

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ



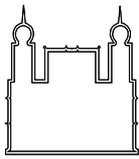
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou

**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização Imunológica e Molecular da
Duffy Binding Protein do *Plasmodium vivax*
em Áreas de Transmissão de Malária da
Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira**

ISABELA PENNA CERÁVOLO

**Belo Horizonte
junho/ 2007**



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou

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

Caracterização Imunológica e Molecular da
Duffy Binding Protein* do *Plasmodium vivax
em Áreas de Transmissão de Malária da
Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira

Isabela Penna Cerávolo

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de
Doutor em Ciências na área de concentração de
Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Co-orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte
junho/ 2007

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

C411 Cerávolo, Isabela Penna
2007

Caracterização Imunológica e Molecular da *Duffy Binding Protein* do *Plasmodium vivax* em Áreas de Transmissão de Malária da Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira / Isabela Penna Cerávolo - Belo Horizonte, 2007.

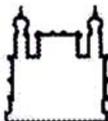
vii, 115 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 107-115

Tese (doutorado) - Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Malária 2. *Plasmodium vivax* 3. *Duffy binding protein*.
I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Co-orientação).

CDD - 22.ed. - 616.936 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

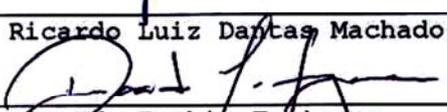
Ata da quinta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Isabela Penna Cerávolo, sob a orientação da Dra. Luzia Helena Carvalho e co-orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito.

Aos vinte e nove dias do mês de junho do ano de dois mil e sete, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Instituto René Rachou, o exame da quinta tese de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese da aluna Isabela Penna Cerávolo intitula-se "Caracterização imunológica e molecular da *Duffy Binding Protein* do *Plasmodium vivax* em áreas de transmissão de malária da região Amazônica e extra-Amazônica Brasileira". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Luzia Helena Carvalho - IRR/Fiocruz (orientadora e presidente da banca), Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado - FMSJRP (membro titular), Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa - UEC (membro titular), Dr. Ricardo Toshio Fujiwara - IRR/Fiocruz (membro titular), Dr. Luís Carlos Crocco Afonso - UFOP (membro titular) e Dra. Iramaya Rodrigues Caldas - IRR/Fiocruz (suplente). Após argüir a aluna e considerar se 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, Luzia Helena Carvalho, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e nove de junho de dois mil e sete.

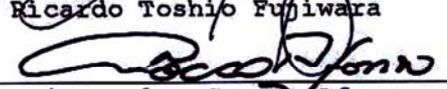


Dra. Luzia Helena Carvalho

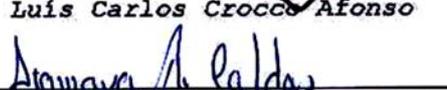
Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado



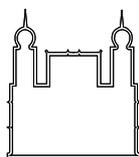
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara



Dr. Luís Carlos Crocco Afonso



Dra. Iramaya Rodrigues Caldas



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**“Caracterização Imunológica e Molecular da
Duffy Binding Protein do *Plasmodium vivax*
em Áreas de Transmissão de Malária da
Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira”**

por

Isabela Penna Cerávolo

Foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Dra. Iramaya Rodrigues Caldas

Tese defendida e aprovada em 29/06/2007

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou (IRR), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob a orientação da Dra. Luzia Helena Carvalho, co-orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, 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) e PAPES IV FIOCRUZ.

Órgãos Financiadores:



FIOCRUZ



“É preciso recordar sempre que, por detrás de cada tabela, de cada relatório, ou de cada material de exame, existe vida, existe gente, existe sofrimento, à espera do nosso esforço e da nossa solidariedade humana”.

Carlyle Macedo

Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde

“Você cria seu próprio universo enquanto vive e caminha”.

Winston Churchill
(1803-1882)

*Ao Nobel, pelo carinho, dedicação, respeito, compreensão e paciência
inesgotáveis durante toda minha jornada trilhada no ensino e na pesquisa.*

Aos meus pais, pelo apoio, estímulo e carinho.

*Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos e demais familiares,
pela paciência e por minha constante ausência.*

“Luzia, eu tinha tanta certeza de que gostaria de trabalhar com malária e especialmente com você, que me propus a esperar seu retorno do Pós-Doutorado, nos Estados Unidos, por aproximadamente três anos. Mas posso lhe garantir que, em nenhum momento, me arrependi de ter adiado a continuação da minha formação! Muito pelo contrário, sinto orgulho de ter sido sua primeira aluna de Pós-Graduação! Hoje eu somente tenho a agradecer a exemplar orientação, a confiança depositada, o constante entusiasmo e, sobretudo, a prestimosa amizade”.

AGRADECIMENTOS

A Cristiana pela co-orientação, paciência, ótimas sugestões e, sobretudo, pela amizade.

Às grandes e eternas amigas, Simone Mansur e Flávia Rodrigues, pelo constante e agradável convívio nas horas boas e difíceis.

A Taís, Flávia Alessandra, Simone Aparecida, Marcella e Bruno Sanchez, pela colaboração e amizade.

Aos amigos que pertencem ou que já pertenceram ao Laboratório de Malária: Anderson, Antônio, Armando, Bruno Rocha, Cristiane, Fernanda Freire, Fernanda Rezende, Fernando, Francine, Isabela Freitas, Isabela Ribeiro, Júnia, Karla, Leonardo, Luciana Andrezza, Luíza, Marcele, Maíra, Maria Gabrielle, Marino, Paloma, Sabrina, Thiago Mourão, Thiago Xavier, Walison e Wesley.

Aos grandes amigos Tânia, Nilton, Valter, Rodrigo e Maureen, que demonstraram boa-vontade e disposição sempre que solicitados.

A Alice, Renata e Marialice, pela grande ajuda, disponibilidade e amizade.

A Ana Paula pela assessoria nas análises estatísticas e, sobretudo, pela parceria e amizade.

Ao Dr. Luciano Andrade Moreira e à Dra. Antoniana Ursine Krettli pelo apoio e disponibilidade.

Ao meu grande amigo Geraldo, pela boa-vontade, disposição e constante ajuda.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação do Instituto René Rachou, onde desenvolvi a maioria dos créditos necessários para a conclusão da minha tese.

A Michelyne pela disponibilidade durante minha defesa de memorial, e, sobretudo, pela amizade.

Aos pesquisadores, Dr. Stefan Michael Geiger, Dr. Luís Carlos Crocco Afonso e Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, pelo empenho e valiosas sugestões durante a minha qualificação de doutorado.

A todos os colegas e amigos da Administração e de outros laboratórios do Instituto René Rachou.

À direção do Instituto René Rachou, nas pessoas do Dr. Alvaro Romanha, Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira e Roberto Sena Rocha.

A Heloísa, pela amizade e valiosas sugestões.

A Dra. Virgínia Torres Schall, Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito e Dr. Paulo Marcos Zech Coelho da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, pela dedicação e disponibilidade.

A Cristiane, Neide e Andréia da Secretaria de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, pela boa-vontade sempre que solicitadas.

Ao CNPq, TDR/WHO, Fapemig e PAPES IV/FIOCRUZ, pelo financiamento desse trabalho.

A todos, enfim, que auxiliaram, direta ou indiretamente, na realização dessa tese, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	1
1. A malária no Brasil	2
1.1. Amazônia Legal	2
1.2. Região extra-Amazônica	3
2. Ciclo biológico da malária humana	4
2.1. Processo de invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária	4
3. Aquisição da imunidade clínica em áreas endêmicas de malária	7
4. Proteínas de estágios sanguíneos candidatas à vacina contra o <i>P. vivax</i>	9
JUSTIFICATIVA	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
Áreas Estudadas	15
1. Amazônia Legal	15
1.1. Voluntários e coleta de sangue	16
2. Região extra-Amazônica	16
2.1. Voluntários e coleta de sangue	18
3. Obtenção de plasmas e DNA	19
4. Fenotipagem e genotipagem do receptor do antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC	19
5. Proteínas recombinantes	21
5.1. <i>Duffy binding protein</i> de <i>P. vivax</i> (PvDBP)	21
5.2. Proteína de superfície do merozoíta 1 de <i>P. vivax</i> (PvMSP-1)	22
5.3. Outros antígenos	23
6. Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos anti-PvDBP e anti-PvMSP-1 ₁₉	23
7. Ensaio funcional para detecção de anticorpos bloqueadores da interação DBP _{II} -DARC	24
7.1. Plasmídeos DBP _{II} -pEGFP	24
7.2. Transfecção e ensaio funcional	24
8. Avaliação do polimorfismo da região II da PvDBP (DBP _{II}) através de sequenciamento do DNA	25
9. Análise dos dados	26
RESULTADOS	27
ARTIGO 1	28

ARTIGO 2	35
ARTIGO 3.	59
ARTIGO 4	82
ARTIGO 5	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
1. Anticorpos anti-PvDBP são naturalmente induzidos em indivíduos expostos à transmissão de malária na Amazônia brasileira	94
2. A resposta de anticorpos anti-PvDBP na Amazônia brasileira inclui anticorpos que têm capacidade de inibir a interação ligante-receptor	95
3. Indivíduos expostos pela primeira vez a infecção pelo <i>P. vivax</i> em área não-endêmica desenvolvem anticorpos IgG anti-PvDBP	96
4. Anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor são induzidos contra uma variante semelhante à DBP _{II} que causou o surto	98
CONCLUSÕES	99
ANEXOS	100
ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	101
ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética do Centro de Pesquisa René Rachou	102
ANEXO 3. Questionário para Coleta de Dados de Pacientes	104
ANEXO 4. Parecer da Secretaria do Estado da Saúde de Minas Gerais	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática da proteína PvDBP	7
FIGURA 2. Condições de habitação em áreas da Amazônia brasileira	15
FIGURA 3. Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte indicando a localização do distrito de Souza, município de Rio Manso, MG	17
FIGURA 4. Foto ilustrando a região do surto de malária	18
FIGURA 5. Representação esquemática demonstrando a proteína recombinante PvDBP _{II-IV} que foi produzida, purificada e utilizada nos ensaios sorológicos de ELISA, e o plasmídeo utilizado na construção da proteína de fusão PvDBP _{II-IV}	21
FIGURA 6. Obtenção da proteína PvDBP _{II-IV}	22

ABREVIATURAS MAIS UTILIZADAS

aa. Aminoácidos

AMA-1. Antígeno apical de membrana 1 (*Apical Membrane Antigen 1*)

DARC. Antígeno do grupo sanguíneo Duffy e receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for chemokines*)

DBL-EBP. Família de proteínas de ligação aos eritrócitos que apresentam um domínio de ligação do tipo que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding-like Erythrocyte-binding protein*)

DBP. Proteína de ligação ao eritrócito (*Duffy binding protein*)

DBP_{II}. Domínio de ligação (região II) da DBP do *P. vivax*

dbpII. Gene que codifica a região II da DBP do *P. vivax*

DMEM. Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbeccos' (*Dulbeccos' Modified Eagle Medium*)

DO. Densidade ótica (*optical density*)

EBA-175. Proteína de ligação aos eritrócitos de 175kDa de *P. falciparum* (*P. falciparum Erythrocyte Binding Protein-175*)

EDTA. Ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA. Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz

Fy^a, Fy^b. Antígenos A e B do grupo sanguíneo DARC

Fy. Ausência de expressão dos antígenos A e B do grupo sanguíneo DARC na superfície dos eritrócitos

FY. Gene que codifica o antígeno do grupo sanguíneo DARC

FY*A, FY*B. Alelos do grupo sanguíneo DARC que codificam os antígenos A e B, respectivamente

FY*A^{ES}, FY*B^{ES}. Alelos do grupo sanguíneo DARC que não codificam os antígenos A e B

FY. Locus do receptor do antígeno do grupo sanguíneo DARC

GFP. Proteína de fluorescência verde (*Green protein fluorescent*)

GS4B. Glutaciona sepharose 4B

GST. Glutaciona S-transferase de *Schistosoma japonicum*

IgG. Imunoglobulina da classe G

IgG1. Imunoglobulina G da subclasse 1

IgG3. Imunoglobulina G da subclasse 3

IPTG. Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (*Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*)

IRR. Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz

kDa. Kilodalton

mM. Milimolar

µg. Micrograma

µl. Microlitro

- µM.** Micromolar
- MSP-1.** Proteína de superfície do merozoíto 1 (*Merozoite Surface Protein-1*)
- ng.** Nanograma
- nm.** Nanômetro
- OPD.** Cromógeno ortofenilenodiamino diidrocloreto (*o-phelylenediamine dihydrochloride*)
- pb.** Pares de bases
- PBS.** Salina tamponada com fosfato (*Phosphate-buffered saline*)
- PBS-T.** Salina tamponada com fosfato acrescentada de 0,05% de Tween 20
- PCR.** Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PCR-ASP.** Reação em Cadeia da Polimerase alelo-específica (*Allele Specific Polymerase Chain Reaction*)
- pEGFP.** Plasmídeo que codifica a proteína de fluorescência verde potencializada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)
- µl.** Microlitro
- pmoles.** Picomoles
- PNG.** Papua Nova Guiné, Oceania
- PNG 7.18.** Variante de DBP_{II} de *P. vivax* isolado na Papua Nova Guiné (VanBuskirk *et al.*, 2004a)
- PvDBP.** Proteína do *P. vivax* de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo DARC (*Duffy binding protein of P. vivax*)
- PvDBP_{II-IV}.** Proteína *Duffy binding protein* recombinante contendo as sequências codificadoras das regiões II a IV construída em fusão com o gene que codifica a proteína glutatona S-transferase de *Schistosoma japonicum*
- PvMSP-1.** Proteína de superfície do merozoíto 1 do *P. vivax* (*Merozoite Surface Protein 1 of Plasmodium vivax*)
- PvMSP-1₁₉.** Proteína que representa a região C-terminal de 19kDa da proteína de superfície do merozoíto 1 do *P. vivax*
- PvRBP.** Proteína de ligação do *P. vivax* a reticulócitos (*P. vivax Reticulocyte Binding Protein*)
- Sal-1.** Variante de DBP_{II} de *P. vivax* de um clone de referência de laboratório isolado em El Salvador (Fang *et al.*, 1991)
- SBF.** Soro bovino fetal (Fetal bovine serum)
- SDS.** Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)
- Real Time PCR.** Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*)
- TNN.** Município de Terra Nova do Norte, MT, Brasil
- Tween 20.** Polioxietileno-sorbitano-monolaurato (*Polyoxyethylenesorbitan monolaurate*)
- U.** Unidade Internacional
- UV.** Ultravioleta

RESUMO

A *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* (PvDBP) é funcionalmente importante no processo de invasão do parasito em eritrócitos humanos Duffy/DARC positivos, sendo considerada, portanto, um importante antígeno candidato à vacina. Utilizando uma proteína recombinante contendo as regiões II a IV da PvDBP em ensaios de ELISA, o presente estudo demonstrou que diferentes populações da Amazônia brasileira desenvolvem anticorpos anti-PvDBP. Nessas áreas, a prevalência e os níveis de anticorpos variaram em função do nível de exposição, sendo a frequência de respondedores maior entre indivíduos que apresentavam história de longa exposição à malária (>10 anos). Para investigar se essa resposta imune anti-PvDBP incluía anticorpos que bloqueavam a interação ligante-receptor, utilizou-se um ensaio de citoaderência in vitro onde o domínio de ligação da PvDBP (região II, DBP_{II}) era expresso na superfície de células COS-7 transfectadas. Anticorpos bloqueadores contra diferentes variantes da DBP_{II} foram observados em indivíduos com história de longa exposição à malária na Amazônia brasileira. Esses dados demonstraram, pela primeira vez, que indivíduos residentes em áreas de transmissão endêmica instável, como a Amazônia brasileira, desenvolvem anticorpos bloqueadores da interação DBP_{II}-DARC. Contudo, ainda não está claro se esta resposta de anticorpos está correlacionada à infecção assintomática de malária. Em uma segunda etapa desse trabalho, estudou-se a resposta imune a PvDBP em indivíduos expostos pela primeira vez à malária, durante um surto de transmissão autóctone de *P. vivax* ocorrido em Minas Gerais, área não endêmica. Nessa área do surto, a abordagem experimental foi monitorar a resposta de anticorpos anti-PvDBP nos indivíduos que se infectaram (casos, n = 15), bem como em seus parentes e/ou vizinhos que não se infectaram (não-casos, n = 18, controles da área), por um período de 12 meses. Embora apenas 20% dos indivíduos que se infectaram desenvolveram anticorpos IgG anti-PvDBP, um “boosting” dessa resposta foi observada naqueles que apresentaram recaída(s) da infecção pelo *P. vivax*. Nenhum dos indivíduos controles da área desenvolveu anticorpos anti-PvDBP. Por meio da genotipagem do antígeno DARC foi descartada a hipótese de que os indivíduos pertencentes a este grupo (não-casos) fossem resistentes à infecção, ou seja, não apresentavam o antígeno DARC na superfície de seus eritrócitos. Portanto, a não-infecção desses indivíduos foi atribuída, provavelmente, ao curto período em que estiveram expostos à transmissão. Dessa forma, o próximo passo desse estudo foi analisar se os indivíduos que se infectaram (casos) desenvolviam anticorpos bloqueadores da interação DBP_{II}-DARC. Considerando que a DBP_{II} é altamente polimórfica, DNAs de isolados do surto foram inicialmente sequenciados para identificar as variantes de DBP_{II} circulantes. As sequências da DBP_{II} obtidas demonstraram a presença de um único alelo de *dbpII* tanto nas infecções primárias, quanto nas recaídas. Assim, o ensaio funcional foi realizado com células COS-7 que expressavam duas diferentes variantes da DBP_{II}. Nesta população, o resultado de 12 meses de acompanhamento forneceu evidências de que anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor apresentam uma curta duração, e parecem ser alelo-específicos, já que uma inibição da interação DBP_{II}-DARC foi observada apenas quando uma variante de DBP_{II} semelhante à do isolado do surto foi utilizada.

ABSTRACT

The *Duffy binding protein of Plasmodium vivax* (PvDBP) is a critical adhesion ligand that participates in merozoite invasion of human Duffy/DARC positive erythrocytes, being considered, therefore, a logical target for vaccine-mediated immunity. In the present study, we demonstrated that the PvDBP is naturally immunogenic in different populations of the Brazilian Amazon, and the proportions of PvDBP IgG positive reaching a peak in those subjects with long-term exposure (> 10 years) in the Amazon area. To examine the ability of these anti-PvDBP sera to inhibit the protein erythrocyte-binding function, we used an in vitro binding assay, in which the PvDBP ligand domain (region II, DBP_{II}) was expressed on the surface of cultivated mammalian COS-7 cells. The data obtained demonstrated that a long-term exposure to malaria in the Amazon area elicits an inhibitory antibody response against different DBP_{II} variants. However, this anti-functional antibody response was not related with asymptomatic *P. vivax* infection. In a second step of this study, we investigate the antibody response to PvDBP during a *P. vivax* malaria outbreak that occurred in Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area. Our experimental approach was to carry-out a 12-month following-up of these individuals (cases, n = 15), including individuals who were considered to be exposed to the risk of infection but who had neither symptoms nor blood parasites (non-cases, n = 18). Although only 20% of the infected individuals have developed an antibody response to the PvDBP, a secondary boosting could be achieved by the time of a new *P. vivax* episode (relapses). Since none of the individuals studied carried the refractory genotype DARC-negative, we conclude that the absence of antigen DARC on the erythrocytes surface was not responsible for the malaria resistance in the control group (non-cases). DNA sequences from primary/relapses samples demonstrated that a single *dbp* allele was detected in the outbreak area. To investigate neutralizing antibodies to ligand domain of the DBP (cysteine-rich region II, DBP_{II}), we performed cytoadherence assays with mammalian cells expressing DBP_{II} sequences which were related or not to those from the outbreak isolate. The results of a 12-month follow-up period provided evidence that naturally acquired neutralizing antibodies to DBP_{II} are short-lived, and seem to be allele-specific. This is the first evidence that naturally acquired neutralizing antibodies to DBP_{II} are short-lived and seem to be variant-specific.

INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças mais prevalentes no mundo, atingindo 107 países, infectando de 350 a 500 milhões de pessoas anualmente e causando aproximadamente três milhões de mortes principalmente entre crianças jovens, gestantes e adultos não-imunes (WHO, 2005a). Globalmente, 9% das mortes de crianças menores que cinco anos são atribuídas à malária (Black *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores têm estimado que uma criança morra de malária no mundo a cada 40 segundos, resultando em uma perda de mais de 2.000 vidas diariamente (Sachs & Malaney, 2002). Do alarmante número de casos de malária, 90% se concentram na África subsaariana, sendo o restante distribuído nas Américas Central e do Sul, sudeste asiático e ilhas da Oceania. A parasitose humana é causada pelas espécies de protozoários *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo esta última espécie encontrada apenas na África tropical e alguns países do sudeste asiático (Collins & Jeffery, 2003). O *P. falciparum* é a espécie responsável pela doença mais severa e pela maior mortalidade por malária. Vários fatores contribuem para o grande número de casos de malária por *P. falciparum* na África, incluindo a transmissão pelo mosquito *Anopheles gambiae*, vetor altamente adaptado para transmitir o parasito, prevalente no continente e de difícil controle. Além disso, a falta de infra-estrutura básica de saúde, difícil acesso a serviços médicos e a antimaláricos contribuem para a piora da situação, fazendo com que a doença seja de difícil controle, levando ao aumento do risco de casos de malária grave e morte (Guinovart *et al.*, 2006).

Das quatro espécies de protozoários causadores da malária humana, o *P. vivax* é a espécie que apresenta maior distribuição mundial, sendo responsável por mais de 50% dos casos humanos diagnosticados fora da África, incluindo a Ásia, as Filipinas e as Américas Central e do Sul (Mendis *et al.*, 2001; Carter & Mendis, 2002). Algumas características da biologia da transmissão do *P. vivax* conferem a esta espécie uma maior capacidade de adaptação a ambientes desfavoráveis. Como consequência, na medida em que as técnicas de controle da doença se tornam mais efetivas, a infecção pelo *P. vivax* tende a sobrepor aquela causada pelo *P. falciparum*. Recentemente, um outro agravante das infecções causadas pelo *P. vivax* é que essa espécie tem sido implicada como responsável por muitos casos de malária grave, inclusive no Brasil (Lomar *et al.*, 2005; Picot, 2006).

O incremento do número de casos de malária no mundo ao longo dos anos se deve, principalmente, ao aumento de resistência dos parasitos aos antimaláricos, ao desenvolvimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas e à falta de política econômica e social nas regiões onde ocorre alta transmissão da doença. Sua prevenção e controle não dependem apenas de atividades do setor da saúde, mas requer iniciativas de agências privadas e governamentais responsáveis por projetos de desenvolvimento econômico. Segundo Tauil (2006), até mesmo sem a introdução de novas medidas profiláticas como a vacina, é possível reduzir drasticamente

a incidência da malária realizando-se gerenciamento ambiental em combinação com medidas de saúde específicas contra a doença, tais como diagnóstico precoce, tratamento sistemático de todos os pacientes infectados e realização de campanhas anti-vetoriais. Entretanto, apesar da possibilidade de se fazer controle da malária apenas adotando-se medidas específicas, a descoberta de uma vacina no futuro poderia amenizar os impactos econômicos e sociais da doença em todo o mundo. Infelizmente, o desenvolvimento de vacinas contra parasitos continua a desafiar os pesquisadores devido, principalmente, aos seus complexos ciclos de vida, contrariamente à maioria das infecções virais e bacterianas.

1. A malária no Brasil

1.1. Amazônia Legal

A incidência de malária no Brasil aumentou dramaticamente nas décadas de 70 e 80, devido, principalmente, aos projetos de colonização, expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração de madeira e mineração. Aproximadamente 99% dos casos de malária ocorrem essencialmente na Amazônia Legal (Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, 2007), onde condições socioeconômicas e ambientais favorecem a exposição de grandes contingentes populacionais ao risco de infecção.

Na Amazônia, as precárias condições socioeconômicas da população migrante determinaram a rápida expansão da doença. Sendo assim, em 2000, foi implantado no Brasil o “Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal” (PIACM), em resposta à convocação da Organização Mundial da Saúde visando-se recuar o avanço da malária (WHO, 1998). Essa estratégia, além de continuar priorizando a consolidação de redes de serviços capazes de ofertar diagnóstico precoce e um tratamento adequado e imediato, teve um forte componente político, ou seja, o compromisso de que o controle da malária fosse assumido pelo presidente da República, governadores de estado e prefeitos de municípios (Tauil, 2006). Com a implantação do PIACM houve a diminuição do número de casos de malária de 610.878 para 349.873 entre os anos de 2000 e 2002 (SVS, 2005). Entretanto, apesar desse avanço no controle da malária, não foi observada sustentabilidade das ações implantadas. Um exemplo disso foi o aumento na incidência da doença em alguns estados da Amazônia no ano de 2005, resultando em aproximadamente 600 mil casos notificados, sendo 75% devido ao *P. vivax* e 25% ao *P. falciparum* (Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária, SIVEP, Ministério da Saúde, 2005). Esse importante incremento no número de casos de malária no país ocorreu, principalmente, devido ao imenso e intenso fluxo migratório da população dos municípios do interior para as grandes cidades como Manaus, causando ocupação desordenada nas periferias da cidade onde existiam pessoas infectadas pelo *Plasmodium* e falta de saneamento básico, propiciando, assim, a formação de criadouros de anofelinos. Adicionalmente, visando ampliar as

oportunidades de trabalho em algumas regiões dos estados da Amazônia, como, por exemplo, no Estado de Rondônia, houve estimulação da criação de tanques de piscicultura, que ao serem abandonados, tornaram-se criadouros de anofelinos, também contribuindo para o aumento do número de casos de malária notificados no Brasil no ano de 2005 (Coura *et al.*, 2006).

