALPERS, M. and ADAMS, J. H. (1994). Natural variation within the principal adhesion domain of the Plasmodium vivax duffy binding protein. *Infect Immun*, 62, 5581-5586.
- VANBUSKIRK, K. M., COLE-TOBIAN, J. L., BAISOR, M., SEVOVA, E. S., BOCKARIE, M., KING, C. L. and ADAMS, J. H. (2004a). Antigenic drift in the ligand domain of Plasmodium vivax Duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *Journal of Infectious Diseases*, 190, 1556-1562.
- VANBUSKIRK, K. M., SEVOVA, E. and ADAMS, J. H. (2004b). Conserved residues in the Plasmodium vivax Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15754-15759.
- VANDERBERG, J. and FREVERT, U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol*, 34, 991-996.
- VERRA, F., CHOKEJINDACHAI, W., WEEDALL, G., POLLEY, S., MWANGI, T., MARSH, K. and CONWAY, D. (2006). Contrasting signatures of selection on the Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen gene family. *Mol Biochem Parasitol*, 149, 182-190.
- WERTHEIMER, S. P. and BARNWELL, J. W. (1989). Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*, 69, 340-350.
- WHO (2008). World Health Organization, World Malaria Report 2008. (ed. Who Press, W. H. O.), Geneva.
- WIJEYSAKERE, S., RICHARDSON, R. and STUCKEY, J. (2007). Modeling the tertiary structure of the patatin domain of neuropathy target esterase. *Protein J*, 26, 165-172.

- WILSON, D., FALUSH, D. and MCVEAN, G. (2005). Germs, genomes and genealogies. *Trends Ecol Evol*, 20, 39-45.
- WILSON, D. and MCVEAN, G. (2006). Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics*, 172, 1411-1425.
- WOOLLEY, I., HOTMIRE, K., SRAMKOSKI, R., ZIMMERMAN, P. and KAZURA, J. (2000). Differential expression of the duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion*, 40, 949-953.
- XAINLI, J., ADAMS, J. and KING, C. (2000). The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol*, 111, 253-260.
- XAINLI, J., BAISOR, M., KASTENS, W., BOCKARIE, M., ADAMS, J. and KING, C. (2002). Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *J Immunol*, 169, 3200-3207.
- XAINLI, J., COLE-TOBIAN, J. L., BAISOR, M., KASTENS, W., BOCKARIE, M., YAZDANI, S. S., CHITNIS, C. E., ADAMS, J. H. and KING, C. L. (2003). Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*, 71, 2508-2515.
- YAMAUCHI, L., COPPI, A., SNOUNOU, G. and SINNIS, P. (2007). *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 9, 1215-1222.
- YAZDANBAKHSH, K., RIOS, M., STORRY, J., KOSOWER, N., PARASOL, N., CHAUDHURI, A. and REID, M. (2000). Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens. *Transfusion*, 40, 310-320.
- YAZDANI, S., SHAKRI, A., MUKHERJEE, P., BANIWAL, S. and CHITNIS, C. (2004). Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Vaccine*, 22, 3727-3737.
- ZIMMERMAN, P., WOOLLEY, I., MASINDE, G., MILLER, S., MCNAMARA, D., HAZLETT, F., MGONE, C., ALPERS, M., GENTON, B., BOATIN, B. and KAZURA, J. (1999). Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13973-13977
- ZUMPARO, J. F. R., M.O.C.; CHAVES, K.M.; SILVA, R.B.; FREITAS, R.C.; BETTI, M.H.; HENEIDE, R.A.D.; CERBINO, V.D.A. (2004). Estudo das recaídas no surto de malária por *Plasmodium vivax* no distrito de Sousa, município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Med. Trop.*, 37, 267.