Atualmente outro grande desafio para o controle de malária no Brasil são os indivíduos portadores de infecção assintomática (Andrade *et al.*, 1995; Camargo *et al.*, 1999; Fontes, 2001; Alves *et al.*, 2002; Suárez-Mutis *et al.*, 2004a,b; Roshanravan *et al.*, 2003). Esses indivíduos infectados, mas sem sintomas, parecem constituir uma importante fonte de infecção para o mosquito (Alves *et al.*, 2005). A presença de infecção assintomática no Brasil reforça a importância de se estabelecer um critério homogêneo para a definição dos casos assintomáticos, bem como para estabelecer novos métodos diagnósticos visando-se avaliar a prevalência da doença no país (Coura *et al.*, 2006). Esse fato faz com que, além de todas as medidas de controle contra malária regularmente adotadas, novas estratégias dentro dos programas de controle sejam implantadas voltadas, principalmente, para detecção e gerenciamento dos indivíduos assintomáticos.

1.2. Região extra-amazônica

A existência de áreas de alta transmissão de malária na Amazônia Legal constitui um importante problema de saúde pública, influenciando áreas vizinhas, e também exercendo pressão sobre vários estados brasileiros. O fluxo migratório de pessoas entre as áreas endêmicas da Amazônia e os diferentes estados brasileiros, associado à presença de anofelinos em praticamente todo o território nacional (Deane, 1986), são fatores que favorecem a reintrodução e a disseminação da doença em áreas previamente livres de transmissão (SVS, Plano Nacional de Controle da Malária, PNCM, Ministério da Saúde, 2003). Segundo dados publicados, no ano de 2002 foram notificados apenas no Estado do Ceará 402 casos autóctones de malária; em 2003 houve 71 casos na Bahia, 38 no Piauí e 31 em Minas Gerais (SVS, 2005). Em 2004 os surtos mais importantes ocorreram nos estados do Piauí e do Espírito Santo, com o registro de 89 e 81 casos, respectivamente.

Embora na região extra-amazônica sejam notificados apenas 1% do total de casos de malária do Brasil, uma grande preocupação nessas áreas diz respeito à maior letalidade destes casos (Fundação Nacional da Saúde, FUNASA, 2002). No ano de 2004, o coeficiente de letalidade por malária na região extra-amazônica foi de 0,78 óbitos por 100 casos, enquanto na região Amazônica foi de 0,015/100, demonstrando, assim, que na região extra-amazônica esse indicador é 52 vezes maior do que na Amazônia Legal. O óbito nessa região ocorre, geralmente, porque pessoas infectadas não recebem o diagnóstico e tratamento precoce, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Essa falha ocorre principalmente devido à falta de

profissionais da saúde nessas regiões treinados para diagnosticar a doença a tempo de se fazer o tratamento adequado (SVS, 2005).

2. Ciclo biológico da malária humana

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana compreende duas fases: uma fase onde ocorre reprodução sexuada em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*; e outra de reprodução assexuada que se desenvolve no hospedeiro vertebrado.

A transmissão da malária ao hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, onde os esporozoítos depositados na pele do hospedeiro podem permanecer por várias horas antes de encontrar um vaso sanguíneo (Yamauchi *et al.*, 2007). Após atingirem o sistema circulatório, os esporozoítos migram para o fígado onde infectam os hepatócitos. O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e depende de várias interações do tipo ligante-receptor. Recentemente, foi demonstrado por Mota & Rodrigues (2002) que os esporozoítas invadem vários hepatócitos, migrando através deles, antes de finalmente desenvolverem-se em seu interior. Esse processo resulta na formação de um vacúolo parasitóforo bem delimitado onde os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Após alguns dias, os esquizontes maduros liberam os merozoítos por um processo de brotamento de vesículas denominados merosomos (Amino *et al.*, 2006a,b). Os merosomos, repletos de parasitos, desprendem-se dos hepatócitos infectados para o lúmen dos capilares sinusóides do fígado, onde finalmente os merozoítos são liberados. Os merozoítos teciduais invadem os eritrócitos iniciando, assim, a fase sanguínea da doença.

Para que o merozoíto invada o eritrócito são também necessárias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (Gaur *et al.*, 2004). Após algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos se diferenciam em estágios sexuais - gametócitos masculinos e femininos - que, ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles*, darão continuidade ao ciclo do parasito com a formação de gametas. A fusão dos gametas masculino e feminino no interior do estômago do inseto origina um zigoto móvel denominado oocineto, que após atravessar a parede intestinal do mosquito, por um mecanismo transcelular (Barillas-Mury & Kumar, 2005), aloja-se na membrana basal onde se desenvolve em oocisto. No interior do oocisto ocorre diferenciação e divisão nuclear que culmina com a produção de esporozoítos (esporogonia). Parte dos esporozoítos liberados na hemocele migra para as glândulas salivares do mosquito para que esse, ao exercer o repasto sanguíneo, reinicie um novo ciclo no hospedeiro vertebrado.

2.1. Processo de invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária

O processo de invasão do eritrócito pelo *Plasmodium* é complexo e envolve muitas etapas incluindo: (1) reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; (2)

reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; (3) formação de uma junção irreversível no ponto de contato entre o cone apical do parasito e a membrana celular do eritrócito, e (4) movimento da junção ao redor do merozoíto com simultânea invaginação da membrana do eritrócito, até que o parasito se encontre dentro da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo (Dvorak *et al.*, 1975; Bannister *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1976). Os dois eventos iniciais, que envolvem o reconhecimento e adesão do parasito, são aparentemente de baixa afinidade e reversíveis (Cowman & Crabb, 2006). Ambas as etapas permitem ao parasito distinguir entre um eritrócito competente para a invasão e outro tipo celular. Por outro lado, as etapas três e quatro envolvem interações do tipo ligante-receptor de alta afinidade, e a partir desse ponto, o processo de invasão passa a ser irreversível. Embora todos os plasmódios utilizem esse mecanismo geral de entrada na célula hospedeira, que inclui a participação de organelas apicais do parasito, algumas espécies utilizam características únicas que fazem com que esse processo seja praticamente espécie-específico. No caso das espécies mais importantes do ponto de vista da saúde pública, *P. falciparum* e *P. vivax*, as interações ligante-receptor se encontram melhor estudadas. Numerosos estudos têm demonstrado que merozoítos de *P. falciparum* têm a habilidade de invadir os eritrócitos através de, pelo menos, cinco vias de invasão (Gaur *et al.*, 2004). Entretanto, no caso do *P. vivax*, uma via de invasão parece ser a mais importante (Adams *et al.*, 1992).

A complexidade do processo de invasão do *Plasmodium falciparum* tem feito com que as vias de invasão sejam classificadas com base da natureza do receptor do eritrócito envolvido na invasão. Algumas vias são dependentes de sialoglicoproteínas presente nos eritrócitos (glicoforinas A, B, C/D), e outras de receptores de eritrócitos ainda não conhecidos, denominados X, Y e Z. Por outro lado, um grande número de ligantes no parasito tem sido identificado. A proteína mais bem caracterizada do *P. falciparum* é o antígeno de ligação ao eritrócito de 175kDa (EBA-175) que se encontra localizada nos micronemas do parasito (Camus & Hadley, 1985). Essa molécula se liga especificamente a glicoforina A, uma sialoglicoproteína presente na superfície da célula hospedeira (Sim *et al.*, 1994). A partir do desenvolvimento do projeto genoma de *P. falciparum*, outras proteínas similares a EBA-175 já foram identificadas, incluindo BAEBL (EBA-140), JESEBL (EBA-181), EBL-1 e PEBL (EBA-165) (Adams *et al.*, 2001).

Uma característica importante do *P. falciparum* é a habilidade que ele tem em alterar seu processo de invasão do eritrócito utilizando vias alternativas (Dolan *et al.*, 1990). Esta plasticidade concede a esta espécie inúmeras vantagens. A primeira delas é a de que o parasito teria a habilidade de invadir uma grande variedade de eritrócitos humanos, visto que até o presente momento nenhum eritrócito mostrou-se totalmente refratário à invasão pelo *P. falciparum*. Outra vantagem estaria ligada à evasão do sistema imune, já que diferentes vias de invasão da célula hospedeira envolvem moléculas diferentes do parasito. Portanto, uma resposta

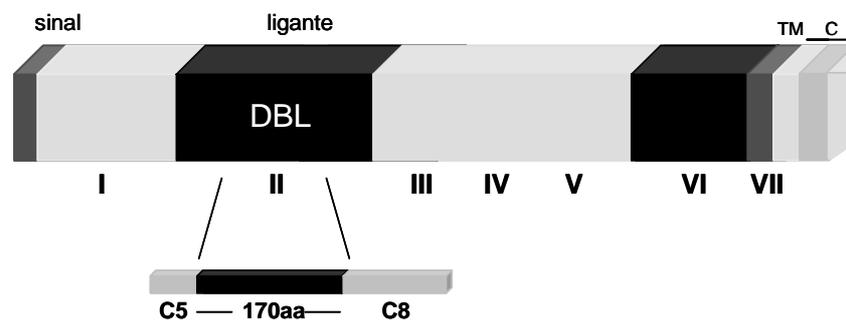
imune dirigida contra uma determinada proteína envolvida na invasão pode não afetar o parasito, já que ele pode utilizar uma via alternativa.

No caso do *P. vivax*, a formação da junção e a consequente invasão do merozoíto é mediada pela interação entre a *Duffy binding protein* (PvDBP) e seu receptor nos eritrócitos, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy, também conhecido como receptor DARC para quimiocinas (DARC, *Duffy Antigen Receptor for chemokines*) (Miller *et al.*, 1976; Fang *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992; Horuk *et al.*, 1993). Indivíduos cujos eritrócitos são DARC negativos são naturalmente resistentes à infecção pelo *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976), demonstrando, portanto, que o receptor DARC é necessário para a invasão do *P. vivax*. Entretanto, evidências recentes demonstraram que alguns indivíduos DARC negativos do oeste africano (Quênia) e do Brasil se infectaram com esse parasito (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2006, 2007) sugerindo, portanto, a presença de uma via alternativa de invasão. Dessa forma, a importância da proteína PvDBP em garantir o parasitismo humano, bem como evidências de que a maioria dos indivíduos DARC negativos são resistentes à infecção por esse parasito (Miller *et al.*, 1976; Spencer *et al.*, 1978), fazem dessa proteína um importante antígeno candidato à vacina antimalárica contra os estágios assexuados sanguíneos do *P. vivax*.

O *P. vivax* parece invadir apenas os reticulócitos, eritrócitos jovens, que compreendem uma minoria (~1%) da população de eritrócitos circulantes. Isto significa que os merozoítos de *P. vivax* interagem com inúmeros eritrócitos maduros na circulação antes de invadirem um reticulócito. Barnwell *et al.* (1989) sugerem que interações prematuras entre a PvDBP e o antígeno do grupo sanguíneo DARC em eritrócitos maduros poderiam ser prejudiciais para a sobrevivência do parasito. Portanto, acredita-se que anteriormente à junção merozoíto-eritrócito haveria uma seleção da célula hospedeira, impedindo, assim, a interação da PvDBP com uma célula não-alvo (Galinski *et al.*, 1992; Barnwell & Galinski, 1998). Se essa suposição estiver correta, ou seja, se a seleção dos reticulócitos é um passo que ocorre logo antes da formação da junção, algumas proteínas do *P. vivax* de ligação aos reticulócitos (PvRBP) como a PvRBP-1 e PvRBP-2, seriam essenciais para esse passo. Entretanto, os papéis dessas proteínas ainda necessitam ser esclarecidas já que proteínas homólogas das PvRBP também já foram encontradas em *P. falciparum* e *P. yoelli*, duas espécies de *Plasmodium* que não infectam apenas reticulócitos (Galinski *et al.*, 1992).

A PvDBP é uma molécula de 140kDa que pertence a uma família de proteínas homólogas que se ligam a eritrócitos, e que apresentam um domínio de ligação do tipo que se liga ao antígeno Duffy/DARC (DBL-EBPs) (Barnwell & Wertheimer, 1989; Adams *et al.*, 1992). A conservação de um domínio rico em cisteína funcionalmente importante (domínio II) é a principal característica dos membros dessa superfamília. As DBL-EBPs têm as características adicionais de: (i) apresentar uma estrutura gênica similar; (ii) localização nos micronemas, além de (iii) possuir um segundo domínio conservado rico em cisteína na região carboxi-terminal da proteína

(Adams *et al.*, 1992). Por causa de seus importantes papéis biológicos na malária, as moléculas EBPs são importantes candidatas à vacina contra estágios assexuados sanguíneos dos parasitos da malária (Oaks *et al.*, 1991). Todas as DBL-EBPs apresentam um domínio extracelular similar dividido em seis regiões contendo dois domínios conservados ricos em cisteína, denominados regiões II e VI (Adams *et al.*, 1992). O ligante funcional da PvDBP encontra-se localizado na região II e contém cerca de 300 aminoácidos (aa) (**Figura 1**), sendo seu sítio de ligação ao eritrócito situado no trecho de 170-aa que contém as cisteínas 5 a 8 (Singh *et al.*, 2003). Embora a posição dos resíduos de cisteína seja conservada nessa região, outros aa já demonstraram ser altamente polimórficos (Ampudia *et al.*, 1996), sugerindo, portanto, estarem sujeitos à pressão positiva do sistema imune do hospedeiro (Xainli *et al.*, 2000).



VanBuskirk *et al.*, 2004b

Figura 1. Representação esquemática da PvDBP. Essa proteína apresenta seis domínios extracelulares e uma sétima região consistindo de domínios transmembrana (TM) e citoplasmático (C). Esta proteína é caracterizada por um domínio N-terminal rico em cisteína, o domínio de ligação a Duffy (DBL) (região II), e um segundo domínio conservado rico em cisteína (região VI). A porção central da PvDBP entre as cisteínas 5 (C5) e 8 (C8) é o principal sítio para o reconhecimento do receptor (170-aa), além de ser a região mais polimórfica da proteína.

Como a invasão dos eritrócitos por merozoítos é um processo complexo e dependente da interação ligante-receptor, a caracterização desses componentes é vital para o entendimento da dinâmica molecular do processo de invasão. Desta forma, o bloqueio dessas ligações ligante-receptor poderia oferecer um mecanismo potente e efetivo que poderia levar à redução, ou mesmo à eliminação dos parasitos sanguíneos da malária, e, conseqüentemente, ao impedimento do estabelecimento da doença clínica.

3. Aquisição de imunidade clínica em áreas endêmicas de malária

MacDonald (1957) foi o primeiro a categorizar a endemicidade da malária de acordo com sua estabilidade de transmissão, classificando as áreas como estáveis ou instáveis, não obstante a larga diversidade epidemiológica entre elas. Considerou-se que o elemento estabilizador mais importante em uma população era o desenvolvimento de imunidade. Foi demonstrado por Carter & Mendis (2002) que a intensidade e regularidade da transmissão da malária em uma dada área influenciam diretamente no grau de imunidade adquirida. Em áreas de malária estável, onde a

transmissão é intensa e constante ao longo dos meses e anos, a população exposta desenvolve imunidade clínica. Nestas áreas, conseqüentemente, onde a população exposta está sujeita a centena de picadas infectantes anualmente, as epidemias são raras. Por outro lado, em áreas com transmissão menos intensa e que varia de mês a mês, e de ano a ano, a malária tende a ser instável, não havendo desenvolvimento significativo de imunidade clínica. Dessa forma, em áreas de endemicidade instável, os indivíduos estão sujeitos a apenas algumas picadas infectantes, explicando, assim, o grande número de epidemias ocorridas nessas áreas.

A história natural da malária em regiões hiper- e holoendêmicas da África e Ásia ilustra bem a dinâmica da relação parasito-hospedeiro que se desenvolve nos indivíduos constante e cronicamente expostos à doença (malária estável). Nessas áreas onde o *P. falciparum* é predominante, os recém-nascidos são protegidos da malária grave durante os seis primeiros meses de vida devido, sobretudo, à transferência passiva de anticorpos maternos através da placenta (Collins *et al.*, 1977; Chizzolini *et al.*, 1991). Após esse período, essa proteção é perdida e as crianças se tornam altamente suscetíveis à malária grave e às infecções fatais durante os primeiros cinco anos de vida. Com o aumento da idade, as crianças que vivem em condições de alta transmissão sofrem progressivamente menos episódios de malária aguda, embora possam apresentar, ainda, altas parasitemias (Rogier & Trape, 1993). Essa “tolerância” contra altas parasitemias pode refletir um estado de imunidade “anti-tóxica” dirigida, provavelmente, contra componentes solúveis do parasito que causam a doença clínica (Playfair *et al.*, 1990). Atingindo a idade adulta os sintomas da doença são menos pronunciados e os níveis de parasitos sanguíneos reduzidos, refletindo o desenvolvimento de uma imunidade “anti-parasito”. Os mecanismos imunes responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção dessa imunidade não estão bem esclarecidos e, provavelmente, envolvem muitos tipos celulares, anticorpos de diferentes especificidades, além de uma cascata de citocinas (Stevenson & Zavala, 2006).

Parte da dificuldade em se desvendar os mecanismos imunes responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da imunidade adquirida contra a malária se deve ao complexo ciclo de vida do *Plasmodium*, e também ao fato de que a imunidade do hospedeiro parece ser espécie e estágio-específica (David *et al.*, 1988). A heterogeneidade do parasito e a especificidade da resposta imune resultante é uma explicação possível para que o desenvolvimento da imunidade somente ocorra após vários anos de exposição à malária (Day & Marsh, 1991). A maturidade do sistema imune também parece ser importante, visto que crianças que migraram de áreas não-endêmicas para endêmicas, desenvolvem proteção mais lentamente do que os adultos (Baird *et al.*, 1991). Este perfil de imunidade naturalmente adquirida à malária clínica se aplica apenas a áreas de transmissão elevada e estável por *P. falciparum*. Nas áreas com baixos níveis de transmissão, indivíduos de todas as idades são potencialmente suscetíveis, como é o caso da Amazônia brasileira.

Na Amazônia brasileira, a malária é considerada “instável” e a transmissão hipo- a mesoendêmica (Camargo *et al.*, 1994, 1996), sendo a população exposta constituída principalmente por adultos não-ímmunes migrantes de áreas livres de transmissão. Nessas áreas, as infecções por *P. falciparum* e/ou *P. vivax* são geralmente acompanhadas de sintomas clínicos de intensidade variável (Tauil, 2006). Contudo, relatos recentes nessas áreas têm descrito a presença de pessoas com exame parasitológico positivo e ausência de sintomas clínicos. No Brasil, casos de malária assintomática têm sido demonstrados em indivíduos que apresentam história de longa exposição à malária. Em 1996, Fontes (2001) demonstrou que cerca de 7% dos indivíduos de um garimpo do município de Apiacás, MT, eram portadores de malária assintomática. Ao se utilizar a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nesse mesmo grupo de indivíduos, a prevalência de infecções assintomáticas aumentou para 27% (Scopel, 2003). Infecções assintomáticas foram também detectadas em estudos feitos no rio Ji-Paraná (Alves *et al.*, 2002), em Portchuelo (Estado de Rondônia) (Camargo *et al.*, 1999) e no Parque Nacional do Jaú na Amazônia brasileira (Ladeia-Andrade, 2005). Entretanto, ainda existe dificuldade na definição de caso assintomático, visto que o período de ausência de sintomas avaliado tem variado de um período de 72h (Andrade *et al.*, 1995; Fontes, 2001) até 30-60 dias (Alves *et al.*, 2002).

Infecções assintomáticas também têm sido descritas em outros países da América Latina. Roshanravan *et al.* (2003) estudando populações da parte peruana da Amazônia encontrou uma prevalência de 17,6%, e Suárez-Mutis *et al.* (2000a,b) uma taxa de 21,6% entre populações indígenas localizadas na parte colombiana da Amazônia. A presença de indivíduos assintomáticos também já foi demonstrada na Venezuela em índios Yanomami (Marcano *et al.*, 2004). Nas áreas que apresentam transmissão instável, entender a história clínica natural da malária poderá ajudar a esclarecer os mecanismos imunes protetores que são induzidos pelo plasmódio em humanos.

4. Proteínas de estágios sanguíneos candidatas à vacina contra o *P. vivax*

Atualmente, grande parte dos esforços para desenvolver uma vacina contra malária tem sido direcionada ao *P. falciparum*, espécie mais patogênica. Consequentemente, 23 candidatos à vacina contra o *P. falciparum* estão sendo avaliados em triagens clínicas, mas somente dois candidatos à vacina contra o *P. vivax* - a proteína circumsporozoíta expressa em esporozoítos e a proteína de superfície 25 expressa em oocinetos (Pvs 25), apresentam-se no mesmo estágio de desenvolvimento (fase I).(Herrera *et al.*, 2007). Consequentemente, o desenvolvimento de uma vacina específica contra o *P. vivax* tem sido considerado um grande desafio, já que os financiamentos são limitados e existem dificuldades técnicas de cultivá-lo in vitro contínua e eficientemente.

Vários antígenos de formas sanguíneas assexuadas do *P. vivax* são considerados componentes potenciais para serem incluídos em uma vacina de malária espécie-específica (Arevalo-Herrera & Herrera, 2001). Dentre esses, o melhor e mais bem caracterizado do ponto de vista imunológico são a proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1) (Dutta *et al.*, 2001), a DBP (Dutta *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001) e o antígeno apical de membrana 1 (AMA-1) (Kocken *et al.*, 1999).

A MSP-1 é o antígeno de estágio sanguíneo dos plasmódios mais bem caracterizado. Esse antígeno é uma proteína integral de membrana que se apresenta ligado à superfície do merozoíto através de uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), sendo sintetizada como um precursor de alta massa molecular (180 a 230kDa) durante o estágio esquizogônico. Após ser processada, a proteína MSP-1 gera fragmentos menores de 19kDa e 42kDa que permanecem na superfície do parasito, onde são essenciais para invasão do merozoíto (Gibson *et al.*, 1992).

Vários estudos desenvolvidos demonstraram que a proteína MSP-1 de *P. vivax* (PvMSP-1) é altamente imunogênica em diferentes regiões do mundo incluindo a Coreia (Park *et al.*, 2001), Sri Lanka (Wickramarachchi *et al.*, 2007), Colômbia (Valderrama-Aguirre *et al.*, 2005) e Brasil (Soares *et al.*, 1997, 1999a; Oliveira *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2003). Adicionalmente, a realização de estudos de imunização de camundongos BALB/c (Oliveira *et al.*, 1999; Valderrama-Aguirre *et al.*, 2005) e primatas não-humanos (Yang *et al.*, 1999; Sierra *et al.*, 2003; Valderrama-Aguirre *et al.*, 2005) realizados com a proteína PvMSP-1, demonstraram a presença de altos níveis de anticorpos IgG anti-PvMSP-1. Além disso, primatas não-humanos imunizados com essa proteína apresentaram uma imunidade protetora parcial, quando desafiados com formas sanguíneas do parasito (Yang *et al.*, 1999; Sierra *et al.*, 2003; Valderrama-Aguirre *et al.*, 2005). Atualmente, a PvMSP-1 vem sendo testada em ensaios pré-clínicos e clínicos; no entanto, estudos adicionais ainda são necessários para identificar o principal fragmento dessa proteína que é capaz de induzir uma resposta protetora.

Apesar da PvMSP-1 ser considerada um importante antígeno candidato à vacina contra estágios sanguíneos assexuados do parasito (Holder, 1988; Collins *et al.*, 1999; Dutta *et al.*, 2001; Sierra *et al.*, 2003), estudos prévios têm demonstrado que essa proteína apresenta polimorfismo o que certamente poderia comprometer sua potencialidade como vacina (Joshi, 2003; Zakeri *et al.*, 2006; Wickramarachchi *et al.*, 2007). Outras proteínas também associadas à superfície do merozoíto tais como a MSP-3, MSP-4, MSP-5 e MSP-9 têm sido identificadas e caracterizadas como potenciais alvos para vacina (Galinski *et al.*, 1999, 2000; Black *et al.*, 2002; Malkin *et al.*, 2005), sendo algumas dessas já produzidas como proteínas recombinantes para estudos imunológicos (Barnwell *et al.*, 1999; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2004).

A proteína AMA-1 é membro de uma família de moléculas de *Plasmodium* expressa nos micronemas de merozoítos. Essa proteína apresenta 83kDa em *P. falciparum* e 66kDa nas demais espécies, desempenhando um importante papel na invasão de eritrócitos por merozoítos

durante o estágio sanguíneo assexuado. Além disso, a proteína AMA-1 é também expressa em esporozoítos, e parece estar envolvida na invasão dos hepatócitos (Silvie *et al.*, 2004). Entretanto, apesar da importância dessa proteína como antígeno candidato à vacina, poucos estudos têm sido conduzidos sobre a resposta imune contra esta proteína.

No modelo experimental utilizando primatas não-humanos, a proteína AMA-1 apresentou elevada imunogenicidade (Kocken *et al.*, 1999). Posteriormente, estudos imunoepidemiológicos realizados na Coreia (Kim *et al.*, 2003) e Sri Lanka (Wickramarachchi *et al.*, 2007) demonstraram que indivíduos com exame parasitológico positivo para *P. vivax* desenvolveram anticorpos contra a AMA-1. Similarmente, no Brasil, a proteína AMA-1 apresentou-se altamente imunogênica em indivíduos de áreas endêmicas durante infecções naturais (Rodrigues *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2006), sendo os níveis de anticorpos aumentados em função da exposição à malária (Morais *et al.*, 2006).

Muitos estudos têm demonstrado que a diversidade genética da AMA-1 é variável entre diferentes regiões geográficas do mundo. Em áreas de alta endemicidade como a Papua Nova Guiné (PNG) (Figtree *et al.*, 2000), um intenso polimorfismo foi observado entre diferentes isolados da região; já em regiões de baixa endemicidade como a Coreia (Han *et al.*, 2002), foi observado um baixo polimorfismo. No Brasil, também a proteína MSP-1 tem se mostrado altamente imunogênica em infecções naturais de indivíduos originados de seis diferentes áreas endêmicas de malária (Rodrigues *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2006), sendo o polimorfismo limitado (Rodrigues *et al.*, 2005) como observado na Coreia.

Outra proteína importante candidata à vacina contra o *P. vivax* é a PvDBP. Esta é provavelmente exposta na superfície dos merozoítos durante a invasão dos eritrócitos, o que permite sua ligação ao receptor e, importante do ponto de vista de uma vacina, torna-a acessível aos anticorpos do soro. Embora apresente grande importância como uma proteína candidata a vacina antimalárica, existe algumas limitações que dificultam seu estudo, como baixa abundância no parasito, baixa imunogenicidade, além das limitações de cultivo *in vitro* do *P. vivax*. Dados disponíveis sobre a resposta imune a PvDBP em populações humanas ainda são limitados (Fraser *et al.*, 1997; Michon *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 2003; Xainli *et al.*, 2003). Estudos prévios demonstraram a presença de anticorpos anti-PvDBP no soro de residentes de região altamente endêmica de malária da PNG (Fraser *et al.*, 1997). Para avaliar o papel funcional dos anticorpos anti-PvDBP na PNG, Michon *et al.* (2000) utilizaram uma linhagem celular transfectada com a região ligante da PvDBP (região II). Os dados obtidos demonstraram que a resposta imune anti-PvDBP naqueles indivíduos incluía anticorpos bloqueadores, isto é, que impedem a interação do ligante com o receptor presente na superfície do eritrócito. Adicionalmente, estudos de vacinação desenvolvidos em camundongos e primatas não-humanos mostraram que a PvDBP induziu altos títulos de anticorpos nos animais vacinados (Yazdani *et al.*, 2004), além de induzir uma proteção parcial após desafio (Arévalo-Herrera *et al.*, 2005).

Na América Latina, um único estudo conduzido na Colômbia avaliou a resposta de anticorpos anti-PvDBP. Nesta área, considerada de baixa endemicidade, a presença de anticorpos anti-PvDBP detectados pela sorologia convencional aumentou em função da idade e do tempo de exposição (Michon *et al.*, 1998). Entretanto, o estudo colombiano foi conduzido em uma área onde grande parte da população era de origem africana. Conseqüentemente, o genótipo provavelmente DARC-negativo desta população pode ter mascarado a resposta imune a essa proteína, uma vez que a maioria dos indivíduos DARC negativos são refratários à infecção pelo *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976).

Atualmente, considera-se que um dos principais obstáculos no desenvolvimento de uma vacina contra a malária é a diversidade antigênica da região imuno-dominante dos antígenos candidatos (Berzins & Anders, 1999; Bolad & Berzins, 2000). O gene codificador para a região II da PvDBP (*dbpII*) é altamente polimórfico e varia geograficamente. Até o presente estudo, sequências do gene *dbpII* tinha sido obtidas apenas de isolados de *P. vivax* de El Salvador (Fang *et al.*, 1991), PNG (Tsuboi *et al.*, 1994; Xainli *et al.*, 2000; Cole-Tobian & King, 2003), Colômbia (Ampudia *et al.*, 1996) e Coréia do Sul (Kho *et al.*, 2001). O perfil de polimorfismo excessivo na região II da PvDBP tem sido atribuído à pressão seletiva na proteína, levando, assim, a uma variação alélica que funcionaria como mecanismo de escape do parasito à ação do sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, o polimorfismo intenso e a presença de diferentes alelos dificultam o desenvolvimento de uma vacina antimalárica, fato que enfatiza a necessidade de compreender como a diversidade genética relaciona-se com a imunidade natural.

JUSTIFICATIVA

No Brasil, a malária é um dos maiores problemas de saúde pública, com uma incidência anual de cerca de 600.000 casos, e com maior prevalência do *P. vivax*, que é responsável por cerca de 74% dos casos notificados (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2006). A maior parte dos casos de malária no Brasil é encontrada na região da Amazônia Legal, onde existe uma população migrante e dispersa, com pouco acesso ao diagnóstico e tratamento; esses fatores, associados à ausência de medidas de controle, constituem as maiores barreiras para o controle da doença no país. Dessa forma, estudos visando entender a resposta imune aos vários antígenos do parasito apresentam uma importância fundamental.

Como em todos os parasitos da malária, a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos do *P. vivax* requer a presença de receptores específicos presentes na superfície do eritrócito, para poder se desenvolver no sangue do hospedeiro vertebrado. A *Duffy binding protein* do *P. vivax* (PvDBP) é um ligante importante que participa na invasão do merozoíto em eritrócitos humanos, através da interação com o receptor DARC presente na superfície do eritrócito. A importância dessa proteína para garantir o parasitismo humano, bem como evidências que indivíduos DARC negativos são geralmente resistentes à infecção por este parasito (Miller *et al.*, 1976), fazem da PvDBP um antígeno fundamental para vacina antimalárica contra o *P. vivax*.

A PvDBP é provavelmente exposta na superfície do merozoíto durante o processo de invasão, o que permite sua ligação ao receptor e, importante do ponto de vista da resposta imune, torna-a acessível a anticorpos presentes no soro dos indivíduos. Como a PvDBP é uma molécula pouco abundante no parasito, e devido às limitações para o cultivo *in vitro* do *P. vivax*, estudos de resposta imune em populações humanas ainda são escassos, tendo sido realizados, principalmente, em áreas de alta transmissão de malária como a Oceania (Fraser *et al.*, 1997; Michon *et al.*, 2000; Xainli *et al.*, 2002, 2003). Esses estudos realizados demonstraram ainda que a resposta imune naturalmente adquirida contra a PvDBP inclui anticorpos que bloqueiam a interação entre o merozoíto e o eritrócito (Michon *et al.*, 2000). Entretanto, ainda não foi demonstrado se a resposta desses anticorpos inibitórios se correlaciona com a proteção naturalmente adquirida entre os indivíduos continuamente expostos à transmissão de malária.

No Brasil, bem como na maior parte das regiões onde o *P. vivax* é prevalente, os índices de transmissão são baixos e a infecção atinge pessoas de todas as idades. Nos últimos nove anos, com objetivo de se caracterizar a resposta imune a antígenos candidatos à vacina antimalárica, pesquisadores e estudantes do Laboratório de malária do IRR têm trabalhado em áreas endêmicas da Amazônia brasileira (Carvalho *et al.*, 1997, 1999; Braga *et al.*, 2002). A partir dessa experiência, e visto que dados sobre a resposta imune na malária ou contra antígenos do *P. vivax* são escassos, este projeto teve como proposta estudar os aspectos moleculares e imuno-epidemiológicos da PvDBP em várias regiões de transmissão de malária no Brasil.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar a resposta imune induzida pela *Duffy binding protein* do *Plasmodium vivax* (PvDBP) em indivíduos expostos a diferentes situações de transmissão de malária no Brasil.

Objetivos Específicos

- (i) Avaliar o perfil da resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP em indivíduos residentes em diferentes áreas de transmissão de malária da Amazônia brasileira;
- (ii) Determinar se anticorpos anti-PvDBP têm capacidade de inibir a interação entre o ligante do parasito (região II), e seu receptor presente na superfície da célula hospedeira;
- (iii) Avaliar se indivíduos expostos pela primeira vez à malária desenvolvem anticorpos IgG anti-PvDBP e, em caso positivo, se esses anticorpos têm a capacidade de inibir a interação ligante-receptor;
- (iv) Verificar a persistência da resposta de anticorpos anti-PvDBP na ausência de reinfecção;
- (v) Determinar a influência de alguns polimorfismos no domínio de adesão (região II da PvDBP) na resposta de anticorpos bloqueadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas Estudadas

1. Amazônia Legal

O presente estudo foi realizado com indivíduos expostos à malária em diferentes municípios da Amazônia, mais especificamente dos Estados do Pará, Mato Grosso, Amazonas e Amapá. Nos últimos anos, estudos imuno-epidemiológicos têm sido conduzidos nessas áreas, onde o nível de transmissão dos indivíduos expostos varia consideravelmente (Carvalho *et al.*, 1997, 1999; Braga *et al.*, 2002). Nestas áreas, os indivíduos são originalmente migrantes de outras partes do país, onde não existe a doença, e se infectam em atividades relacionadas principalmente à mineração ou agricultura. Mais recentemente, áreas de invasão na periferia de cidades como Manaus e Belém têm sido focos de transmissão de malária (**Figura 2**).



Figura 2. Condições de habitação em áreas rurais da Amazônia brasileira.

Na Amazônia Legal existem comunidades que apresentam história de longa exposição à malária, como é o caso de Terra Nova do Norte (TNN) e Apiacás (10-20 anos), MT, bem com história de exposição esporádica à malária (Belém, PA). Em uma das comunidades que apresentava história de longa exposição à malária (Apiacás, MT) também foram identificados indivíduos com malária assintomática (Fontes, 2001).

1.1. Voluntários e coleta de sangue

Parte do estudo foi realizado com amostras de soros/plasmas que se encontravam armazenados em um banco no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (IRR, FIOCRUZ), originadas de três áreas bem caracterizadas da Amazônia brasileira: (1) Belém/PA (n = 36), onde os indivíduos apresentavam história de exposição única à malária pelo *P. vivax*; (2) Terra Nova (TNN)/MT (n = 47), onde o nível de exposição era baixo, mas constante (~10 anos); e (3) Apiacás/MT, onde havia história de longa exposição à malária (~20 anos). Posteriormente, novas coletas foram realizadas nas novas áreas de interesse (Amazonas e Amapá) (Sousa *et al.*, 2006, *Artigo 5*), priorizando indivíduos com malária aguda. Dos voluntários selecionados para o estudo foi coletado sangue total (~10mL) obtido após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO 1**). Para a coleta dessas amostras, os critérios gerais de inclusão no estudo foram: (1) história de exposição prévia à malária; (2) ausência de sinais ou sintomas relacionados à malária grave; (3) idade ≥ 15 anos e, em caso do sexo feminino, (4) um indicativo de ausência de gravidez. De todos os indivíduos foram confeccionadas gotas espessas e esfregaços sanguíneos sendo que aqueles que apresentavam parasitos circulantes foram encaminhados para tratamento imediato nos serviços de saúde locais, onde a supervisão foi feita por médicos credenciados e que colaboram com a equipe do Laboratório de Malária do IRR há vários anos (Dr. C.J.F. Fontes, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT e Dr. J.M. Souza, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará). O sangue coletado foi utilizado para obtenção de soro/plasma e DNA.

Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (documentos 002/2002 e 07/2006) (**ANEXO 2**), de acordo com a resolução do Ministério da Saúde brasileiro 196/96, e pelo Comitê de Ética de Pesquisas envolvendo seres humanos da Organização Mundial da Saúde - OMS/WHO (SCRIHS).

2. Região extra-Amazônica

Entre os meses de abril e maio de 2003 foi identificado, pela Secretaria de Estado de Saúde 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* na localidade de Souza, município de Rio Manso, MG, área, até então, livre de transmissão da doença. O distrito de

Souza tem cerca de 1.100 habitantes e encontra-se situado a 64km de Belo Horizonte (região metropolitana) (**Figura 3**), nas margens de um dos braços da represa de Brumadinho, onde existe uma alta densidade do mosquito *Anopheles darlingi* (Cerbino *et al.*, 2004; Zumpano *et al.*, 2004) (**Figura 4**). A investigação epidemiológica realizada pelos órgãos encarregados de controlar o surto sugeriu que a transmissão se iniciou a partir de um único indivíduo (caso importado) que se infectou após visitar uma área endêmica de malária, no município de Humaitá, Estado do Amazonas (distância de 2.000km, aproximadamente, da região que ocorreu o surto). Vinte e cinco casos autóctones foram diagnosticados pela Coordenação Regional da Fundação Nacional de Saúde, FUNASA, sendo o surto prontamente controlado pelo tratamento dos doentes com antimaláricos (cloroquina + primaquina), e pela aplicação espacial e residencial de inseticidas residuais (cipermetrina). A ausência de novos casos desde o dia 21 de maio de 2003 demonstrou que o ciclo de transmissão foi interrompido, apesar de a vigilância epidemiológica ter continuado seu trabalho até o final do ano de 2003, devido ao alto potencial de recaídas de infecção por *P. vivax* observado na região (Cerbino *et al.*, 2004).

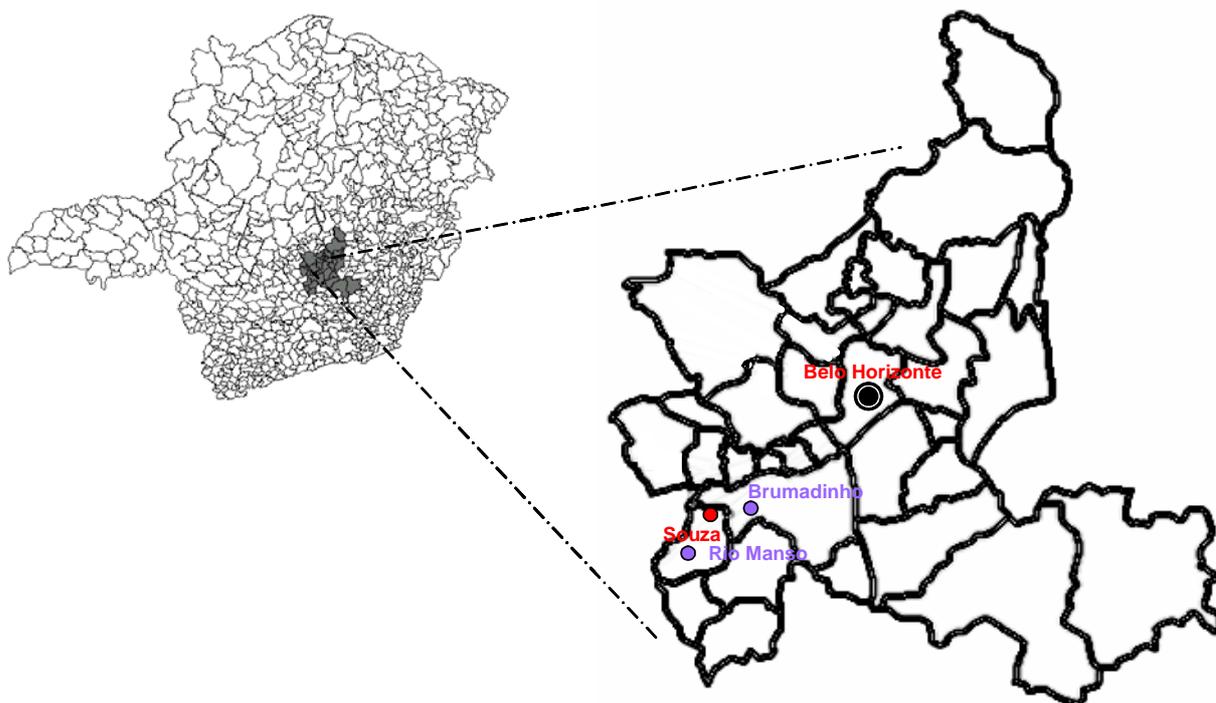


Figura 3. Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte indicando a localização do distrito de Souza, município de Rio Manso, MG.

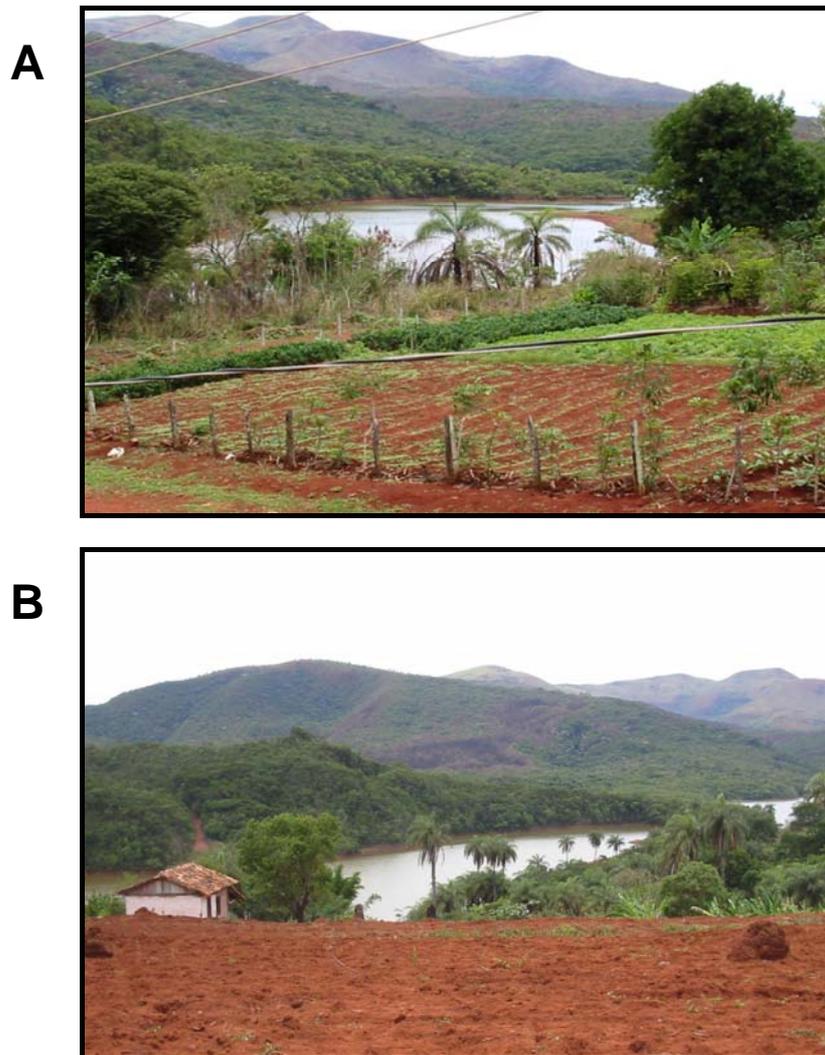


Figura 4. Foto ilustrando a região do surto de malária. Em **A**, atividades agrícolas, principal fonte de subsistência no distrito; em **B**, proximidade das residências ao criadouro de anofelinos localizado em um pequeno braço da barragem de Brumadinho.

2.1. Voluntários e coleta de sangue

Para participar do estudo, os indivíduos que se infectaram com o *P. vivax* (casos) na localidade de Souza deveriam preencher os seguintes critérios: (1) participação voluntária, através de consentimento por escrito; (2) residir na área de estudo e não ter visitado áreas endêmicas de malária; (3) apresentar idade maior ou igual a 15 anos; (4) em caso do sexo feminino, um indicativo de ausência de gravidez; (5) não apresentar incapacidade física e/ou mental, (6) não ser portador de doença aguda/crônica debilitante, e (7) ter disponibilidade de permanecer na área do surto por um período mínimo de doze meses. De acordo com os critérios acima citados, 15 indivíduos (média de 32 ± 13 anos) foram selecionados para o estudo. Foram incluídos ainda 18 indivíduos (não-casos) (média de 34 ± 19 anos) que, embora não apresentassem sinais e/ou sintomas de malária, foram considerados expostos ao risco de transmissão. Esses indivíduos que não adquiriram a doença eram parentes e/ou residiam em casas vizinhas aos casos. Todos os indivíduos que participaram do estudo foram entrevistados

através de um questionário (**ANEXO 3**). Durante a primeira visita realizada em maio de 2003 (tempo zero) foram coletados 5-10mL de sangue (EDTA) de todos os indivíduos selecionados. Quatro visitas adicionais aos domicílios e coletas de sangue foram realizadas, em intervalos trimestrais, sendo o sangue utilizado para obtenção de plasma e de DNA. No momento de cada coleta de sangue foram confeccionadas gotas espessas e esfregaços sanguíneos (diagnóstico parasitológico), e os indivíduos com parasitos circulantes foram encaminhados para tratamento imediato no serviço de saúde local.

Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (**ANEXO 2**), e pela Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, Superintendência Epidemiológica (Ofício N° 062/2003) (**ANEXO 4**).

3. Obtenção de plasmas e DNA

Amostras de sangue periférico foram coletadas diretamente em tubos a vácuo contendo EDTA (Becton Dickinson, Rutherford, NJ). Os tubos de sangue foram centrifugados a 500 x g, por 10min a 4°C, e os plasmas coletados estocados a -20°C até que fossem utilizados. O DNA dos indivíduos participantes foi extraído com um *kit* para purificação de DNA genômico (Puregene DNA Purification System, Gentra Systems, Minneapolis, MN), sendo os procedimentos realizados segundo instruções recomendadas pelo fabricante. As amostras de DNA extraídas também foram estocadas a -20°C até que fossem utilizadas.

4. Fenotipagem e genotipagem do receptor do antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC

A fenotipagem dos antígenos Fy^a e Fy^b foi realizada a partir da utilização de um teste de aglutinação disponível comercialmente (DiaMed DG, Cressier sur Morat, Switzerland). Nesse ensaio, amostras de sangue fresco foram adicionadas a cartões contendo anticorpos policlonais humanos anti-Fy^a ou anti-Fy^b, de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA dos indivíduos extraídos conforme descrito no item anterior foi utilizado para a genotipagem do antígeno do grupo sanguíneo DARC amplificando, para isso, os três alelos mais frequentes do locus *FY* (*FY*A*, *FY*B* e *FY*B^{ES}*) por meio da PCR convencional e, posteriormente, pela PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Para amplificação desses alelos pela PCR convencional foram utilizados iniciadores alelos-específicos (PCR-ASP) descritos anteriormente (Olsson *et al.*, 1998). Nesta, a *Taq* DNA polimerase termo-ativada foi substituída por uma enzima convencional visando-se reduzir o custo da reação. Na PCR-ASP foram utilizados 200ng de DNA genômico, 0,2µM de cada iniciador, 200µM dos dNTPs, 4mM de MgCl₂, 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, WI) em um volume final de reação de 25µL. As condições dos ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento dos iniciadores realizados em um termociclador automático PTC-100™ (MJ Research Inc., MA) foram as seguintes: desnaturação a 95°C/5min seguida por quatro ciclos de 95°C/1min, anelamento a

69°C/1min e extensão a 72°C/1min; 31 ciclos subsequentes de 95°C/1min, 68°C/1min e 72°C/1min, seguido por uma extensão final a 72°C/5min e uma finalização a 4°C.

Como controle da qualidade do DNA, o gene do grupo sanguíneo ABO de cada amostra de DNA foi amplificado por PCR utilizando, para isso, iniciadores direcionados contra uma sequência-alvo do exon 7 do gene do grupo sanguíneo ABO, um gene constitutivo humano (dados não mostrados) (Olsson *et al.*, 1998). A amplificação dos alelos *FY* e do gene do grupo sanguíneo ABO gerou produtos de 711pb e 419pb, respectivamente, foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado por brometo de etídeo (5µg/mL), e visualizados sob luz ultravioleta (UV) (Sambrook *et al.*, 1989).

As reações da *Real Time PCR* foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA), e continham 50-100ng de DNA genômico, 5µL de *SYBR[®] green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 10pmoles de cada iniciador (Biosynthesis). Os iniciadores utilizados para a genotipagem do antígeno do grupo sanguíneo DARC foram desenhados utilizando-se o programa v 2.0 *Primer express[®]* (Applied Biosystems) com algumas modificações. O polimorfismo foi posicionado na extremidade 3' dos respectivos iniciadores [RYA (5' AG CTG CTT CCA GGT TGG C₁CTC 3' e RYB (5' CTG CTT CCA GGT TGG C₂GT 3')], e utilizado com o mesmo iniciador senso *FY* (5' C TCA AGT CAG CTG GAC TTC GAA GAT 3'). Para detectar a mutação do promotor do gene *FY* dos alelos *FY*A^{ES}* e *FY*B^{ES}* os nucleotídeos polimórficos foram posicionados na extremidade 3' dos iniciadores FAB (5' CCC TCA TTA GTC CTT GGC TCT T₁TT 3') e FGATA (5' CCCGGGCCCCGCCG CCC TCA TTA GTC CTT GGC TCT T₂CTC 3'), sendo utilizados com o mesmo iniciador anti-senso RABGATA (5' A GGG GCA TAG GGA TAA GGG ACT 3'), visto que o polimorfismo que distingue os alelos *FY*A* e *FY*B* é de apenas um nucleotídeo. Devido a significativa homologia entre os iniciadores alelo-específicos, uma base exatamente anterior ao sítio polimórfico foi introduzida entre os iniciadores e o molde para impedir amplificação inespecífica. Além disso, foi adicionada uma cauda de C/G na porção 5' do iniciador FGATA, visando aumentar as diferenças de tamanho e temperatura de desnaturação entre os produtos obtidos. As reações foram baseadas em um PCR *multiplex*, onde em um mesmo tubo foram adicionados iniciadores que apresentavam diferentes temperaturas de desnaturação (*FY*/*RYA*; *FY*/*RYB*; *FY* RABGATA/ FGATA e RABGATA/ FAB). A amplificação e detecção da fluorescência foram realizadas no Sistema de Detecção de Sequência ABI PRISM[®] 7.000 (Applied Biosystems), sendo que as condições dos ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento dos iniciadores foram as seguintes: desnaturação a 95°C/10min seguida por 35 ciclos de 95°C/15seg e anelamento a 60°C/1min. Após amplificação, as temperaturas de desnaturação dos produtos amplificados foram determinadas a partir da curva de dissociação resultante de medidas contínuas de fluorescência (F) a 530nm, durante o qual a temperatura foi aumentando gradualmente de 60 a 95°C.

5. Proteínas recombinantes

5.1. Duffy binding protein de *P. vivax* (PvDBP)

O plasmídeo pGEX-2T contendo as sequências codificadoras da região II a IV (aa-177 a 815) da PvDBP foi gentilmente cedido pelo Dr. John Adams (Notre Dame University, Notre Dame, IN). Este plasmídeo (pGEX-2T + PvDBP_{II-IV}), que gera uma proteína de fusão com a glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) foi utilizado para transformar bactérias quimicamente competentes, *Escherichia coli* cepa DH5 α , conforme descrito anteriormente (Nishimura *et al.*, 1990) (Figura 5).

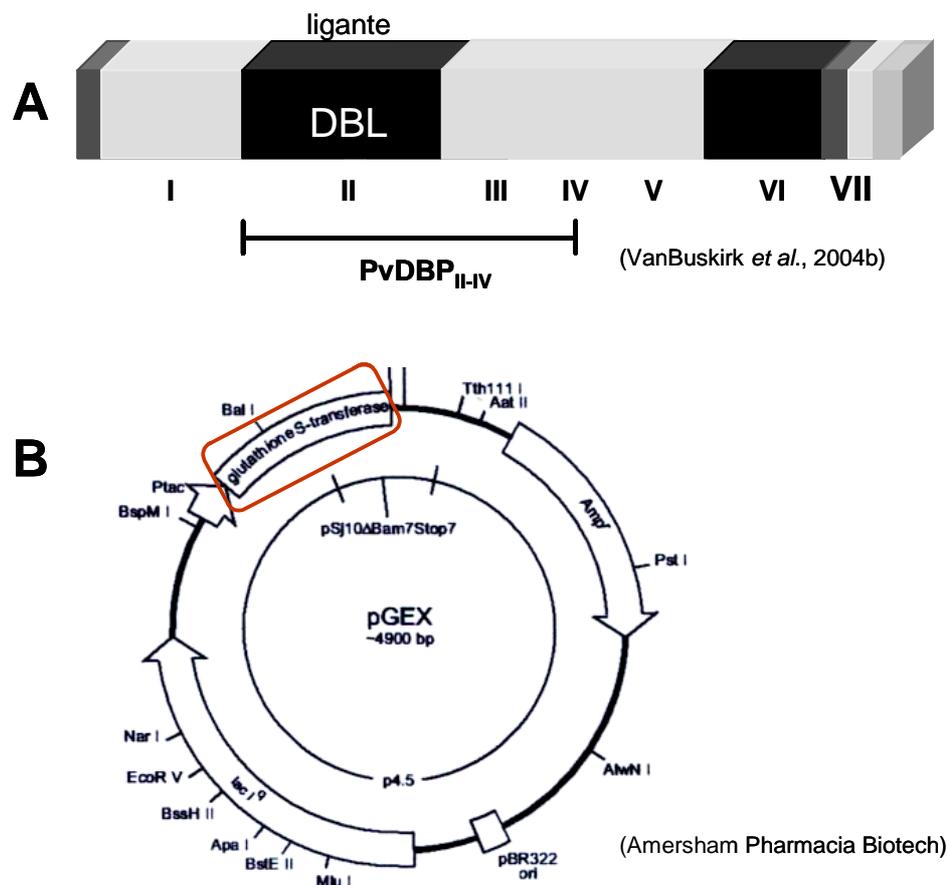


Figura 5. (A) Representação esquemática demonstrando a proteína recombinante PvDBP_{II-IV} que foi produzida, purificada e utilizada nos ensaios sorológicos de ELISA; (B) Plasmídeo utilizado na construção da proteína de fusão PvDBP_{II-IV}.

A expressão da proteína recombinante PvDBP_{II-IV} foi induzida a partir da adição de 0,1mM de IPTG (Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg, Germany) às cultura bacterianas. Nas nossas condições, a produção da proteína PvDBP_{II-IV} solúvel foi maior 3h após indução com IPTG (dados não mostrados). A proteína de fusão solúvel PvDBP_{II-IV} foi purificada das culturas bacterianas pelo método convencional de isolamento de proteínas de fusão com GST, utilizando

para isso, cromatografia de afinidade com uma matriz de *glutathione sepharose*[®] 4B (GS4B) (GST Purification Modules, Amersham Pharmacia), conforme recomendação do fabricante.

Entretanto, durante o processo de purificação da PvDBP_{II-IV}, foi observado que a proteína recombinante não estava sendo eluída na forma pura (**Figura 6A**). Um contaminante de aproximadamente 70kDa, provavelmente uma chaperonina de *E. coli*, era frequentemente co-purificado, e reagia cruzadamente com soros normais no ensaio de ELISA. Para remover o contaminante de 70kDa da PvDBP_{II-IV} (140kDa) foi utilizado um protocolo-padrão de eletroeluição em gel (Smith, 2002). Resumidamente, após eletroforese dos eluatos obtidos a partir da purificação da PvDBP_{II-IV} na coluna de afinidade GS4B, a banda de interesse correspondente à proteína de 140kDa foi excisada do gel, e eletroforéticamente eluída. Esse procedimento foi eficiente na obtenção da PvDBP_{II-IV} pura (**Figura 6B**), como requerida para ser utilizada nos ensaios sorológicos de ELISA.

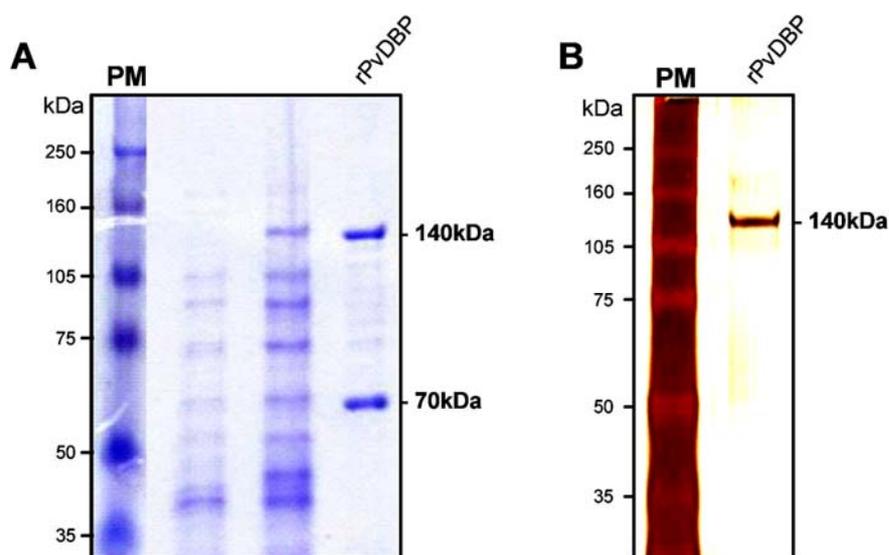


Figura 6. Obtenção da proteína rPvDBP_{II-IV}. Em **A**, gel SDS-PAGE a 8% demonstrando cultura bacteriana antes (-) e após (+) adição de IPTG, e o resultado da purificação realizada na coluna GS4B demonstrando a proteína rPvDBP_{II-IV} de 140kDa, e a contaminante de 70kDa, respectivamente. Em **B**, a rPvDBP_{II-IV} obtida após eletroeluição. As proteínas foram analisadas através de eletroforese em gel-SDS de poliacrilamida 8% corado por azul de coomassie (**A**), ou prata (**B**). PM = padrão de peso molecular.

5.2. Proteína de superfície do merozoíta 1 de *P. vivax* (PvMSP-1)

Em paralelo aos testes com a proteína PvDBP_{II-IV}, uma outra proteína recombinante de forma sanguínea do *P. vivax*, que representa a região C-terminal de 19kDa da proteína de superfície do merozoíta 1 (PvMSP-1₁₉), também foi avaliada nos ensaios sorológicos. A proteína foi gentilmente cedida pela Dra. Irene Soares (Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Universidade de São Paulo, Brasil). Os detalhes da construção dessa proteína de fusão com a GST, que representa os aminoácidos 1.616 a 1.704 da MSP-1 (cepa Belém) de *P. vivax* foram descritos anteriormente (Soares *et al.*, 1999b; Cunha *et al.*, 2001).

5.3. Outros antígenos

A proteína GST adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) foi utilizada como controle em todos os ensaios de ELISA, visto que as duas proteínas recombinantes testadas (PvDBP_{II-IV} e PvMSP-1₁₉) foram construídas em fusão com essa proteína.

6. Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} e anti-PvMSP-1₁₉

O ensaio de ELISA visando a detecção de anticorpos IgG foi realizado de acordo com método descrito anteriormente (Carvalho *et al.*, 1997), sendo as concentrações dos antígenos e as diluições dos anticorpos primários e secundários determinadas previamente por titulação. Resumidamente, placas de 96 poços (Maxysorp, Nunc, Denmark) foram sensibilizadas por 14 a 18h a 4°C com 5µg/mL de PvDBP_{II-IV} ou 1µg/mL de PvMSP1₁₉ diluídas em PBS 1X. O excesso da solução contendo os antígenos foi retirado por inversão, sendo as placas lavadas por três vezes com uma solução contendo PBS-tween 20 (Sigma-Aldrich) a 0,05% (PBS-T). A cada poço da placa foram adicionados 200µL da solução de bloqueio constituída por PBS-T e 5% de leite em pó desnatado. Após 1h de bloqueio a 37°C as placas foram lavadas três vezes com PBS-T, e incubadas com 100µL dos soros-testes, diluídos a 1:100 (PvDBP_{II-IV}) ou 1:80 (PvMSP-1₁₉) em tampão PBS-T contendo 1,5% de leite em pó (duplicatas). Após incubação, as placas foram lavadas por dez vezes e incubadas, nas mesmas condições, com 100µL/poço do conjugado anti-IgG humana ligada a peroxidase (específica para cadeia γ , Sigma-Aldrich) em uma diluição de 1:1.000. Após lavagem, as placas foram reveladas acrescentando-se 100µL/poço de uma solução contendo OPD (10mg/tablete) (Sigma-Aldrich) diluído em tampão citrato de sódio 0,1M pH 5,0 e 40µL de uma solução de peróxido de hidrogênio a 30% (Sigma-Aldrich). A reação foi interrompida após 15min pela adição de 50µL de uma solução de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica (D.O.) foi medida a 492nm a partir da leitura das placas em um leitor automático de ELISA (Stat Fax-2.100, Awareness Technology, Palm City, FL). A D.O. obtida utilizando o antígeno controle (GST) foi subtraída da D.O. do antígeno-teste (PvDBP_{II-IV} ou PvMSP-1₁₉) para que a D.O. específica fosse determinada.

A absorvância discriminante entre os resultados positivos e negativos foi previamente estabelecida pela média das absorvâncias produzidas por soros de 30 indivíduos nunca expostos a malária, acrescida de três desvios-padrões, resultando em um limite de positividade, ou *cut-off*, de 0,1 para ambas proteínas recombinantes testadas.

7. Ensaio funcional para detecção de anticorpos bloqueadores da interação DBP_{II}-DARC

7.1. Plasmídeos DBP_{II}-pEGFP

Os plasmídeos DBP_{II}-pEGFP utilizados nos ensaios funcionais para transfectar células COS-7 foram gentilmente cedidos pelo Dr. John Adams (Notre Dame University, Notre Dame, IN). Para obtenção desses plasmídeos, a região II da DBP (DBP_{II}) da cepa de referência de laboratório Sal-1 de *P. vivax* (Fang *et al.*, 1991) foi previamente subclonada no plasmídeo pRE4 (Chitnis & Miller, 1994). Posteriormente, essa construção contendo a região II da DBP foi clonada no plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA), que codifica uma proteína de fluorescência verde (GFP) usada como marcador de transfecção (Michon *et al.*, 2000), para ser utilizada como marcador de transfecção. Outras duas construções desse plasmídeo (DBP_{II}-pEGFP) foram produzidas a partir da sequência de isolados de *P. vivax* da Papua Nova Guiné (PNG) (PNG 7.18 e PNG 27.16), e também subclonadas no plasmídeo pEGFP-N1 como previamente descrito por VanBuskirk *et al.* (2004a). As variantes de DBP_{II}, ou os alelos PNG 7.18 e PNG 27.16, pertencem a uma família alélica que difere dentro da região do domínio crítico de ligação (região II) do clone de referência Sal-1 (Cole-Tobian & King, 2003). Os plasmídeos recombinantes utilizados nos ensaios funcionais foram purificados a partir da utilização de um *kit* de purificação de plasmídeo livre de endotoxina (Qiagen, Valencia, CA), conforme sugerido pelo fabricante.

7.2. Transfecção e ensaio funcional

Células COS-7 (*American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, VA) foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes utilizando-se lipofectamina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), como descrito por Michon *et al.* (2000), com modificações. Resumidamente, células COS-7 semeadas em placas de seis poços ($1,5 \times 10^5$ células/mL) foram transfectadas com plasmídeos e complexos de lipossomos (0,5µg/poço) em meio de cultura DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Rockville, MD) sem soro bovino fetal (SBF). Após 5-6h de exposição das células com o complexo lipossoma-DNA (37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade), o meio de transfecção foi substituído por meio DMEM contendo 10% SBF (Gibco), 2mM de L-glutamina (Gibco), 25mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 25mM de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco). No dia seguinte, o meio de cultura foi novamente substituído por meio fresco (DMEM 5%), e a eficiência da transfecção verificada por meio da visualização das células em um microscópio de fluorescência. Quarenta e oito horas após a transfecção, soros/plasmas-testes foram adicionados às placas, sendo essas incubadas por 1h a 37°C e 5% de CO₂. A diluição 1:40 foi escolhida porque em ensaios prévios, essa diluição apresentou uma melhor inibição da interação ligante-receptor quando diferentes soros foram testados. Para o ensaio de citoaderência, uma

suspensão de eritrócitos humanos O⁺ a 10% e DARC positivos diluídos em meio de cultura, foram adicionados às células semeadas em cada poço das placas (200µL/poço), e, incubadas por 2h a temperatura ambiente. Eritrócitos não-aderidos foram removidos por três lavagens com PBS 1X, ou DMEM sem SBF. A interação ligante-receptor foi quantificada através da contagem do número de rosetas visualizadas com a ajuda de um microscópio estereoscópio de fluorescência invertido e com contraste de fase (20 campos/poço, com aumento de 200x) (Nikon, Melville, NY). As rosetas foram consideradas positivas quando os eritrócitos cobriam $\geq 50\%$ da superfície das células COS-7. Para cada ensaio, *pool* de plasma de indivíduos não-respondedores a PvDBP no ELISA foram utilizados como controle negativo (100% de ligação). Os resultados foram expressos como porcentagem relativa de inibição, e calculados da seguinte forma: $100 \times (RC-RT)/RC$, onde RC representa a média do número de rosetas nas culturas-controle, e RT a média obtida nas culturas-teste.

8. Avaliação do polimorfismo da região II da PvDBP (DBP_{II}) através de sequenciamento do DNA

O DNA extraído de indivíduos com malária aguda foi utilizado para avaliar o polimorfismo presente na DBP_{II}. Para isso, iniciadores específicos (Sousa *et al.*, 2006, **Artigo 5**) foram utilizados visando-se amplificar um fragmento correspondente às posições 870-1.545 (aa 290-515) da DBP_{II}. Na reação, o gene *dbpII* foi amplificado utilizando-se a enzima *Taq* DNA polimerase *Platinum High Fidelity* (Invitrogen Life Technologies) visando-se reduzir possíveis incorporações errôneas de nucleotídeos normalmente observadas com a *Taq* DNA polimerase convencional.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% corado com de brometo de etídeo e visualizados sob luz UV (Sambrook *et al.*, 1989). Os amplicons foram purificados com o *kit QIAquick PCR purification* (Qiagen) segundo as instruções do fabricante, e as reações preparadas a partir do *kit* de sequenciamento *Thermo sequenase primer cycle sequencing* (Amersham Biosciences) utilizando-se 1µL do iniciador, até 5µL do DNA-molde e 4µL do *kit*. Se necessário, o volume da reação era completado com água para 10µL. O sequenciamento das amostras de DNA investigadas foi realizado no sequenciador automático de DNA MegaBace 500 (Amersham Biosciences).

Para análise do gene *dbpII*, as sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados de Souza, MG, foram analisadas pelo programa *Bioedit* (Biological Sequence Alignment Editor for windows, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA) (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) e alinhadas pelo programa *Clustal W* (EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) (clustalW.genome.jp). Para identificar os resíduos polimórficos presentes no domínio ligante da DBP_{II} descritos anteriormente (VanBuskirk *et al.*, 2004a), foram utilizados como referência as

sequências do clone Sal-1 de *P. vivax* (Fang *et al.*, 1991) e de dois isolados da PNG (VanBuskirk *et al.*, 2004a).

9. Análise dos dados

Para identificar se existiam associações entre as variáveis níveis de exposição, tempo decorrido desde o último episódio de malária e presença de infecção assintomática com a resposta imune a PvDBP foram utilizadas informações já armazenadas em um banco de dados construído no programa Epi-Info (*software* versão 2002, *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC, Atlanta, GA) (*Artigo 1*). Os dados correspondentes ao surto autóctone de Souza também foram armazenados em um banco de dados semelhante.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Epi-Info 2002 (CDC) ou no Mini-Tab versão 13.1 (MiniTab Inc., State College, PA). As diferenças entre as médias de absorbâncias de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} e anti-PvMSP-1₁₉ foram analisadas pelo teste *t* de Students' (para duas amostras) ou por análise de variância (ANOVA) (para mais de duas amostras), sendo a diferença entre os grupos identificada pelo teste de Tukey. A transformação logarítmica foi realizada quando os dados não apresentaram distribuição normal. Após a transformação, quando essa distribuição continuou não se apresentando normal, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

A diferença entre proporções de indivíduos que se apresentavam reativos no teste de ELISA, e a avaliação dos alelos funcionais do antígeno DARC foram avaliadas pelo teste qui-quadrado (χ^2), χ^2 corrigido por Yates, ou teste de Fisher quando o valor esperado foi menor que cinco. Para avaliar diferença entre proporções, também foi utilizado o teste χ^2 para tendência linear. Diferentes diluições de soros dos indivíduos testados nos ensaios funcionais foram avaliadas pelo teste não-paramétrico Wilcoxon *Rank Sum test* (Mann-Whitney) Em todas as análises realizadas no decorrer desse estudo, o nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Os resultados encontram-se descritos em artigos publicados e/ou submetidos à publicação em revistas indexadas. Os três primeiros artigos estão diretamente relacionados aos objetivos específicos propostos. Os dois outros artigos referem-se a metodologias que contribuíram para responder os objetivos específicos (iii) e (v). Os artigos serão apresentados conforme a ordem abaixo:

1. **Cerávolo IP**, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJF, Brito CFA, Souza JM, Kretli AU, Adams JH, Carvalho LH 2005. Anti-*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 72: 675-681.
2. **Cerávolo IP**, Souza-Silva FA, Fontes CJF, Braga EM, Madureira AP, Kretli AU, Souza JM, Brito CFA, Adams JH, Carvalho LH. Inhibition properties of the response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Trabalho submetido.**
3. **Cerávolo IP**, Sousa TN, Souza-Silva FA, Sanchez BAM, Cardoso JB, Adams JH, Brito CFA, Carvalho LH. Antibody responses to the Duffy binding protein after a single *Plasmodium vivax* malaria transmission event in a non-malarious area. **Trabalho a ser submetido.**
4. TN Sousa, BAM Sanchez, **Cerávolo IP**, LH Carvalho, CFA Brito 2007. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. **Vox Sanguinis** 92: 373-380.
5. Sousa TN, **Cerávolo IP**, Fontes CJF, Couto A, Carvalho LH, Brito CFA. 2006. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. **Molecular & Biochemical Parasitology** 146: 251-254.

ANTI-*PLASMODIUM VIVAX* DUFFY BINDING PROTEIN ANTIBODIES MEASURE EXPOSURE TO MALARIA IN THE BRAZILIAN AMAZON

ISABELA P. CERÁVOLO, OSCAR BRUÑA-ROMERO, ÉRIKA M. BRAGA, COR J. F. FONTES, CRISTIANA F. A. BRITO,
JOSÉ M. SOUZA, ANTONIANA U. KRETTLI, JOHN H. ADAMS, AND LUZIA H. CARVALHO

Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil; Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil; Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana

Abstract. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) is functionally important in the erythrocyte invasion process and provides a logical target for vaccine-mediated immunity. In the current study, we demonstrated that DBP is naturally immunogenic in different populations of the Brazilian Amazon, and the proportions of DBP IgG positive subjects increased with exposure to malaria, reaching a peak in those subjects with long-term exposure (> 15 years) in the Amazon area. This profile of antibody response was significantly different from the one observed for the *P. vivax* merozoite surface protein 1 (MSP1₁₉), which was relatively uniform in areas with markedly different levels of malaria transmission. In a small sample of adults with symptomless *P. vivax* infection, we could not detect any significant correlation between antibodies against these *P. vivax* proteins and asymptomatic infection. Our study provided an additional insight by demonstrating cumulative exposure as a determinant that acts independently of host age in generation of anti-DBP IgG response.

INTRODUCTION

Of the four species of malaria parasites known to infect humans, *Plasmodium vivax* has achieved the widest global distribution and is responsible for > 50% of all malaria cases outside of Africa, including Asia, the Middle East, the Western Pacific, and Central and South America.^{1,2} Certain features of the transmission biology of *P. vivax* give this species greater resilience than *Plasmodium falciparum*; therefore, as control measures become more effective, the residual malaria burden is increasingly pointing to *P. vivax*.¹

Plasmodium vivax merozoites initiate erythrocyte invasion by an active process mediated by parasite ligands that interact with erythrocyte receptors. A key step in the host cell invasion is the irreversible commitment of the merozoite to the selected host cell by the formation of a tight junction between parasite and erythrocyte.³ In the case of *P. vivax*, junction formation is mediated by the Duffy binding protein (DBP) and its receptor on erythrocytes, the Duffy blood group antigen,^{4–6} also known as Duffy receptor for chemokines (DARC).⁷ Individuals that lack the Duffy antigen on their erythrocytes are naturally resistant to *P. vivax*.⁸ Thus, DBP is an important vaccine candidate against the asexual stages of the parasite.

DBP is a protein of 140 kDa that belongs to a family of homologous Duffy binding-like erythrocyte binding proteins located within the micronemes of *Plasmodium* merozoites.^{9,10} DBP is likely to be exposed on the merozoite surface during invasion, enabling it to bind to its receptor but also making it accessible to serum antibodies. Because DBP is a molecule of very low abundance in the parasite, and because of limitations in culturing *P. vivax* parasites, the available data on immune responses to DBP in human population are still limited.^{11–14} In Latin America, a single study on the prevalence of anti-DBP antibodies has been carried out so far.¹² However, this study cannot be extrapolated to other areas of Latin America because it was performed in an area on the Pacific coast of Colombia where most people are probably resistant to *P. vivax* infection; that is, 93% of them were black of African origin (Duffy negative trait).¹²

In Brazil, like in most regions where *P. vivax* is prevalent,

malaria transmission rates are low, and infections affect people of all ages.¹⁵ The distribution of malaria in the Amazon region is not homogeneous, and it is concentrated in areas with uncontrolled establishment of rural and mining settlements, being associated with poorly maintained dwellings and favorable transmission conditions.¹⁶ During the past 8 years, our group has conducted a number of immuno-epidemiologic studies in different areas of the Brazilian Amazon.^{17–20} Benefiting from those studies, we now analyzed the immunologic response to DBP in the Amazon area as a contribution to current efforts on vaccine development against *P. vivax*. For this purpose, we have compared the profiles of antibody responses to DBP as well as to another vaccine candidate, the 19-kDa C-terminal fragment of *P. vivax* merozoite surface protein 1 (MSP1₁₉), among individuals from three well-characterized areas of the Brazilian Amazon where malaria transmission levels are markedly different.

MATERIALS AND METHODS

Study areas and subjects. We analyzed subjects from three previously well-characterized areas of the Brazilian Amazon^{19–21} who had been exposed to different levels of malaria transmission (Table 1). The first group consisted of 36 individuals living in Belém, the capital of the State of Pará. They had acquired a single episode of *P. vivax* malaria after short trips to islands located near the capital (1 to 6 hours by boat) where levels of malaria transmission are low and unstable. The second group was composed of 47 individuals who had lived for about 10 years in a small rural community of Mato Grosso (MT) State, Terra Nova do Norte (TNN), where malaria is endemic with intermittent transmission. These individuals reported a variable number of previous malaria episodes caused by *P. falciparum* and/or *P. vivax*. The third group, named Apicás group, consisted of 37 migrant miners who had lived for approximately 17 years in several gold-mining areas of the Brazilian Amazon where malaria is endemic. At the time of blood collection, these subjects were living in the municipality of Apicás, MT, which is considered mesoendemic for malaria and where transmission is continu-

TABLE 1

Demographic and epidemiologic data of the subjects exposed to endemic malaria transmission in the Brazilian Amazon

Characteristics	Locality		
	Belém (N = 36)	TNN (N = 47)	Apiacás (N = 37)
Age (mean ± SD)*	32 ± 19	40 ± 28	32 ± 8
Time of malaria exposure (mean ± SD)	<1 month	10 ± 5 years†	17 ± 11 years†
Number of previous malaria episodes	1	1–10	>10
Exposure to malaria transmission	Sporadic	Variable	Constant
Previous malaria episodes by	Pv	Pv and/or Pf	Pv and/or Pf

Pv = *P. vivax*, Pf = *P. falciparum*.

* Differences not significant (F = 1.47, P = 0.234).

† Significant differences between TNN and Apiacás (t = -3.16, P = 0.003).

ous.¹⁹ These workers were constantly moving inside the Amazon area and have high exposure to *Plasmodium*-infected mosquitoes. As a consequence, those gold miners had experienced a high number of previous malaria episodes (Table 1). At the time of blood collection, the three groups studied (Belém, TNN, and Apiacás) consisted of aparasitemic individuals, as assessed by microscopic examination, who were specifically treated for malaria, 2 to 5 months prior to the time of blood sample collection.

A previous study on the prevalence of malaria in Apiacás has suggested that gold miners develop resistance to clinical malaria (Fontes CJF and others, unpublished data). In this area, among 527 gold miners characterized and followed-up by C. J. F. Fontes, asymptomatic malaria infection was identified in 38 (7.2%) individuals, 17 of them being infected with *P. vivax*, 19 with *P. falciparum*, and 2 with *Plasmodium malariae*. In the current study, we selected 15 out of 17 gold miners with asymptomatic *P. vivax* infection and 13 out of 15 with symptomatic *P. vivax* infection. Asymptomatic malaria infection was defined as absence of classic malaria symptoms, such as fever, headache, muscle and/or joint pain, for at least 72 hours after parasite detection. The mean age of these 28 enrollees was 32 ± 10 years, and most of them were males who had reported a high number of previous malaria episodes.

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 002/2002), according to the Resolution of the Brazilian Council on Health-CNS 196/96, and by the WHO Secretariat Committee for Research Involving Human Subjects (SCRIHS).

Recombinant antigens. Recombinant DBP (rDBP) was expressed in prokaryotic system and purified using only minor modifications of the protocol described previously.¹¹ Briefly, a portion of DBP from amino acids 177 to 815 that includes regions II to IV (DBP_{II-IV}) was inserted in frame with glutathione S-transferase (GST) in the expression vector pGEX-2T.¹¹ The GST fusion protein was purified directly from bacterial lysates through affinity chromatography using matrix glutathione sepharose 4B, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Even though the fusion protein was cleaved by thrombin treatment, one contaminant of 70 kDa, probably one bacterial chapero-

nin, was frequently co-purified with the rDBP (data not shown). Efficient removal of the chaperonin from the rDBP was achieved using a standard protocol for gel electroelution, as described.²² Briefly, after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the Sepharose column-eluted proteins, the band of interest was excised from the gel, and protein was electrophoretically eluted from the minced gel. This procedure was very effective to obtain purified rDBP, as required for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A recombinant protein representing the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1 of *P. vivax* (rMSP1₁₉) was kindly provided by Dr. Irene Soares (Universidade de São Paulo, SP, Brazil). Detailed construction of this GST fusion protein, which represents the amino acids 1616–1704 of the MSP-1 (Belém strain) of *P. vivax*, has been described elsewhere.^{23,24}

Antibody measurement. The ELISA for total IgG antibodies was carried out according to the method described elsewhere,¹⁷ the optimal antigen concentration and the dilution of the primary and secondary antibodies determined empirically by cross-titration. Briefly, 96-well plates (Maxysorp, Nunc, Denmark) were coated overnight at 4°C with 5 µg of rDBP or 1 µg rMSP1₁₉ per milliliter in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), rinsed in wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS), and incubated for 1 hour in blocking buffer (5% skim milk in wash buffer). After rinsing, the antigen-coated wells were incubated for 1 hour with duplicate serum samples diluted 1:100 (rDBP) or 1:80 (rMSP1₁₉) in 1.5% skim milk in wash buffer, rinsed again, and incubated for 1 hour at 37°C with peroxidase-conjugated anti-human IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The presence of bound IgG was detected using *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) as substrate (Sigma-Aldrich) and reading the absorbance at 492 nm using a microplate reader (Stat Fax-2100, Awareness Technology, Palm City, FL). For the recombinant antigens, rDBP and rMSP1₁₉, the final optical density (OD) was calculated by deduced OD obtained with purified GST (Sigma-Aldrich), used as antigen control. For both antigens, the threshold of positivity was an OD value of 0.1, which was based on the mean plus three standard deviations (SD) reactivity of sera from 30 nonexposed subjects. For all test samples, both positive and negative control samples were added to each plate, and the reaction was stopped such that ODs varied less than 10% between test plates.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Epi-Info 2002 software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) or MiniTab statistical software (Minitab Inc., State College, PA). Differences in means were tested by Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* test to identify the significant differences between groups. The log-transformed data were applied for situations where analysis of variance normality assumption was not applied. Differences in proportions were evaluated by the Yates' χ^2 (χ^2) or Fisher's exact tests and analysis for linear trend in proportions by χ^2 for trends (χ^2 trend). *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

To investigate the effect of exposure to malaria transmission on levels of antibodies to the rDBP, we studied individu-

als from three well-characterized areas of the Brazilian Amazon. The proportions of rDBP IgG positive subjects increased with exposure to malaria transmission (Table 2). The highest IgG seroreactivity against rDBP was found among gold miners from Apicás (65%) who had long-term exposure to malaria. The group who had experienced a single *P. vivax* infection (Belém) had very low response to rDBP (14%). The levels of IgG antibodies against rDBP were also associated with malaria exposure, as the greatest levels were observed in gold miners from Apicás (Figure 1A). In contrast, the proportions as well as the levels of IgG antibodies against rMSP1₁₉ were not correlated with exposure (Table 2, Figure 1B), the protein being immunogenic to a large proportion of individuals (66–73%).

Because individuals from TNN had experienced a variable number of previous episodes of clinical malaria, we reasoned that individuals who had been infected multiple times with malaria in TNN should exhibit higher frequency of antibodies against rPvDPB than those who had been single-infected. Eighteen (49%) of 37 individuals who had reported multiple infections developed anti-rDBP antibodies (Figure 2); on the other hand, none of the individuals who had reported a single malaria infection had antibodies that recognize the rDBP. The rMSP1₁₉ antibody response was similar in both groups (Figure 2).

In a further analysis, individuals from Apicás and TNN who had been exposed to several previous malaria episodes were analyzed according to their last malaria episode, whether by *P. vivax* or *P. falciparum*. In both cases, the results show a non-significant tendency toward increased prevalence of anti-rDBP antibodies among individuals whose last infection was by *P. vivax* ($P > 0.05$ for all statistical comparisons) (Figure 3). The frequency of antibodies against the rMSP1₁₉ was similar between *P. vivax* and *P. falciparum* groups (data not shown).

We also analyzed individuals acutely infected with *P. vivax* in Apicás who had ($N = 13$) or not ($N = 15$) developed clinical malaria after a follow-up of 72 hours. For both recombinant proteins, antibody response was higher in individuals with asymptomatic infection than in those suffering clinical symptoms of malaria, even though this difference was not of statistical significance ($P > 0.05$ for all comparisons) (Figure 4).

DISCUSSION

Direct evidence for naturally acquired antibodies to DBP was first demonstrated in residents of a highly endemic region in Papua New Guinea (PNG).¹¹ This observation was subse-

TABLE 2

Antibody response to the rDBP and rMSP1₁₉ in three groups of individuals exposed to different situations of malaria transmission (sporadic, variable, constant)

Antibody response to	Locality			χ^2 linear trend, <i>P</i>
	Belém (sporadic)*	TNN (variable)	Apicás (constant)	
rDBP	5/36 (14%)†	18/47 (38%)	24/37 (65%)	19.75, $P < 0.0001$
rMSP1 ₁₉	25/35 (71%)	31/47 (66%)	27/37 (73%)	0.024, $P = 0.877$

* Classified as described in Table 1.

† Number of individuals with a positive antibody response, no./total (%).

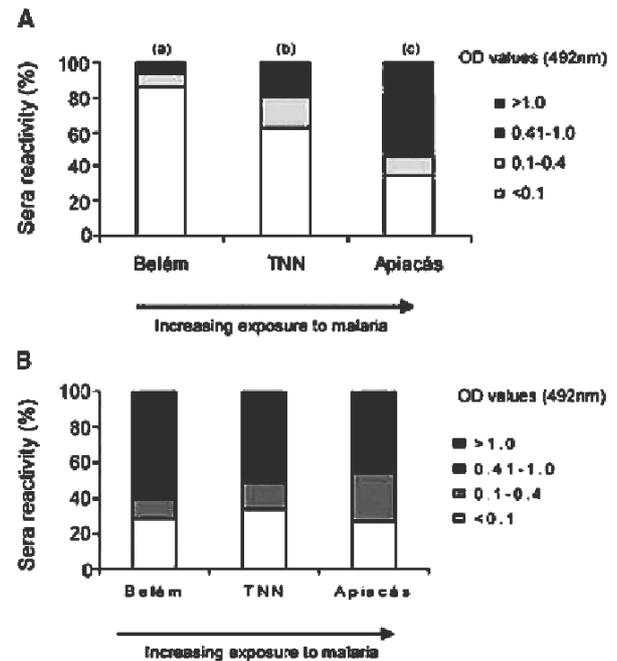


FIGURE 1. Effect of exposure to malaria transmission on levels of antibodies to the rDBP (A) or rMSP1₁₉ (B). IgG antibody responses are expressed as optical density (OD) detected by ELISA in sera from adults living in three areas of the Brazilian Amazon, which have different levels of malaria transmission (Apicás > TNN > Belém). For both proteins, the threshold of positivity was an OD value of 0.1 (mean \pm 3 standard deviations of unexposed controls subjects). Different letters on the top of the figure indicate significantly different means ($P < 0.05$) determined by analysis of variance with Tukey's high significance degree *post hoc* test.

quently confirmed in a low-endemic *P. vivax* malaria region in Colombia, where 40% of the individuals displayed specific antibodies to the PvDPB.¹² Recently, data from a study in PNG have identified four dominant B-cell epitopes in the cysteine-rich ligand domain (region II) of the protein.¹⁴

In the current study, we have demonstrated that a recombinant protein containing region II-IV of the DBP (rDBP) is immunogenic in different populations of the Brazilian Amazon. In these areas, the prevalence and levels of antibodies to the rDBP showed marked differences according to the exposure to malaria transmission; higher antibody levels were associated with higher exposure to transmission. Thus, the frequency of responders to the rDBP was higher (65%) among those subjects with a long-term exposure to malaria in Apicás when compared with subjects less exposed, including those sporadically exposed in Belém area (14%).

Although this recombinant protein was immunogenic in different populations of the Amazon area, we observed an absence of response to PvDBP in a large proportion of the individuals studied. The consistently significant percentage of apparent nonresponders suggests that the PvDBP is a poor immunogen.¹¹ However, at this time, we cannot exclude that part of this nonresponsiveness was due to the fact that some conformational epitopes could not be properly represented in our recombinant protein. In fact, a previous study in PNG demonstrated that acute-phase serum from initial *P. vivax* infection recognizes conformational epitopes of PvDBP.¹⁴

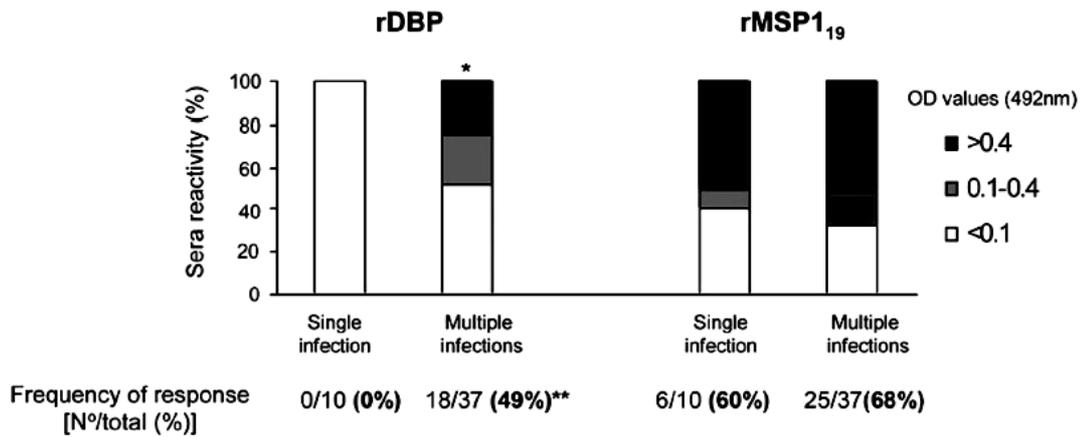


FIGURE 2. Antibody response to the rDBP and rMSP1₁₉ detected in sera of individuals from Terra Nova do Norte (TNN) who had experienced a single malaria episode (single-infection) or a variable number of previous malaria episodes (multiple infections). IgG antibody responses are expressed as optical density (OD), as described in the legend of Figure 1. Values on the bottom of the figure represent the overall frequency of response for each antigen. For rDBP, there was a significant difference between single-infection and multiple-infections groups (**t* = 3.42, *P* < 0.001 for log-transformed OD values; ***P* < 0.05 for proportions compared by Fisher's exact test).

Previous studies demonstrate that anti-DBP antibodies increased significantly with age, suggesting a possible boosting of the DBP antibody response due to accumulated age-related exposure.^{11,14,25} Because host age affects both the quantitative and qualitative nature of the immune response to *Plasmodium* antigens,^{26,27} those studies carried out in highly endemic areas of PNG could not differentiate the effects of age from those of cumulative exposure. Because the groups studied in Belém, TNN, and Apicás were comparable with respect to their age and gender (most adults, males), our study allows a separation of the two effects, age and cumulative malaria exposure. We conclude that cumulative exposure, independent of host age, apparently represents a key determinant of the quantitative nature of the IgG response to

P. vivax DBP. However, at this time, we cannot exclude an additional effect of the host age in this antibody response.

As expected, the serological responses to rDBP and rMSP1₁₉ were different in these samples from the Brazilian Amazon. Whereas rDBP fitted a pattern expected for a molecule that is less immunogenic or has restricted exposure to the host immune response,¹⁰ rMSP1₁₉ appeared to be highly immunogenic in the Amazon area. Also, there appeared to be little boosting effect to MSP1₁₉ from accumulated malaria exposure, a result that corroborates previous findings in PNG.¹¹ Several reasons, not mutually exclusive, may account for the fact that a larger proportion of sera, including those from single-infected individuals, reacted with *P. vivax* MSP1₁₉. First, the *P. vivax* MSP1₁₉ encoding DNA displays

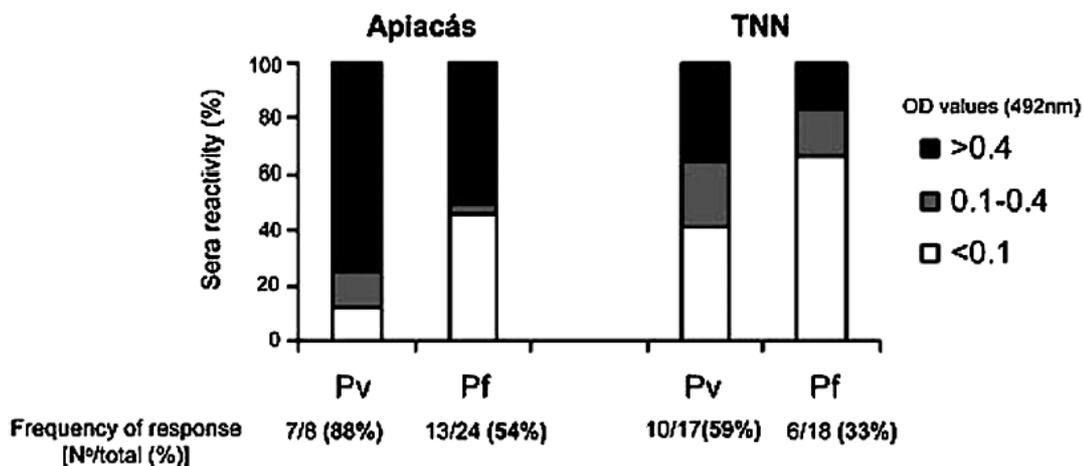


FIGURE 3. Antibody response to the rDBP detected in sera of individuals from Apicás or TNN whose last malaria episode was by *P. vivax* (Pv) or *P. falciparum* (Pf). In TNN, only individuals who had reported a variable number of previous episodes of malaria were included for analysis; at the time of blood collection, all individuals were a parasitemic. IgG antibody responses are expressed as optical density (OD), as described in the legend of Figure 1. Values on the bottom of the figure represent the overall frequency of response for each group. Differences in mean OD values between Pv and Pf groups were not statistically significant (*t* = 0.12, *P* = 0.906 for Apicás; and *t* = 1.50, *P* = 0.142 for TNN). Also, there was no significant differences in proportions (Fisher's exact test, *P* = 0.100 for Apicás; $\chi^2_{\text{yates}} = 1.38$, *P* = 0.240).

ANTIBODIES TO *P. VIVAX* DBP IN THE BRAZILIAN AMAZON

679

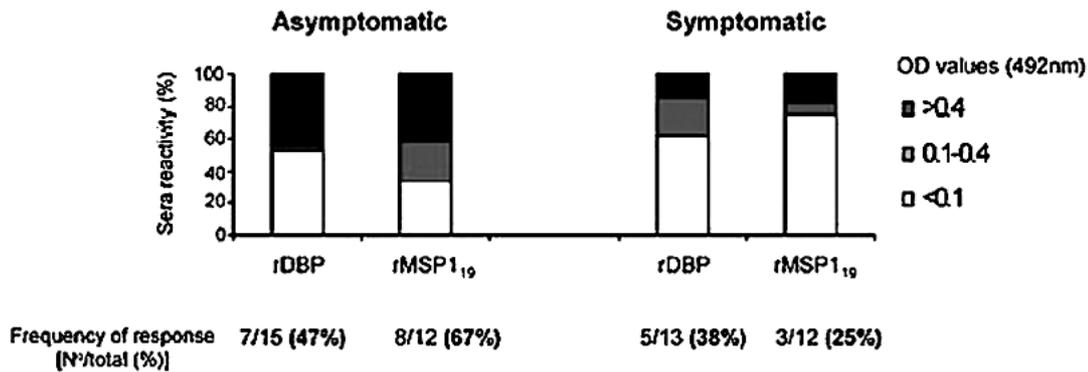


FIGURE 4. Antibody response to the rDBP and the rMSP1₁₉ among 28 individuals infected with *P. vivax* in Apicás who had ($N = 13$) or not ($N = 15$) developed symptomatic malaria. IgG antibody responses are expressed as optical density (OD), as described in the legend of Figure 1. Values on the bottom of the figure represent the overall frequency of response for each group. Differences in mean OD values between asymptomatic and symptomatic groups were not statistically significant ($t = 1.29$, $P = 0.209$ for rDBP; and $t = -2.0$, $P = 0.06$ for rMSP1₁₉). Also, there were no significant differences in proportions ($\chi^2_{\text{Yates}} = 0.00$, $P = 0.950$ for rDBP; and $\chi^2_{\text{Yates}} = 2.69$, $P = 0.101$ for rMSP1₁₉).

very limited allele polymorphism in different regions of the world.^{24,28,29} Second, DNA sequences encoding *P. vivax* MSP1₁₉ are less variable compared with equivalent regions of other species of malaria parasites such as *P. falciparum*.²⁴ Consistent with this notion, our previous results in the Amazon area demonstrated that antibody response against a recombinant *P. falciparum* MSP1₁₉ increased with the number of infections.¹⁹ Third, despite the existence of two allelic forms of MSP1₁₉, antibodies are directed mainly to conserved epitopes present in both allelic forms.²⁴ Consequently, a high frequency of responders to the C-terminal region of *P. vivax* MSP1 has also been described in other surveys performed in Brazil,^{30,31} Papua New Guinea,¹¹ and Korea.³²

We detected a non-significant tendency toward an increased prevalence of anti-DBP antibodies among individuals whose last infection was by *P. vivax*. In a follow-up of a population exposed to a *P. vivax* malaria outbreak, outside of the Amazon area, we have found that individuals serologically negative to the rDBP became positive after a *P. vivax* relapse (I. P. Cerávolo and L. H. Carvalho, unpublished results). These results suggest that boosting of the anti-DBP antibody response is achieved at the time of a new *P. vivax* episode. Because *P. vivax* relapses in Brazil are usually caused by the same parasite strain of the initial infection, at this point we cannot rule out the possibility that a booster with DBP needs to be strain-specific.

In the Brazilian Amazon area, instability of transmission is the dominant feature of malaria.¹⁵ The exposed populations consist of migrants mostly from malaria-free areas. In these individuals, the infection is generally accompanied by clinical symptoms of variable degrees of intensity. Nevertheless, during the past few years, epidemiologic studies carried out among individuals with long-term exposure to malaria in Brazil clearly shown the existence of symptomless infections by *P. vivax*.^{33,34} In Apicás area, asymptomatic malaria infections were identified among 7% of the gold miners followed for up to 2 months (Fontes CJF and others, unpublished results). Although the protective nature of the anti-rDBP antibody response was not the focus of the current work, the serum samples available from clinically and parasitologically defined subjects in Apicás offered an excellent opportunity to correlate asymptomatic malaria and the IgG antibody response.

When we divided the *P. vivax* blood-smear positive individuals from Apicás into asymptomatic ($N = 15$) and symptomatic ($N = 13$) groups, the former group had a higher IgG response against rDBP and rMSP1₁₉ than did the symptomatic group. Although this observation failed to reach the level of statistical significance, it is in line with the results of a previous study in PNG, which shows an increase in the antibody response to DBP with age, concomitant with a decline in the prevalence and intensity of *P. vivax* infection.¹⁴ However, the low number of asymptomatic infections analyzed in our study precludes any strong conclusion about the existence of an association between antibodies to DBP and the development of clinical malaria. Unfortunately, the size of our sample could not be increased in Apicás area; the difficulties for geographical access and the political conflicts, which often affect the gold-mining areas of the Brazilian Amazon, hampered the continuation of our study there. Furthermore, a failure to see a closer correlation between anti-DBP and protection against clinical malaria may have occurred because not all anti-DBP antibodies seem to have a functional role in inhibiting the interaction of DBP with erythrocytes; up to now, this anti-functional antibody response was demonstrated only in highly endemic regions of PNG,^{25,35} which is representative of only some tropical regions where *P. vivax* is prevalent.

In conclusion, we have demonstrated cumulative exposure as a determinant that acts independently of host age in generation of anti-DBP IgG responses among Brazilian migrants from the Amazon area. Studies are in progress to clarify further whether individuals in Brazil acquire antibodies that have the ability to block erythrocyte cytoadherence to DBP.

Received August 17, 2004. Accepted for publication December 21, 2004.

Acknowledgment: The authors thank Dr. Irene Soares, Universidade de São Paulo, SP, Brazil, for kindly providing the recombinant protein rMSP1₁₉.

Financial support: This work was supported by the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), the Brazilian National Research Council (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Authors' addresses: Isabela P. Cerávolo, Cristiana F. A. Brito, Antoniana U. Krettli, and Luzia H. Carvalho, Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, CP 1743, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. Oscar Bruña-Romero and Érika M. Braga, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Cor J. F. Fontes, Hospital Júlio Muller, Universidade Federal de Mato Grosso, Rua L s/n, Jardim Alvorada, 78070-150 Cuiabá, MT, Brazil. José M. Souza, Instituto Evandro Chagas, Av. Almirante Barroso 492, 66090-000 Belém, PA, Brasil. John H. Adams, Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, P.O. Box 369, Notre Dame, IN 46556-0369.

Reprint requests: Luzia H. Carvalho, Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil, Telephone: 55-31-32953566, Fax: 55-31-32953115, E-mail: lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br.

REFERENCES

- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R, 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64 (Suppl): 97-106.
- Carter R, Mendis KN, 2002. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 15: 564-594.
- Miller LH, McAuliffe FM, Johnson JG, 1979. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Prog Clin Biol Res* 30: 497-502.
- Wertheimer SP, Barnwell JW, 1989. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol* 69: 340-350.
- Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH, 1991. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol* 44: 125-132.
- Adams JH, Fang X, Kaslow DC, Miller LH, 1992. Identification of a cryptic intron in the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 56: 181-183.
- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH, 1993. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 261: 1182-1184.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH, 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295: 302-304.
- Barnwell JW, Wertheimer SP, 1989. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog Clin Biol Res* 313: 1-11.
- Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, Miller LH, 1990. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 63: 141-153.
- Fraser T, Michon P, Barnwell JW, Noe AR, Al-Yaman F, Kaslow DC, Adams JH, 1997. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 65: 2772-2777.
- Michon PA, Arevalo-Herrera M, Fraser T, Herrera S, Adams JH, 1998. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *Am J Trop Med Hyg* 59: 597-599.
- Suh IB, Choi HK, Lee SW, Woo SK, Kang HY, Won YD, Cho M, Lim CS, 2003. Reactivity of sera from cases of *Plasmodium vivax* malaria towards three recombinant antigens based on the surface proteins of the parasite. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 481-487.
- Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Yazdani SS, Chitnis CE, Adams JH, King CL, 2003. Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 71: 2508-2515.
- Camargo LM, Ferreira MU, Krieger H, De Camargo EP, Da Silva LP, 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.
- Singer BH, de Castro MC, 2001. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. *Ann NY Acad Sci* 934: 184-222.
- Carvalho LH, Fontes CJ, Fernandes AA, Marinuzzi HC, Krettli AU, 1997. Cross-reactive cellular immune response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. *Parasite Immunol* 19: 47-59.
- Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, 1999. Cellular responses to *Plasmodium falciparum* major surface antigens and their relationship to human activities associated with malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 60: 674-679.
- Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, Krettli AU, 2002. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg* 66: 461-466.
- Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, 2002. Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 66: 299-303.
- Souto EJ, Fontes CJ, Gaspar AM, 2001. Prevalence of hepatitis B and C virus markers among malaria-exposed gold miners in Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 751-755.
- Smith JA, 2002. Electroelution of proteins from stained gels. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley & Sons, 8.8.1-8.8.5.
- Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS, 2001. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine* 20: 385-396.
- Soares IS, Barnwell JW, Ferreira MU, Gomes Da Cunha M, Laurino JP, Castilho BA, Rodrigues MM, 1999. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Mol Med* 5: 459-470.
- Michon P, Fraser T, Adams JH, 2000. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 68: 3164-3171.
- Baird JK, 1998. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 367-390.
- Hudson Keenihan SN, Ratiwayanto S, Soebianto S, Krisin, Marwoto H, Krishnegowda G, Gowda DC, Bangs MJ, Fryauff DJ, Richie TL, Kumar S, Baird JK, 2003. Age-dependent impairment of IgG responses to glycosylphosphatidylinositol with equal exposure to *Plasmodium falciparum* among Javanese migrants to Papua, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 69: 36-41.
- Pasay MC, Cheng Q, Rzepczyk C, Saul A, 1995. Dimorphism of the C terminus of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Mol Biochem Parasitol* 70: 217-219.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K, 2000. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 109: 111-119.
- Braga EM, Fontes CJ, Krettli AU, 1998. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis* 177: 1132-1135.
- Soares IS, da Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM, 1999. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg* 60: 357-363.
- Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho

ANTIBODIES TO *P. VIVAX* DBP IN THE BRAZILIAN AMAZON

681

- YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Choe K, 2001. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 14-20.
33. Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH, 1999. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet* 353: 1415-1416.
34. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP, 2002. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 66: 641-648.
35. Michon P, Woolley L, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH, 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.

Inhibition properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission

I. P. Cerávolo*, F.A. Souza-Silva*, C.J.F. Fontes†, E.M. Braga‡, A.P. Madureira*, A.U. Krettli*, J.M. Souza§, C.F.A. Brito*, J.H. Adams†, L.H. Carvalho*

*Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil;

†Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil; ‡Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; §Instituto Evandro Chagas, Belém, PA, Brazil; †University of

Notre Dame, Notre Dame, IN, USA

Short title: Inhibitory anti-PvDBP antibodies in the Amazon area

Correspondence to: Dr. Luzia H. Carvalho, Malaria Laboratory, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MG). Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br

Abstract

Plasmodium vivax Duffy binding protein (DBP) function in the erythrocyte invasion process is critical for parasite growth and pathogenesis in human infections. Although DBP is the subject of intensive malaria vaccine research, a single study has investigated the functional proprieties of anti-DBP antibodies in human population [1]. In the present study, we examined the ability of sera from different populations of the Brazilian Amazon - an area of markedly unstable malaria transmission - to inhibit the erythrocyte-binding function of the DBP ligand domain (region II, DBP_{II}), expressed on the surface of cultivated mammalian cells. We find that long-term exposure to malaria in the Amazon area elicits an inhibitory antibody response against different DBP_{II} variants. The inhibitory efficacy of the immune inhibition did not have a strong correlation with the antibody responses quantified by ELISA. Of potential importance for vaccine development, the three different DBP_{II} variants tested were equally recognized by sera from asymptomatic and symptomatic *P. vivax* infections.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Peer Review

Introduction

Plasmodium merozoites initiate erythrocyte invasion by an active process mediated by parasite ligands that interact with erythrocyte receptors. A key step in the host cell invasion is the irreversible commitment of the merozoite to the selected host cell by the formation of a tight junction between parasite and erythrocyte [2, 3]. In the case of *P. vivax*, junction formation is mediated by the Duffy binding protein (DBP) and its receptor on erythrocytes, the Duffy blood group antigen [4-6] also known as Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) [7]. Individuals that lack the Duffy antigen on their erythrocytes are naturally resistant to *P. vivax* infection [8]. Thus, the DBP represents one of the most promising vaccine candidate antigens against *P. vivax* infection.

P. vivax DBP is a 140-kDa protein that belongs to a family of homologous Duffy binding-like erythrocyte binding proteins (DBL-EBP) located within the micronemes of *Plasmodium* merozoites [9]. The similarity among DBL-EBPs is most prominent in two conserved Cys-rich domains, region II and VI. The functional binding domains of DBL-EBP lie in region II, which for DBP region II is 330-aa and the critical binding residues map to a central 170-amino-acid stretch that includes cysteines 5-8 [10-12]. DBP is likely to be exposed on the merozoite surface during invasion, enabling it to bind to its receptor but also making it accessible to serum antibodies. Currently available data on humoral immune responses to DBP in human population are still limited, being carried-out essentially in areas where malaria is highly endemic [1, 13, 14]. Recently, we demonstrated that DBP is naturally immunogenic in the Brazilian Amazon area, where malaria transmission rates are low-to-medium and clinical symptoms affect people of all ages [15]. In the Amazon, the proportions of DBP IgG positive subjects increased with exposure to malaria, reaching a peak in those subjects with long-term exposure in the endemic area (> 15 years). This observation was subsequently confirmed in malaria-endemic populations of Rondônia state, Brazil, where specific antibodies to the DBP were biased toward the cytophilic subclasses IgG1 and IgG3 [16].

1
2
3
4 Many field studies of immunity to malaria have focused on measuring concentrations of
5 antibodies to vaccine candidate antigens, being less attention paid to complementary approaches of
6 defining functionally important immune mechanisms [17]. In the present study, we hypothesize that
7 part of the IgG response to DBP in the Amazon area is mediated by antibodies that block the
8 interaction between DBP and its receptor on erythrocyte. To date, this inhibitory antibody response
9 was demonstrated only in highly endemic regions of Papua New Guinea [1], which is representative
10 of only some tropical regions where *P. vivax* is prevalent. To analyze inhibitory antibodies we used
11 an in vitro erythrocyte-binding assay, in which the putative ligand domain of the DBP (region II,
12 DBP_{II}) was expressed on the surface of cultivated mammalian cells [1, 18]. To assess the potential
13 effects of polymorphisms, the strategy was to use in the erythrocyte-binding assays three different
14 DBP_{II} variants.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Materials and methods**

34
35
36
37 *Study areas and subjects.* We analyzed subjects from three previously well-characterized areas of
38 the Brazilian Amazon [15, 19], and who had been exposed to different levels of malaria
39 transmission (Table 1). The first group consisted of individuals living in Belém, the capital of the
40 State of Pará. They had acquired a single episode of *P. vivax* malaria after short-trips to islands
41 located near to the capital where levels of malaria transmission are low and unstable. The second
42 group was composed of individuals who had lived for about 10 years in a small rural community of
43 Mato Grosso (MT) State, Terra Nova do Norte (TNN), where malaria is endemic with intermittent
44 transmission. These individuals reported a variable number of previous malaria episodes caused by
45 *P. vivax* and/or *P. falciparum*. The third group, named Apiacás group, consisted of migrant miners
46 who had lived for approximately 17 years in several gold-mining areas of the Brazilian Amazon
47 where *P. vivax* and *P. falciparum* malaria are endemic. At the time of blood collection, the three
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 groups studied (Belém, TNN and Apiacás) consisted of aparasitemic individuals, as assessed by
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

microscopic examination.

A previous study on the prevalence of malaria in Apiacás (MT) has suggested that gold-miners develop a partial resistance to clinical malaria [20]. In that study, asymptomatic malaria infection was defined as absence of classical malaria symptoms, such as fever, headache, muscle and/or joint pain, for at least 72 h after parasite detection. In this area, *P. vivax* infection was detected among 28 out of 527 gold-miners characterized and followed-up by CJF Fontes, being 15 classified as asymptomatic and 13 as symptomatic. Conventional antibodies to DBP were detected only among 7 of those 15 asymptomatic infections, and 5 out of 13 with symptomatic infection [15]. In the present study, we analyzed this small group that had anti-DBP antibodies.

Human plasma. Human plasma samples were collected from *P. vivax*-exposed residents of the Brazilian Amazon area, as described earlier [19, 21]. The total volume of these plasma samples was generally 100 to 200 μ l; therefore, the anti-DBP inhibition of DBP-erythrocyte binding assay had to rely on pooled samples to obtain sufficient volumes for the analysis method. The specific DBP antibody reactivities were determined by ELISA against a recombinant protein containing region II-IV of the DBP, as previously described [15]. Therefore, human plasma samples were pooled in three different groups according to their ELISA positivity, i.e., Belém (n = 5), TNN (n = 18) and Apiacás (n = 24) (Table 1). For two communities, Apiacás and TNN, additional samples were obtained by pooled in groups according to their ELISA antibody titer, and designated as high, low, and nonresponders. Negative control plasma samples were collected from Brazilian volunteers (n = 20) with no previous malaria exposure. Additional pooled plasmas samples were from individuals infected with *P. vivax*, who had developed symptomatic (n = 5) or asymptomatic (n = 7) malaria infection after a short follow-up period [15].

1
2 The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of
3
4 Research on Human beings from the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Report
5
6 002/2002), according to the Resolution of the Brazilian Council on Health-CNS 196/96, and by the
7
8 WHO Secretariat Committee for Research Involving Human Subjects (SCRIHS).
9
10

11
12
13 *DBP_{II}-pEGFP constructs.* Region II of DBP from a *P. vivax* laboratory reference clone Sal-1
14 (DBP_{II}V1) has previously been subcloned into the pEGFP-N1 plasmid (Clontech), with a flanking
15
16 signal sequence from the herpes simplex virus glycoprotein D1 [1, 18]. This plasmid allows
17
18 expression of a recombinant fusion protein to the N terminus of the enhanced-green fluorescent
19
20 protein (GFP) used as a transfection marker. Additional GFP constructs with two DBP region II
21
22 variants, PNG-7.18 (DBP_{II}V2) and PNG-27.16 (DBP_{II}V3) [22], were also used in the erythrocyte-
23
24 binding assays. All DBP_{II}-pEGFP plasmids were purified by use of an endotoxin-free plasmid DNA
25
26 purification system (Qiagen, Valencia, CA).
27
28
29
30
31
32
33
34

35 *COS-7 cultures and erythrocyte-binding assays.* Recombinant plasmids were transfected into
36
37 Green monkey kidney cells (COS-7, American Type Culture Collection, Manassas, VA) by use of
38
39 lipofectamine and PLUS-reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) according to
40
41 manufacturer's protocols. Briefly, COS-7 cells into six-well culture plate (1.5×10^5 cells/well) were
42
43 transfected with plasmids (0.5 μ g/well)-liposome complexes (5% Plus-reagent and 3%
44
45 lipofectamine) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) without serum. After 6 h of
46
47 cells exposure to DNA-liposome complexes (37 °C, 5% CO₂), transfection medium was replaced by
48
49 DMEM plus 10% of fetal bovine serum (Gibco-BRL). At 24 h after transfection, culture medium
50
51 was replaced again and efficiency of transfection was assessed by using an inverted fluorescence
52
53 microscope (Nikon TE2000E). Over 80% of the cells demonstrated green fluorescence, indicating
54
55 that they were successfully transfected.
56
57
58
59
60

1
2 Forty-two hours after transfection, the erythrocyte-binding assays were performed as previously
3 described [1]. For this, transfected COS-7 cells were incubated for 1 h at 37 °C in 5% CO₂ with
4 various dilutions of the different pooled human plasmas in DMEM without serum. Human O⁺
5 erythrocytes in a 10% suspension were added to each well (200 µl/well), and plates were incubated
6 for 2 h at room temperature. Unbound erythrocytes were then removed by washing the wells three
7 times with PBS. Binding was quantified by counting rosettes observed over 20 fields at a
8 magnification of x 200 (Fig. 1A). To assess their inhibitory activity, all pooled human plasmas were
9 first tested (duplicate) at a 1:40 dilution. The 1:40 dilution was chosen because in preliminary
10 experiments this dilution provided a wide range of inhibitory activity among different plasmas.
11 Serial dilutions were then tested for each positive sample. Binding for each plasma dilution was
12 compared to binding of transfected COS-7 cells incubated with negative control plasma at 1:40
13 dilution (100% binding).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 *Statistical analysis.* Statistical analysis was performed using the Epi-Info 2002 software
34 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) or MiniTab statistical software (Minitab
35 Inc., State College, PA). Differences in means were tested by one-way analysis of variance
36 (ANOVA), being the log-transformed data used for situations where variance normality assumption
37 was not applied. Differences between medians were compared by the nonparametric Wilcoxon
38 Rank Sum test. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Results

51 Natural exposure to *P. vivax* in the Amazon area induces inhibitory antibody response

52
53
54
55
56
57
58
59 A preliminary objective was to study whether people exposed to *P. vivax* in the Amazon area,
60 which is an area with unstable malaria transmission, acquire antibodies that have the ability to

1
2 inhibit DBP binding to erythrocytes. For this, erythrocyte-binding assays were performed by using
3
4 transiently transfected COS-7 cells expressing different DBP_{II} variants as GFP fusion proteins (Fig.
5
6 1A). Our results demonstrated that individuals with long-term exposure to malaria in the Amazon
7
8 area (TNN and Apiacás) do acquire inhibitory antibodies to DBP_{II} that strongly inhibit the DBP_{II}
9
10 variants used in our assays (Fig. 1B). No inhibition was observed when using pooled plasmas, at the
11
12 same dilution, from individuals living in the endemic area (Belém, TNN or Apiacás) who did not
13
14 have detectable antibody to DBP (nonresponders). In contrast, plasma samples from residents who
15
16 had been sporadically exposed to *P. vivax* (< 1 month) did not block the ligand-receptor interaction.
17
18 In this group, a low level of inhibition (< 50%) was detected, but only for the DBP_{II}V3 allele (Fig.
19
20 1B) and this inhibitory activity was lost at 1:80 plasma dilution (data not shown).
21
22
23
24
25
26
27

28 **Anti-DBP antibodies levels and inhibition of binding**

29
30
31
32 We sought to determine whether the level of anti-DBP IgG antibodies, as detected by ELISA,
33
34 correlated with a positive inhibitory activity of erythrocyte binding to DBP_{II}. Individuals
35
36 chronically exposed to malaria in TNN and Apiacás communities had been previously characterized
37
38 as high or low responders by ELISA [15]. We analyzed these samples, pooled from high or low
39
40 responders, in titration experiments for inhibition of erythrocyte binding to COS-7 cells transfected
41
42 with the three DBP_{II} alleles. In Apiacás area, it was not possible to detect a significant difference in
43
44 the profile of rosette-inhibitory activity between high or low responders groups (Fig. 2). The same
45
46 profile of response was detected by using TNN samples (data not shown).
47
48
49
50

51
52 These results demonstrate that the levels of inhibitory antibodies can be relatively high in the
53
54 Amazon area, being detected up to 1:1,280 sera dilution. We were somewhat surprised that there
55
56 was no correlation between the quantitative antibody responses and the efficacy of antibody
57
58 inhibition of DBP-erythrocyte binding to the three DBP_{II} variants.
59
60

Asymptomatic *P. vivax* infection and inhibition of binding

We also analyzed pooled plasmas from *P. vivax* infected individuals who had or not developed clinical malaria after a short follow-up in Apiacás area. Regardless the DBP_{II} variant used to transfect the COS cells, we found that antibodies from asymptomatic and symptomatic groups were comparable for inhibition of erythrocyte-DBP_{II} binding (Fig. 3). Unexpectedly, persons with *P. vivax* blood-stages had lower levels of inhibition as compared with uninfected-exposed groups (Fig. 2), being this difference statistically significant (nonparametric Wilcoxon test, $P < 0.05$).

Discussion

The goal in developing the DBP as a vaccine against blood-stages of *P. vivax* is to elicit an antibody response that blocks the adhesion of this parasite ligand to its cognate erythrocyte receptor and thereby the merozoite invasion. To date, a single study, carried-out in highly endemic areas of Papua New Guinea, demonstrated that individuals naturally exposed to malaria do acquire antibodies that block erythrocyte binding by DBP [1]. In the present study, we aimed to characterize this anti-DBP inhibitory antibody response in an area of markedly unstable or intermittent malaria transmission. The transmission of malaria is not homogeneous in the Amazon area, which is similar to most of Latin America (where about one million cases are reported per year) [23]. Vivax malaria in the Amazon basin tends to be concentrated in areas with uncontrolled establishment of rural and mining settlements, being associated with poorly maintained dwellings and favorable transmission conditions [24, 25]. In general, the exposed populations consist of migrants mostly from malaria-free areas. Under such a pattern of transmission, the infection is generally accompanied by clinical symptoms that vary from mild to severe. Recently, we and others demonstrated that conventional antibodies to DBP, as measured by ELISA, are prevalent in the Amazon area [15, 16].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

By using an in vitro assay that can be adapted to quantify inhibition of DBP-erythrocyte binding, we demonstrated that the natural exposition to *P. vivax* in the Amazon area induces antibodies to DBP which blocks erythrocyte cytoadherence. An efficient inhibitory antibody response was detected only in plasmas from individuals who had had a long-term exposure to malaria in that area (≥ 10 years). Plasma samples from individuals sporadically exposed to *P. vivax* (Belém) could not block DBP-erythrocyte binding. These results suggest that DBP is normally a poor immunogen when presented through the 'natural' exposure of an infection and that chronic exposure is needed to induce a more effective inhibitory antibody response that recognizes different DBP_{II} variants. Alternatively, it is possible that the people sporadically exposed to malaria in Belém area had been infected with different variants of DBP_{II} that were also antigenically-distinct from the three alleles used in the present study. Recent findings with rabbit immune-sera support the idea that distinct strain-specific antibody response profiles can be a general phenomenon that restricts the functional immune response against DBP in an allele-specific manner [22]. Together, these results point toward to strain specificity in the natural immune response against DBP, which has also been suggested to another malaria vaccine candidate, the apical membrane antigen 1 (AMA1) [26].

In an attempt to determine whether the level of serological responses correlate with the anti-DBP inhibitory activity, we analyzed pooled samples from individuals chronically exposed to malaria (TNN and Apiacás) because those individuals were previously characterized as high, low and nonresponders by ELISA [15]. Overall, titration experiments did not show any significant difference in the efficacy of inhibition among high and low responder groups. These results differ somewhat from the results of the Papua New Guinea study [1], in which elevated anti-DBP titers of the pooled high responder immune sera had a corresponding increased inhibitory capacity. The Brazilian study examined assayed antibody responses against three DBP_{II} variants, compared to only the Sall (V1) variant used in the PNG study, and differences in inhibitory efficacy were apparent against the different alleles, suggesting some strain specificity of the Brazilian sera.

1
2 Alternatively, it is possible that the different results may reflect a real disparity in the antibody
3 responses to DBP between unstable and stable malaria transmission areas, but such a conclusion is
4 not yet possible since the use of pooled samples - which were used in both studies - may mask the
5 strain-specific of antibody responses of individual samples.
6
7
8
9

10
11
12
13
14 In the Amazon area, the titers of inhibitory antibodies were relatively high, and, depending on
15 the DBP_{II} variant used in the erythrocyte binding assay, this activity could still be detected at
16 1:1,280 dilution. Given the scarcity of data from human population, this profile of inhibitory
17 immune response to DBP_{II} can be compared only with those from experimental models. In mice,
18 studies of the immunogenicity of a recombinant DPB_{II}, formulated with human compatible
19 adjuvants, demonstrated that the maximum of inhibitory activity was obtained with immune sera
20 diluted up to 1:1,800 [27]. So far, vaccination of monkeys with a formulation of DPB_{II} suitable for
21 human (montanide ISA-720) did not induce significant levels of inhibitory antibody response, being
22 the 50% inhibition titers ranged from 1:16 to 1:366 [28]. Therefore, it is very intriguing that in the
23 Amazon and PNG a strong inhibitory immune response to DBP is acquired under natural
24 conditions.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 The occurrence of asymptomatic malaria in Latin America is unusual, and only recently has been
43 documented in detail among Amazonians living in remote riverine settlements [29, 30]. Considering
44 the vastness of the Amazon region and the remoteness of some of its riverine settlements, the
45 plasma samples available from a small group of asymptomatic *P. vivax*-infected individuals,
46 previously identified in Apiacás area [20], offered an exceptional opportunity to investigate the
47 relationship between malaria symptoms and the functional immune response to DBP_{II} in vitro. By
48 using three DBP_{II} variants in the functional assay, we could not see any difference between
49 asymptomatic and symptomatic *P. vivax* infections. Surprisingly, the levels of inhibitory antibodies
50 to DBP were significantly lower in *P. vivax*-infected groups than in uninfected group. In comparison
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Scandinavian Journal of Immunology

12

1 with uninfected individuals, they also had low levels of antibodies to DBP [15]. Although impaired
2 immunity in patients with acute blood stage infections has been documented in malaria [31-33], our
3 data is far more difficult to explain because *P. vivax*-infected groups included asymptomatic
4 individuals. Since the criterion used to define asymptomatic individuals in Apiacás study was the
5 absence of symptoms up to 72 h after parasite detection, there is a possibility that these individuals
6 may have become symptomatic soon after. A long-term prospective study is needed to determine
7 the protective nature of the inhibitory anti-DBP_{II} antibodies in terms of anti-disease immunity.
8 Unfortunately, geographical access and political conflicts hamper these studies in the endemic
9 Apiacás area.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 Our results demonstrate that population from unstable malaria transmission areas do acquire
27 anti-DBP that inhibit in vitro binding of different DBP_{II} variants to erythrocytes. It is not clear yet
28 whether this finding correlates with increased levels of protection. We believe that this first study
29 on the profile of immune response to DBP_{II} variants in population of the Amazon area will
30 contribute to the current efforts on vaccine development, and may facilitate future clinical trials in
31 areas of unstable malaria transmission.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

This work was supported by UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/TDR, The Brazilian National Research Council (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, PAPES IV).

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Authors' contributions

I. P. Cerávolo and F. A. Souza-Silva were involved in all stages of this study. E. M. Braga and A. U. Krettli were involved in the initial design of the study. C. J. F. Fontes and J. M. Souza participated in the coordination of the field work. C. A. Brito and J. H. Adams helped to compose the manuscript and gave substantial constructive advice during the project. A. P. Madureira performed statistical analysis and contributed to the interpretation of data. L. H. Carvalho is the individual who accept direct responsibility for the conception, design and coordination of the study. All authors read and approved this manuscript.

For Peer Review

References

- 1 Michon P, Fraser T and Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block
2 erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. Infect Immun
3 2000;68:3164-71.
- 4
5 2 Miller LH, McAuliffe FM, Johnson JG. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites.
6 Prog Clin Biol Res 1979;30:497-502.
- 7
8 3 Singh AP, Ozwara H, Kocken CH, Puri SK, Thomas AW, Chitnis CE. Targeted deletion of
9 *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during
10 invasion. Mol Microbiol 2005;55:1925-34.
- 11
12 4 Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood
13 group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. Exp Parasitol
14 1989;69:340-50.
- 15
16 5 Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy
17 receptor. Mol Biochem Parasitol 1991;44:125-32.
- 18
19 6 Adams JH, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. Identification of a cryptic intron in the
20 *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. Mol Biochem Parasitol 1992;56:181-83.
- 21
22 7 Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC *et al.* A receptor for the malarial parasite *Plasmodium*
23 *vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. Science 1993;261:1182-84.
- 24
25 8 Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax*
26 in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med 1976;295:302-04.
- 27
28 9 Adams JH, Hudson DE, Torii M *et al.* The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is
29 located within the micronemes of invasive malaria merozoites. Cell 1990;63:141-53.
- 30
31 10 Ranjan A, Chitnis CE. Mapping regions containing binding residues within functional
32 domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. Proc
33 Natl Acad Sci USA 1999;96:14067-72.
- 34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Scandinavian Journal of Immunology

16

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 11 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;374:193-98.
 - 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;101:15754-59.
 - 13 Fraser T, Michon P, Barnwell JW *et al.* Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 1997;65:2772-77.
 - 14 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.
 - 15 Ceravolo IP, Bruna-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.
 - 16 Tran TM, Oliveira-Ferreira J, Moreno A *et al.* Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:244-55.
 - 17 Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 2006;28:51-60.
 - 18 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.
 - 19 Braga EM, Barros RM, Reis TA *et al.* Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:461-66.

- 1
2
3 20 Fontes CJ. Epidemiologia da malária e fatores associados à infecção assintomática por
4 *Plasmodium* em uma população de garimpeiros da Amazônia brasileira (Mato Grosso,
5 1996). Clínica Médica. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001:1-178.
6
7
8
9 21 Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU. Low cellular response in vitro among
10 subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. Am J
11 Trop Med Hyg 2002;66:299-303.
12
13
14
15 22 VanBuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M *et al.* Antigenic drift in the ligand domain of
16 *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. J Infect
17 Dis 2004;190:1556-62.
18
19
20
21 23 WHO. The World Malaria Report 2005 from WHO and UNICEF.
22 (http://rbm.who.int/wmr2005/html/exsummary_en.htm), 2005.
23
24
25
26 24 Camargo LM, Ferreira MU, Krieger H, De Camargo EP, Da Silva LP. Unstable
27 hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks
28 and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. Am J Trop Med Hyg
29 1994;51:16-25.
30
31
32
33 25 Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M. Epidemiology of malaria in a
34 hypoendemic Brazilian Amazon migrant population: a cohort study. Am J Trop Med Hyg
35 2004;70:229-37.
36
37
38
39 26 Cortes A, Mellombo M, Masciantonio R, Murphy VJ, Reeder JC, Anders RF. Allele
40 specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical
41 membrane antigen 1. Infect Immun 2005;73:422-30.
42
43
44
45 27 Yazdani SS, Shakri AR, Mukherjee P, Baniwal SK, Chitnis CE. Evaluation of immune
46 responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium*
47 *vivax* Duffy binding protein. Vaccine 2004;22:3727-37.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Scandinavian Journal of Immunology

18

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 28 Arevalo-Herrera M, Castellanos A, Yazdani SS *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in *Aotus* monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:25-31.
- 29 Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet* 1999;353:1415-16.
- 30 Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:641-48.
- 31 Brasseur P, Agrapart M, Ballet JJ, Druilhe P, Warrell MJ, Tharavani S. Impaired cell-mediated immunity in *Plasmodium falciparum*-infected patients with high-parasitemia and cerebral malaria. *Clin Immunol Immunopathol* 1983;27:38-50.
- 32 Ho M, Webster HK, Looareesuwan S *et al.* Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 1986;153:763-71.
- 33 Hviid L, Theander TG, Abu-Zeid YA *et al.* Loss of cellular immune reactivity during acute *Plasmodium falciparum* malaria. *FEMS Microbiol Immunol* 1991;3:219-27.

Table 1 Characteristics of the three communities studied in the Brazilian Amazon area

Characteristics	Area		
	Belém	TNN	Apiacás
Antibodies anti-DBP, n/total (%)	5/36 (14%) [†]	18/47 (38%)	24/37 (65%)
Age (mean ± SD) *	32 ± 19	40 ± 28	32 ± 8
Exposure to malaria transmission	Sporadic	Variable	Constant
Time of malaria exposure	< 1 month	~ 10 years	~ 17 years
Number of past malaria episodes	1	1-10	>10
Previous malaria episodes by	Pv	Pv and/or Pf	Pv and/or Pf

Pv = *P. vivax*, Pf = *P. falciparum*

[†]As previously detected by ELISA [15]

*Differences not significant (F = 1.47, p = 0.234).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

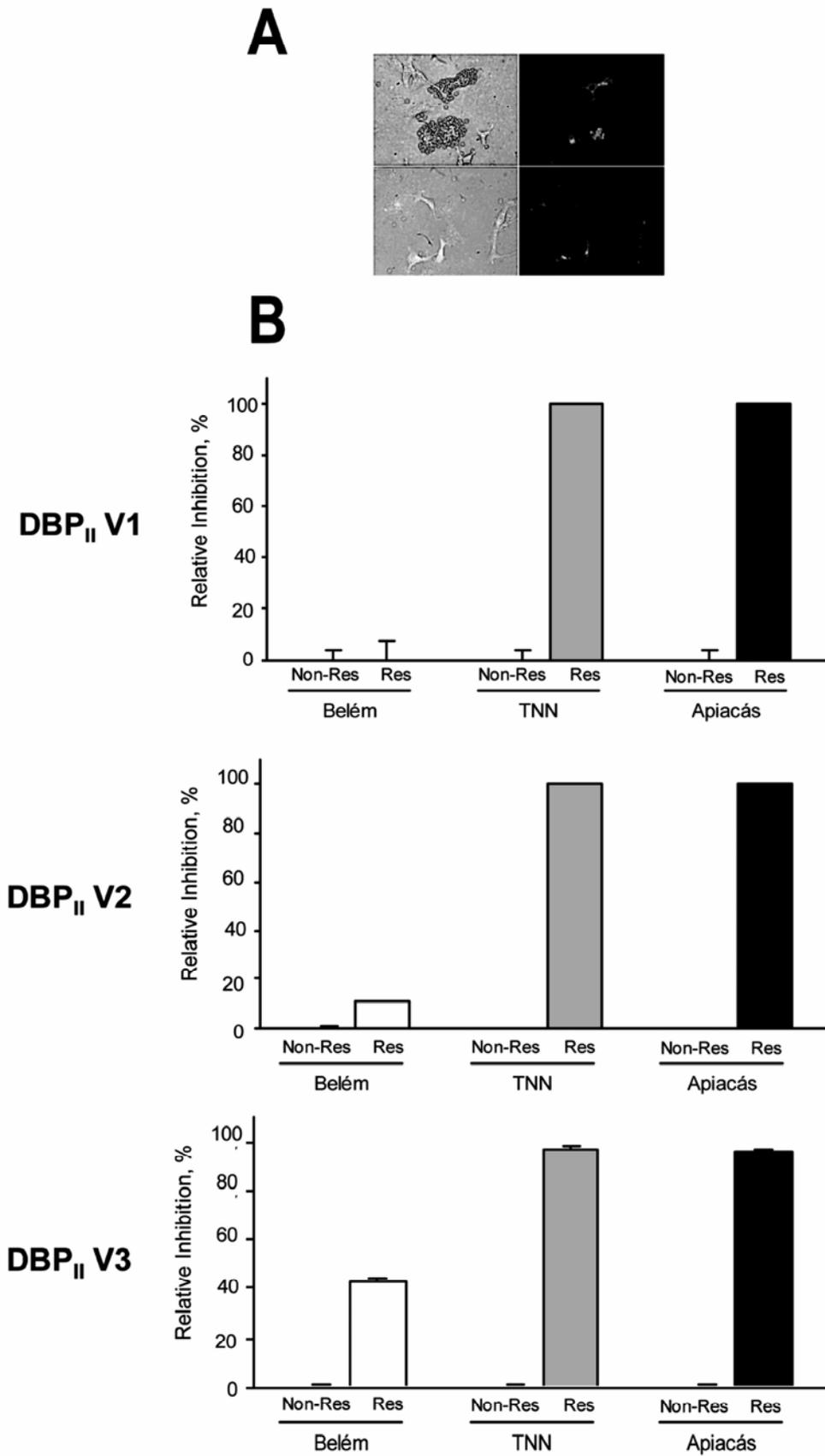
Figures legends

Figure 1 Inhibition of erythrocyte binding to DBP_{II} variants on COS cells by plasma from individuals who had been sporadically (Belém) or continuously exposed to malaria (TNN and Apicás) in the Amazon area. (A) Expression of the GFP-DBP_{II} fusion protein in COS-7 cells is associated with green fluorescence, in upper panels, erythrocyte cytoadherence (rosettes) linked with DBP_{II} expression; and lower panels illustrates a complete inhibition of erythrocyte binding to transfected cells by a positive human plasma. (B) COS-7 cells expressing each variant (DBP_{II}V1, DBP_{II}V2 or DBP_{II}V3) were incubated with different pooled plasma samples, at 1:40 dilution, prior to the addition of human erythrocytes. Binding was scored after counting rosettes in 20 fields at a magnification of x 200. Percent inhibition was determined relative to pooled plasma from unexposed Brazilian donors used as a negative control. Plasmas from Amazonian residents were designated as nonresponders (Non-Res) or responders (Res) to the DBP, according to their previous ELISA positivity [15]. Bars correspond to the mean \pm standard deviation of two different experiments.

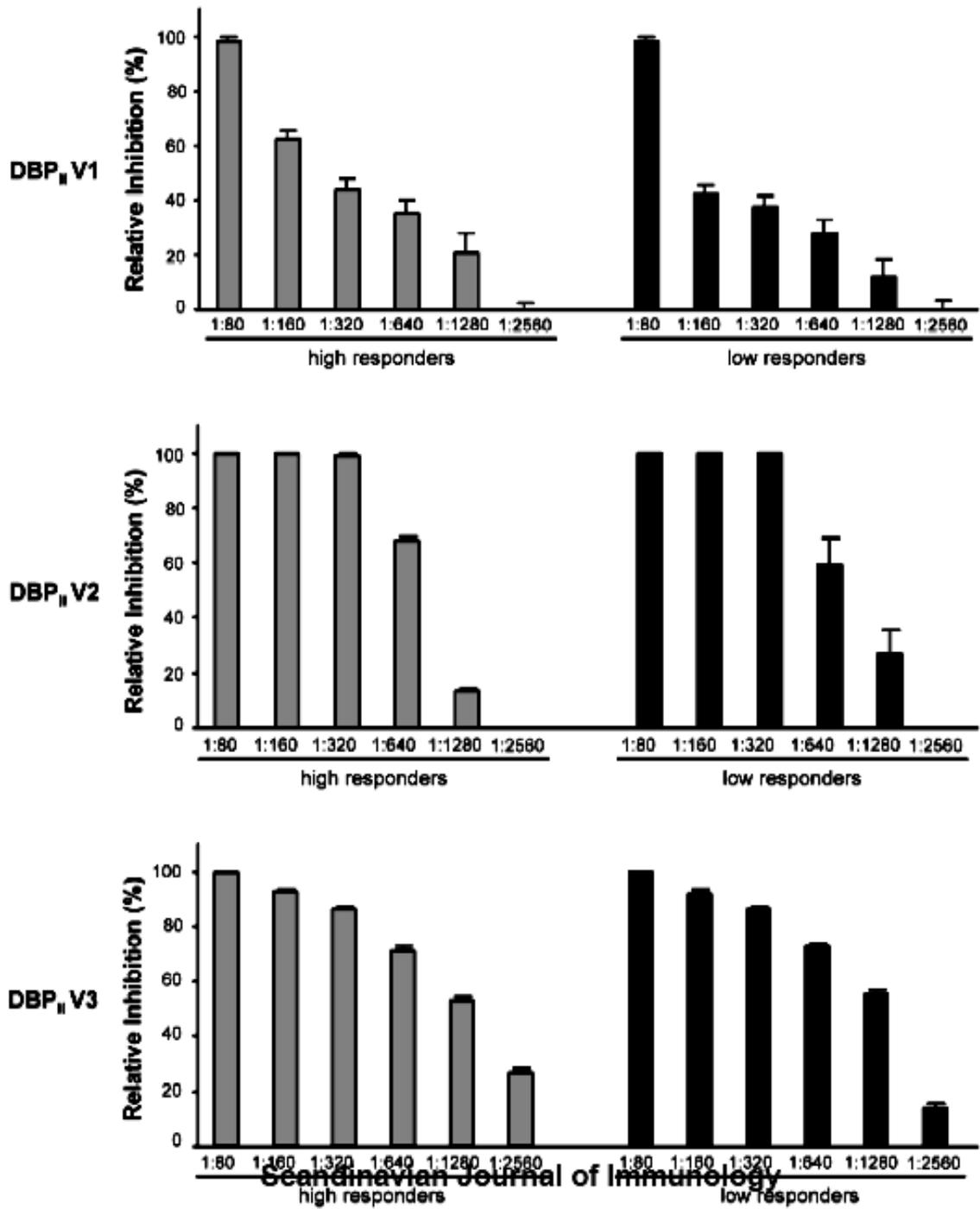
Figure 2 Inhibition of erythrocyte binding to DBP_{II} variants expressed on COS cells by plasma from individuals characterized as high or low responder to DBP, as determined by ELISA [15]. COS cells expressing each variant (DBP_{II}V1, DBP_{II}V2 or DBP_{II}V3) were incubated with different pooled plasma samples from Apicás area, starting at 1:80 dilution, prior to the addition of human erythrocytes. Binding was scored after counting rosettes in 20 fields at a magnification of x 200. Percent inhibition was determined relative to pooled plasma from nonresponders individuals. Assays were performed two times in duplicate. Bars correspond to the mean \pm standard deviation.

1
2
3 **Figure 3** Inhibition of erythrocyte binding to DBP_{II} variants expressed on COS cells by plasma
4 from *P. vivax*-infected patients who had symptomatic (n = 5) or asymptomatic (n = 7) malaria
5 infection. COS cells expressing each variant (DBP_{II}V1, DBP_{II}V2 or DBP_{II}V3) were incubated with
6 pooled plasmas from each group, starting at 1:80 dilution, prior to the addition of human
7 erythrocytes. Binding was scored after counting rosettes in 20 fields at a magnification of x 200,
8 being percent inhibition determined relative to pooled plasma from nonresponders individuals. Bars
9 correspond to the mean \pm standard deviation.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review



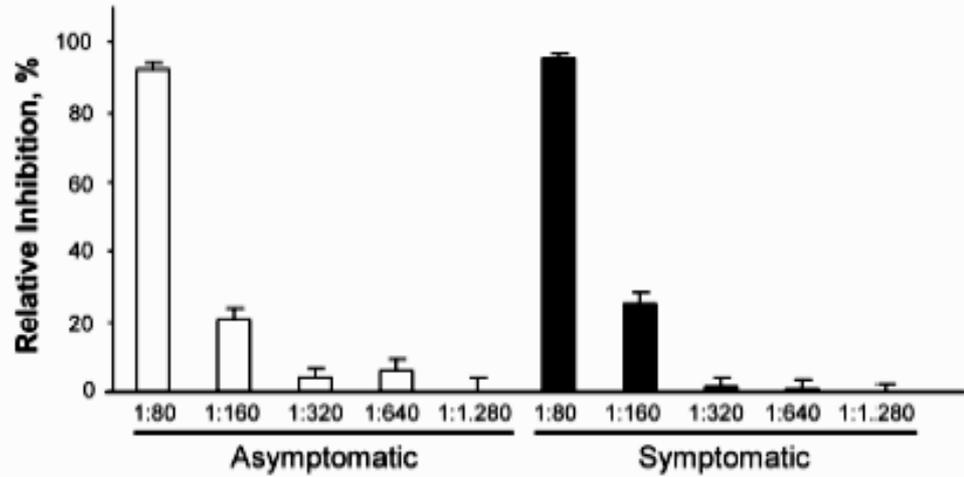
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37



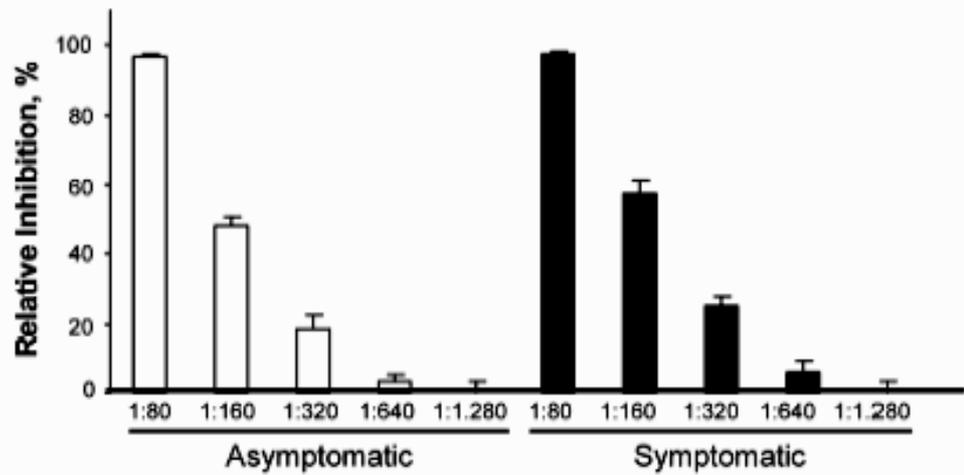
Scandinavian Journal of Immunology Page 24 of 24
Cerávolo et al, Fig. 3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

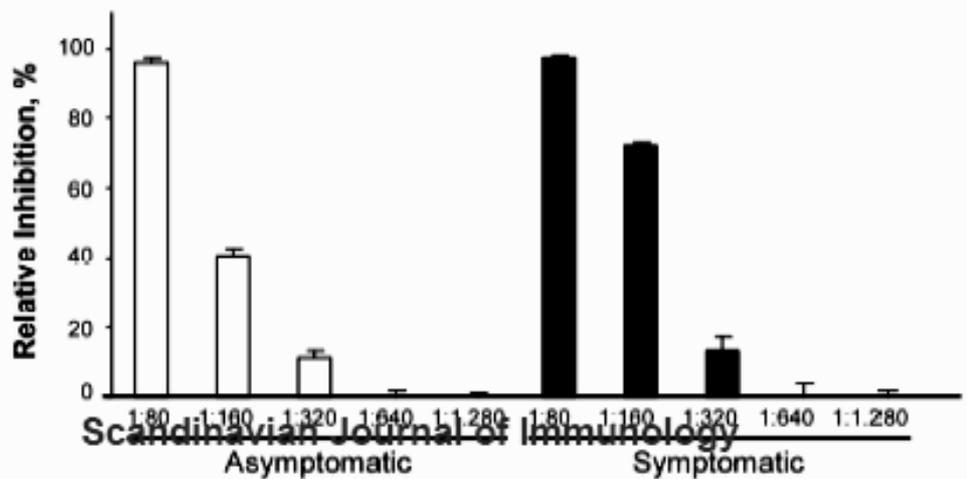
DBP_{II} V1



DBP_{II} V2



DBP_{II} V3



1

1 **ANTIBODY RESPONSES TO THE DUFFY BINDING PROTEIN AFTER A SINGLE**
2 ***PLASMODIUM VIVAX* MALARIA TRANSMISSION EVENT IN A NON-MALARIOUS**
3 **AREA**

4

5 **I.P. Ceravolo¹, T. N. Sousa¹, F. A. Souza-Silva¹, B. A. M. Sanchez¹, J. B. Cardoso¹, J. H.**
6 **Adams², C. F. A. Brito¹, L. H. Carvalho¹**

7

8 ¹Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais,
9 Brazil; ²University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, USA

10

11 The Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* (DBP) is a critical adhesion ligand that
12 participates in merozoite invasion of human Duffy positive erythrocytes. A small outbreak of
13 *P. vivax* malaria, in a village located in a non-malarious area of Brazil, offered us an
14 opportunity to investigate DBP immune response among individuals who had their first and
15 brief exposure to malaria. In the present study, we demonstrate that although only 20% (5 out
16 of 15) of the individuals who had experienced their first *P. vivax* infection develop antibody
17 response to DBP, a secondary boosting can be achieved by the time of a *P. vivax* relapses.
18 DNA sequences from primary/relapses samples demonstrated that a single *dbp* allele was
19 detected in the outbreak area. To investigate neutralizing antibodies to ligand domain of the
20 DBP (cysteine-rich region II, DBP_{II}), we performed cytoadherence assays with mammalian
21 cells expressing DBP_{II} sequences which were related or not to those from the outbreak isolate.
22 The results of a 12-month follow-up period provided evidence that naturally acquired
23 neutralizing antibodies to DBP_{II} are short-lived, and seem to be allele-specific. This is the first
24 evidence of strain specificity in the natural immune response against DBP.

25

26

27 INTRODUCTION

28

29 The Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* (DBP) is a critical adhesion ligand that
30 participates in merozoite invasion of human Duffy positive erythrocytes (Miller et al., 1976;
31 Wertheimer and Barnwell, 1989). DBP belongs to a family of homologous Duffy binding-like
32 erythrocyte binding proteins (DBL-EBP) located within the micronemes of *P. vivax* and *P.*
33 *knowlesi* merozoites (Adams et al., 1990). The similarity among DBL-EBP is most prominent in
34 two conserved cysteines-rich domains, region II and VI. The functional binding domains of
35 DBL-EBP lie in region II, and for *P. vivax* DBP region II (DBP_{II}) contains 330-aa and the
36 critical binding residues have been mapped to a central 170-amino-acid stretch that includes
37 cysteines 5-8 (Ranjan and Chitnis, 1999; Singh et al., 2003; VanBuskirk et al., 2004b). The
38 gene for *P. vivax* DBP_{II} is highly polymorphic, and this diversity varies geographically from
39 region to region (Ampudia et al., 1996; Cole-Tobian and King, 2003; Kho et al., 2001; Tsuboi
40 et al., 1994; Xainli et al., 2000). The pattern of excessive polymorphism is consistent with a
41 high selection pressure on DBP gene and suggests that allelic variation functions as a
42 mechanism of immune evasion.

43

44 Invasive merozoites are believed to sequester microneme proteins until merozoites contact
45 the target erythrocyte, presumably, as a mechanism to reduce exposure of the DBP to immune
46 inhibition (McHenry and Adams, 2006). Currently available data on humoral immune
47 responses to DBP in human population are still limited (Ceravolo et al., 2005; Fraser et al.,
48 1997; Michon et al., 2000; Xainli et al., 2003). Taken together, those previous studies
49 demonstrated that anti-DBP antibodies increase with age of the donors, suggesting that
50 repeated exposure to *P. vivax* leads to boosting of the antibody response, and that acquired
51 immunity to DBP includes antibody activity which blocks adherence of merozoite to
52 erythrocytes. As most of the studies on the DBP antibody response reported to data have been
53 carried out in areas where malaria is highly endemic, there are scarcity of data on the response

54 to exposure to a single infection and about the persistence of this antibody response in the
55 absence of reinfection. An outbreak of *P. vivax* malaria, in a village located in a non-malarious
56 area of Brazil, offered us an opportunity to investigate DBP immune response among
57 individuals who had their first and brief exposure to malaria. Our experimental approach was to
58 carry-out a 12-month following-up of these individuals, including individuals who were
59 considered to be exposed to the risk of infection but who had neither symptoms nor blood
60 parasites.

61

62 SUBJECTS, MATERIALS, AND METHODS

63

64 ***The P. vivax malaria outbreak.*** between April - May 2003, twenty-five cases of *P. vivax*
65 malaria were diagnosed for the first time in a small community, Souza, located at 70 km from
66 Belo Horizonte, the capital of Minas Gerais State, a non-endemic area of Brazil (Cerbino et al.,
67 2004; Zumpano et al., 2004). Malaria has never been reported in this area and the Brazilian
68 endemic region, the Amazon area, is far enough away (~1,100 miles). According to the Minas
69 Gerais Department of Health, the source of the infection was a man from the community who
70 had returned from the Amazon area (Humaitá, AM) with *P. vivax* infection, in January 2003.
71 The subsequent outbreak in Souza began in Abril 2003, and entomological survey incriminated
72 the vector *Anopheles darlingi* as responsible for local malaria transmission (Cerbino et al.,
73 2004). None of the inhabitants with confirmed malaria recalled previous history of malaria,
74 temporary residence in malaria-endemic area, or travel to the endemic area during the last *six*
75 months preceding the outbreak. All 25 cases were treated with chloroquine (1.5g for three
76 days) plus primaquine (30 mg daily for 7 days), and, a second round of treatment was given in
77 case of relapses (3-day course of chloroquine and 15-day course of primaquine). Control
78 activities also included active search for acute malaria by thick blood smears, and
79 outdoor/indoor spraying of residual insecticide (cypermethrine). The outbreak was considered

80 of short-duration (50-60 days), being the last malaria case diagnosed in May 21, 2003; since
81 there, Local/Regional Departments of Health have maintained an entomological and
82 epidemiological surveillance of the area.

83

84 ***Volunteers and blood collection.*** Cross-sectional surveys were carried-out after discussions
85 with the community about the objectives of the project and its protocols. Individuals who had
86 been infected with *P. vivax* were enrolled in the study if they met the following criteria: (i)
87 informed written consent in accordance with guidelines for human research, as specified by the
88 Brazilian National Council of Health (Resolution 196/96); (2) residence in the outbreak area;
89 (3) a minimum age of 15 years old; (4) if women, an indicator of the absence of pregnancy; (4)
90 a willingness to stay in the outbreak area during the intervening year. As showed in Table 1, a
91 total of 15 individuals met the inclusion criteria (32 ± 13 years old), being three of them with
92 acute *P. vivax* infection. We also included their relatives and neighbors who were considered to
93 be exposed to the risk of infection ($n = 18$; 34 ± 19 years old). The latter group had had neither
94 symptoms nor blood parasites by direct examination of Giemsa-stained thick smears. We
95 collected 5 ml blood samples (EDTA) from all. At the time of blood collection, Giemsa-stained
96 thick blood smears were examined for parasites and a nested PCR assay for malaria diagnosis
97 were conducted latter in our laboratory. Blood samples were used to obtain plasma and for
98 DNA preparation. Three, six, nine and 12 months after the first survey, four other identical
99 cross-sectional surveys were carried out. The ethical and methodological aspects of this study
100 were approved by the Ethical Committee of Research on Human beings from the Centro de
101 Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Report 002/2002), according to the Resolution of the
102 Brazilian Council on Health-CNS 196/96, and by the WHO Secretariat Committee for
103 Research Involving Human Subjects (SCRIHS).

104

105 **Microscopy and Plasmodium diagnosis by nested-PCR.** Well-trained microscopists were in
106 charge of examining 200 fields of Giemsa-stained thick blood smears. DNA was extracted
107 from 300 µL of individual whole-blood samples by using a genomic DNA purification kit
108 (Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacture's protocol.
109 Parasite species identification was performed by nested-PCR amplification of the small subunit
110 ribosomal RNA (18S SSU rRNA) genes, as previously described (Snounou et al., 1993).
111 Briefly, genus- and species-specific primers were used in the assay to amplify 205 bp, 144 bp
112 and 120 bp sequences of the 18S SSU rRNA of *P. falciparum*, *P. malariae* and *P. vivax*,
113 respectively. The amplified products were visualized in 1.5% agarose gel stained with ethidium
114 bromide.

115

116 **Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) genotyping.** Extracted DNA was used to
117 detect the three common alleles at the FY locus (*FY*A*, *FY*B*, *FY*ES*), being PCR with allele-
118 specific primers performed as described by Olsson and colleagues (Olsson et al., 1998). The
119 amplification of any *FY* allele generated a 711 bp product, which was analyzed by
120 electrophoresis in 1.5% agarose gels. As control, each DNA sample was previously tested for
121 PCR amplification using primers directed against a target sequence in exon 7 of the blood
122 group ABO gene, ABO-516 and ABO-926 (Olsson et al., 1998). All DNA samples amplified a
123 419 bp DNA fragment (data not shown).

124

125 **Recombinant proteins and Serological assay.** Two recombinant *P. vivax* proteins were used to
126 detect total IgG antibodies. The recombinant Duffy binding protein, which includes amino
127 acids 132 to 771 (regions II to IV, DBP_{II-IV}), was expressed as a soluble glutathione-S-
128 transferase (GST) fusion protein of 140 kDa (Fraser et al., 1997). The expression and
129 purification of this recombinant protein have been described in detail elsewhere (Ceravolo et
130 al., 2005). The recombinant protein representing the 19-kDa C-terminal region of the merozoite

131 surface protein-1 of *P. vivax* (MSP1₁₉) was kindly provided by Dr. Irene Soares (Universidade
132 de São Paulo, SP, Brazil). Detailed construction of this GST fusion protein, which represents
133 the amino acids 1,616-1,704 of the MSP-1 (Belém strain) of *P. vivax*, has been described
134 elsewhere (Cunha et al., 2001). To assess IgG antibodies against rDBP_{II-IV} and MSP1₁₉ an
135 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out as previously described
136 (Ceravolo et al., 2005). The serum dilution used was 1:100. For the recombinant proteins
137 DBP_{II-IV} (5 µg/ml) and MSP1₁₉ (1 µg/ml), the final optical density (OD) at 492 nm was
138 calculated by subtracting the OD obtained with the GST (antigen control). The results were
139 expressed as index of reactivity (IR = OD₄₉₂ values of test sample divided by the value of the
140 cutoff). Cutoff points were set at three standard deviations above the mean OD₄₉₂ of sera from
141 30 individuals, unexposed to malaria, from the city of Belo Horizonte. Values of IR >1.0 were
142 considered as positive.

143

144 ***DBP-pEGFP constructs.*** Region II of DBP (DBP_{II}) from a *P. vivax* laboratory reference
145 clone (Sal-1) (Fang et al., 1991) has previously been subcloned into the pEGFP-N1 plasmid
146 (Clontech), with a flanking signal sequence from the herpes simplex virus glycoprotein D1
147 (Michon et al., 2000). This targeted expression to the surface of the transfected COS cells as a
148 green fluorescent protein (GFP) fusion protein. An additional GFP construct with DBP_{II}
149 sequence from a *P. vivax* isolate from Papua New Guinea (PNG-7.18) was also subcloned into
150 pEGFP-N1 plasmid, as previously described (VanBuskirk et al., 2004a). The allele PNG-7.18
151 belongs to a discrete allelic family which differs, within the critical receptor recognition region
152 of the DBP ligand domain from the reference clone Sal-1 (Cole-Tobian and King, 2003).
153 Recombinant plasmids were purified by use of an endotoxin-free plasmid DNA purification
154 system (Qiagen, Valencia, CA).

155

156 ***COS cell transfection and erythrocyte-binding assays.*** Recombinant plasmids were
157 transfected into COS-7 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) by use of
158 lipofectamine and Plus-reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) according to
159 manufacturer's protocols. Briefly, COS-7 cells into six-well culture plate (1×10^5 cells/well)
160 were transfected with plasmids (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$)-liposome complexes (5% Plus-reagent and 3%
161 lipofectamine) in Dulbeccos' modified Eagle medium (DMEM, Sigma) without serum. After 6-
162 hours of cells exposure to DNA-liposome complexes (37°C, 5% CO₂), transfection medium
163 was replaced by DMEM with 10% of fetal bovine serum (Gibco-BRL). At 24 h after
164 transfection, culture medium was replaced again and efficiency of transfection was assessed by
165 fluorescence. Forty-two hours after transfection, the erythrocyte-binding assays were
166 performed as previously described (Michon et al., 2000). For this, antiserum was added at 1:40,
167 and plates were incubated for 1 h at 37°C in 5% CO₂. The 1:40 dilution was chosen because in
168 previous experiments this dilution provided a wide range of inhibitory activity among different
169 plasmas (Ceravolo et al., *submitted*). Human O⁺ erythrocytes in a 10% suspension were added
170 to each well (200 $\mu\text{l}/\text{well}$), and plates were incubated for 2 h at room temperature. Unbound
171 erythrocytes were then removed by washing the wells 3 times with PBS. Binding was
172 quantified by counting rosettes observed over 10-20 fields of view (200x). Positive rosettes
173 were defined as adherent erythrocytes covered more than 50% of the COS cell surface. For
174 each assay, pooled plasma samples from Souza residents, characterized as non-responders by
175 ELISA, were used as negative control. An additional control included a pool of plasma from
176 individuals with long-term exposure to malaria in the Amazon area (positive control). Results
177 were expressed as the relative percentage of binding as compared with negative controls (100%
178 binding).

179

180 ***PCR amplification of genes encoding P. vivax DBP_{II}.*** Extracted DNA was used as a
181 template in PCR to amplify the fragment corresponding to nucleotide positions 504-1,748

182 (amino acids 168-582) of the DBP_{II}, as described before (Sousa et al., 2006). Platinum high
183 fidelity *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) was used in PCR to reduce
184 possible nucleotide mis-incorporation. Amplicons were purified using QiaQuick purification
185 Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and directly sequenced using Thermo sequenase primer cycle
186 sequencing kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and a MegaBace 500 DNA
187 sequencer (Amersham Biosciences). The sequences were analyzed using on Bioedit software
188 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) and aligned on Clustal W (clustalw.genome.jp) to
189 identify the polymorphisms at residues 308, 384, 386, 417, 424, 437, 447 and 503 according to
190 VanBuskirk and colleagues (2004a).

191

192 **Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using the Epi-Info 2002 software
193 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) or MiniTab statistical software
194 (Minitab Inc., USA). Differences in means were tested by Student's t test or one-way analysis
195 of variance (ANOVA). Differences in proportions were evaluated by the Yates's chi-square
196 (χ^2) or Fisher's exact tests. *P* values < 0.05 were considered significant.

197

198 RESULTS

199

200 **Antibody responses to DBP_{II-IV} and MSP1₁₉ at enrollment.** Thirty-three individuals
201 participated in the 5 cross-sectional surveys, being 15 of them with previously confirmed *P.*
202 *vivax* infection in the outbreak area (cases) and 18 who had non-experienced malaria infection
203 (non-cases). At the first cross-sectional survey, only 20% (3 out of 15) of malaria cases had
204 antibodies to DBP_{II-IV} (Table 1); in contrast, the MSP1₁₉ were initially recognized by 80% (12
205 out of 15) of these individuals. No one of the eighteen individuals, who were considered to be
206 exposed to the risk of infection (non-cases), developed antibodies against either anti-DBP_{II-IV} or
207 anti-MSP1₁₉. In this group, we speculated that "resistance" to malaria infection would result

208 from the lack of DARC glycoprotein on red blood cells. Since none of the individuals studied
209 were homozygous for the allele FY^{*ES} , which confer refractoriness to *P. vivax* infection, we
210 concluded that absence of DARC on RBCs was not responsible for the resistance to malaria in
211 this group (Table 1).

212

213 ***Relationship between malaria status and anti-DBP antibodies during a 12-month follow-up***
214 ***period.*** Although only 20% of individuals who had had *P. vivax* develop antibodies to DBP_{II-IV},
215 a secondary boosting could be achieved by the time of a new episode of malaria, making 80%
216 of responders at this time (Figure 1a). Nevertheless, in those individuals the frequency of
217 responders decreased in few months after the clinical attack. In addition, the titers of anti-DBP
218 antibodies were also lower during all the follow-up period (Figure 1c). The serological
219 response to MSP1₁₉ was distinctly different (Figure 1b). Regardless the presence of *P. vivax*
220 relapses, the MSP1₁₉ appeared as a highly immunogenic molecule for most individuals who had
221 had malaria, being 14 out of 15 (93%) positives for anti-MSP1₁₉ IgG antibodies. Besides the
222 high positivity to MSP1₁₉, decreasing in the levels of this antibody response was observed with
223 time, being more evident in non-relapse group (Figure 1d). Throughout the study period, no
224 one from uninfected group (non-case) developed antibodies against either anti-DBP or anti-
225 MSP1₁₉ (data not shown).

226

227 ***Inhibitory activity in functional assay, and its relationship with DBP_{II} polymorphisms.***
228 Aiming to characterize the *P. vivax* isolate responsible to the malaria outbreak, we analyzed
229 DNA sequences from primary/relapses samples, and demonstrated that a single *dbpII* allele was
230 detected in the outbreak area. This allele differed, within the critical binding motif of DBP_{II}, at
231 multiple codons, from the *P. vivax* laboratory reference clone Sal-1 (Table 2). Concerning the
232 major residues previously suggested to altering the immune recognition of DBP_{II} (VanBuskirk
233 et al., 2004a), the outbreak isolate closely matched to an allele from Papua New Guinea, named

234 PNG 7.18, in which the same polymorphic residues are present at those major codons (Table
235 2). Targeting to investigate the specificities of the anti-DBP outbreak plasmas to inhibit the
236 erythrocyte-binding function of the protein, we performed erythrocyte-binding assays by using
237 COS-7 cells expressing sequences of DBP_{II} which are similar (PNG 7.18) or not (Sal-1) to
238 those of the outbreak isolate. The results demonstrated that anti-DBP outbreak plasma samples
239 do not inhibited Sal-1 DBP_{II} binding. In contrast, the same plasmas inhibited binding of PNG
240 7.18 by means of ~50 %; regardless *P. vivax* relapses, these samples showing a loss of this
241 inhibitory antibody response after 6 months of follow-up.

242

243 DISCUSSION

244

245 Naturally occurring antibodies to DBP are prevalent in individuals living in areas where
246 malaria is endemic (Fraser et al., 1997; Xainli et al., 2003; Ceravolo et al., 2005). Also, this
247 immune response includes antibodies that block DBP binding activity to erythrocytes (Michon
248 et al., 2000). No previous study has examined in detail the role of this antibody response during
249 exposure of non-immune persons to a single malaria infection. The present study showed that
250 DBP induces a positive humoral response in individuals who had their first, brief, and unique
251 exposure to malaria, during a *P. vivax* malaria outbreak, outside of the Brazilian Amazon area.
252 Since the study was designed to follow immunological responses of participants for 5
253 consecutive time-points, with intervals of 3 months, the results demonstrated that DBP has very
254 low immunogenicity and induces a short-term humoral immune response. This profile of
255 antibody response is different from that described to the apical membrane antigen 1 (AMA-1),
256 another parasite microneme ligand, in which the frequency of responders varied between 60 to
257 80% among primary-infected individuals (Rodrigues et al., 2005; Morais et al., 2006). The
258 difference between AMA-1 and DBP immune responses is corroborated by our finding in this
259 outbreak area, where AMA-1 seems to be highly immunogenic (Braga and Carvalho,

260 unpublished results). These results are not unexpected, while DBP has been considered a “just-
261 in-time” release protein (Adams et al., 1990; VanBuskirk et al., 2004b; Singh et al., 2006), the
262 AMA-1 is expressed during both the sporozoite and merozoite stages of the parasite's life cycle
263 (Healer et al., 2002; Silvie et al., 2004).

264

265 In Souza community, the period of malaria transmission was considerate short (~50 days),
266 being interrupted by treatment of all patients with antimalarial drugs and outdoor/indoor
267 spraying of residual insecticide (Zumpano et al., 2004). Considering that transmission was
268 promptly interrupted, the second attack of *P. vivax*, which occurred about two months latter,
269 was considered a relapse due to *P. vivax* hypnozoites. Although only few individuals initially
270 developed anti-DBP antibodies, a boosting of this antibody response was achieved at the time
271 of a relapse (4 out 5, 80% of responders). Our results extend earlier observations which
272 demonstrated that repeated exposure to *P. vivax* leads to boosting of the antibody response to
273 DBP, including areas where the disease is highly endemic (Fraser et al., 1997; Xainli et al.,
274 2003) as well as in regions of unstable malaria transmission (Ceravolo et al., 2005).

275

276 The antibody responses against the DBP were not stable during the follow-up; however,
277 response to MSP1₁₉ - a much more abundant blood stage molecule than DBP - was highly
278 stable. Regardless the presence of relapse, the frequency of responder to MSP1₁₉ was similar in
279 all 5-time points, albeit at lower magnitude in non-relapses group. This longer-term stability of
280 antibodies against *P. vivax* MSP1 had been well documented (Braga et al., 1998; Morais et al.,
281 2005), including its persistence for 30 years after malaria exposure (Lim et al., 2004). None of
282 the eighteen individuals who were considered to be exposed to the risk of infection (non-cases)
283 developed antibodies against either anti-DBP or anti-MSP1₁₉, being the absence of DARC on
284 erythrocytes (Fy^{*ES}/Fy^{*ES} genotype) not responsible for the absence of infection in this group.
285 Also, the frequencies of individuals who carried one DARC antigen negativity allele

286 (Fy^*B/Fy^*B^{ES} or Fy^*A/Fy^*B^{ES}), in which DBP adherence to erythrocytes is significantly
287 reduced (Michon et al., 2001), were similar between cases and non-cases. We conclude that the
288 absence of infection in this group, as confirmed by PCR diagnosis, was due to the brief
289 exposure of them to infected vectors.

290

291 For molecular analysis, we compared DNA sequences from primary/relapse samples to
292 analyze whether isolate causing the primary attack was genetically different from that arising
293 during relapses. The results showed that a single *dbpII* allele was detected in the outbreak area.
294 This was not surprising because the outbreak parasite was originated from a single patient who
295 had had a *P. vivax* relapse after return from the Amazon area (Cerbino et al., 2004; Zumpano et
296 al., 2004). Our results corroborated a previous study of *P. vivax* relapses in Brazil, which
297 demonstrated - by using the MSP1 molecule as a genetic marker - that parasites from the
298 primary attack were identical to those in relapses (Kirchgatter and del Portillo, 1998). Our
299 results also demonstrated that the *dbpII* outbreak allele belongs to the allelic family VII, one of
300 the eight DBP_{II} variant families representing the haplotypes present in Brazilian isolates, which
301 had been recently characterized by our group (Sousa et al., 2006).

302

303 Concerning the most commonly variant amino acids at DBP region II (at residues 308, 384,
304 386, 417, 424, 437, 447 and 503) (VanBuskirk et al., 2004a), the *P. vivax* outbreak allele
305 closely matched the PNG-7.18, a *dbpII* allele which belongs to a discrete allelic family (PNG-
306 b) previously described in Papua New Guinea (Cole-Tobian and King, 2003; Xainli et al.,
307 2000). By the other hand, the outbreak allele differed, within the same variant region of the
308 DBP ligand domain, at multiple codons, from the *P. vivax* laboratory reference clone Sal-1
309 (Cole-Tobian and King, 2003). To determine how parasite genetic diversity relates to natural
310 acquired neutralizing antibodies against DBP, we performed functional assays by using in
311 parallel PNG-7.18 and Sal-1 alleles on COS cells. The results demonstrated that while anti-

312 parallel PNG-7.18 and Sal-1 alleles on COS cells. The results demonstrated that while anti-
313 DBP outbreak plasmas do not inhibited erythrocyte binding of the unrelated Sal-1 allele, a
314 significant inhibition was detected by using the antigenically-similar PNG-7.18 allele. This
315 result confirms that polymorphisms in the codons that differ between the PNG 7.18 and Sal-1
316 alleles change DBP antigenic character and compromised the immune inhibition, as suggested
317 before by using rabbit immune-sera (VanBuskirk et al., 2004a). Of importance, the outbreak
318 and PNG-7.18 alleles share the trio of polymorphic residues (at codons 417, 437 and 503)
319 shown to collectively alter significantly sensitivity to inhibitory antibodies. Together, these
320 results point toward to strain specificity in the natural immune response against DBP.
321 Consistent with this hypothesis, we demonstrated that in the Amazon area only individuals with
322 long-term exposure to malaria do acquire anti-DBP antibodies that inhibit binding of different
323 DBP_{II} variants to erythrocytes (Ceravolo et al, *submitted*). In that population, high titers of anti-
324 DBP inhibitory antibodies were found only in residents exposed to malaria transmission over a
325 period of 10 years. However, it is presently unclear how effective such natural antibody
326 responses may be in preventing disease. A long-term prospective study is needed to be carried-
327 out, in areas of asymptomatic malaria infection, to determine the protective nature of the
328 inhibitory anti-DBP_{II} antibodies in terms of anti-disease immunity.

329 **Legends**

330

331 Fig. 1. Twelve-month follow-up of individuals who had their first and brief exposition to *P.*
332 *vivax* during a malaria outbreak outside the Brazilian Amazon, and who had (n = 5), or not (n
333 = 10), a *P. vivax* relapse (↓). In **A** and **B**, percentage of responders to DBP or MSP1₁₉,
334 respectively. In **C** and **D**, sera reactivity to DBP (**C**) or MSP1₁₉ (**D**). Results are expressed as
335 index of reactivity (IR), being IR > 1.0 considered positive.

336

337 Fig. 2. Rosette-inhibitory activity by sera from the outbreak area (relapse and non-relapse), and
338 from the endemic area (positive control). Erythrocyte-binding assays were performed with
339 transfected COS7 cells expressing *dbpII* allele Sal-1 (**A**) or PNG-7.18 (**B**) as GFP fusion
340 protein. Bars correspond to the mean ± SD of two different assays.

341 **Bibliography**

342

343 Adams, J. H., D. E. Hudson, M. Torii, G. E. Ward, T. E. Wellems, M. Aikawa, and L. H.
344 Miller, 1990, The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the
345 micronemes of invasive malaria merozoites: *Cell*, v. 63, p. 141-53.

346 Ampudia, E., M. A. Patarroyo, M. E. Patarroyo, and L. A. Murillo, 1996, Genetic
347 polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild
348 isolates: *Mol Biochem Parasitol*, v. 78, p. 269-72.

349 Braga, E. M., C. J. Fontes, and A. U. Krettli, 1998, Persistence of humoral response against
350 sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium*
351 *vivax*: *J Infect Dis*, v. 177, p. 1132-5.

352 Ceravolo, I. P., O. Bruna-Romero, E. M. Braga, C. J. Fontes, C. F. Brito, J. M. Souza, A. U.
353 Krettli, J. H. Adams, and L. H. Carvalho, 2005, Anti-*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein
354 Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon: *Am J Trop Med Hyg*, v. 72,
355 p. 675-681.

356 Cerbino, V. D. A., J. F. Zumpano, F. L. Leopoldo, V. M. R. Oliveira, R. A. D. Heneide, K. M.
357 Chaves, M. O. C. Rocha, M. Dayrell, and R. C. A. Nobis, 2004, Evolução e controle do Surto de
358 malária por *P. vivax* em Rio Manso, Minas Gerais - 2003: *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 37, p.
359 269.

360 Cole-Tobian, J., and C. L. King, 2003, Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax*
361 Duffy binding protein gene: *Mol Biochem Parasitol*, v. 127, p. 121-32.

362 Cunha, M. G., M. M. Rodrigues, and I. S. Soares, 2001, Comparison of the immunogenic
363 properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate
364 MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors: *Vaccine*, v. 20, p. 385-96.

365 Fang, X. D., D. C. Kaslow, J. H. Adams, and L. H. Miller, 1991, Cloning of the *Plasmodium*
366 *vivax* Duffy receptor: *Mol Biochem Parasitol*, v. 44, p. 125-32.

- 367 Fraser, T., P. Michon, J. W. Barnwell, A. R. Noe, F. Al-Yaman, D. C. Kaslow, and J. H.
368 Adams, 1997, Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax*
369 Duffy binding protein: *Infect Immun*, v. 65, p. 2772-7.
- 370 Healer, J., S. Crawford, S. Ralph, G. McFadden, and A. F. Cowman, 2002, Independent
371 translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites:
372 *Infect Immun*, v. 70, p. 5751-8.
- 373 Kho, W. G., J. Y. Chung, E. J. Sim, D. W. Kim, and W. C. Chung, 2001, Analysis of
374 polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates: *Korean J*
375 *Parasitol*, v. 39, p. 143-50.
- 376 Kirchgatter, K., and H. A. del Portillo, 1998, Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses
377 using the MSP1 molecule as a genetic marker: *J Infect Dis*, v. 177, p. 511-5.
- 378 Lim, K. J., J. W. Park, J. S. Yeom, Y. H. Lee, S. B. Yoo, J. H. Oh, M. J. Sohn, Y. Y. Bahk, and
379 Y. S. Kim, 2004, Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein
380 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*:
381 *Parasitol Res*, v. 92, p. 384-9.
- 382 McHenry, A. M., and J. H. Adams, 2006, The crystal structure of *P. knowlesi* DBPalpha DBL
383 domain and its implications for immune evasion: *Trends Biochem Sci*, v. 31, p. 487-91.
- 384 Michon, P., T. Fraser, and J. H. Adams, 2000, Naturally acquired and vaccine-elicited
385 antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein:
386 *Infect Immun*, v. 68, p. 3164-71.
- 387 Michon, P., I. Woolley, E. M. Wood, W. Kastens, P. A. Zimmerman, and J. H. Adams, 2001,
388 Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the
389 *P. vivax* ligand required for blood-stage infection: *FEBS Lett*, v. 495, p. 111-4.
- 390 Miller, L. H., S. J. Mason, D. F. Clyde, and M. H. McGinniss, 1976, The resistance factor to
391 *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy: *N Engl J Med*, v. 295, p.
392 302-4.

- 393 Morais, C. G., I. S. Soares, L. H. Carvalho, C. J. Fontes, A. U. Krettli, and E. M. Braga, 2005,
394 IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among
395 subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil: *Parasitol Res*, v. 95, p. 420-6.
- 396 Morais, C. G., I. S. Soares, L. H. Carvalho, C. J. Fontes, A. U. Krettli, and E. M. Braga, 2006,
397 Antibodies to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Persistence and Correlation with
398 Malaria Transmission Intensity: *Am J Trop Med Hyg*, v. 75, p. 582-587.
- 399 Olsson, M. L., C. Hansson, N. D. Avent, I. E. Akesson, C. A. Green, and G. L. Daniels, 1998,
400 A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood
401 group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers: *Transfusion*, v. 38,
402 p. 168-73.
- 403 Ranjan, A., and C. E. Chitnis, 1999, Mapping regions containing binding residues within
404 functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding
405 proteins: *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 96, p. 14067-72.
- 406 Rodrigues, M. H., K. M. Rodrigues, T. R. Oliveira, A. N. Comodo, M. M. Rodrigues, C. H.
407 Kocken, A. W. Thomas, and I. S. Soares, 2005, Antibody response of naturally infected
408 individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: *Int J Parasitol*, v.
409 35, p. 185-92.
- 410 Silvie, O., J. F. Franetich, S. Charrin, M. S. Mueller, A. Siau, M. Bodescot, E. Rubinstein, L.
411 Hannoun, Y. Charoenvit, C. H. Kocken, A. W. Thomas, G. J. Van Gemert, R. W. Sauerwein,
412 M. J. Blackman, R. F. Anders, G. Pluschke, and D. Mazier, 2004, A role for apical membrane
413 antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites: *J Biol Chem*,
414 v. 279, p. 9490-6.
- 415 Singh, S. K., R. Hora, H. Belrhali, C. E. Chitnis, and A. Sharma, 2006, Structural basis for
416 Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain: *Nature*, v. 439, p. 741-4.

- 417 Singh, S. K., A. P. Singh, S. Pandey, S. S. Yazdani, C. E. Chitnis, and A. Sharma, 2003,
418 Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains
419 necessary for erythrocyte invasion: *Biochem J*, v. 374, p. 193-8.
- 420 Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, and K. N. Brown, 1993, Identification of
421 the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and
422 detection of a high prevalence of mixed infections: *Mol Biochem Parasitol*, v. 58, p. 283-92.
- 423 Sousa, T. N., I. P. Ceravolo, C. J. Fernandes Fontes, A. Couto, L. H. Carvalho, and C. F. Brito,
424 2006, The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among
425 *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area: *Mol Biochem Parasitol*, v. 146, p.
426 251-4.
- 427 Tsuboi, T., S. H. Kappe, F. al-Yaman, M. D. Prickett, M. Alpers, and J. H. Adams, 1994,
428 Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding
429 protein: *Infect Immun*, v. 62, p. 5581-6.
- 430 VanBuskirk, K. M., J. L. Cole-Tobian, M. Baisor, E. S. Sevova, M. Bockarie, C. L. King, and
431 J. H. Adams, 2004a, Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding
432 protein confers resistance to inhibitory antibodies: *J Infect Dis*, v. 190, p. 1556-62.
- 433 VanBuskirk, K. M., E. Sevova, and J. H. Adams, 2004b, Conserved residues in the
434 *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor
435 recognition: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 15754-9.
- 436 Wertheimer, S. P., and J. W. Barnwell, 1989, *Plasmodium vivax* interaction with the human
437 Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein: *Exp*
438 *Parasitol*, v. 69, p. 340-50.
- 439 Xainli, J., J. H. Adams, and C. L. King, 2000, The erythrocyte binding motif of *Plasmodium*
440 *vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from
441 Papua New Guinea: *Mol Biochem Parasitol*, v. 111, p. 253-60.

- 442 Xainli, J., J. L. Cole-Tobian, M. Baisor, W. Kastens, M. Bockarie, S. S. Yazdani, C. E. Chitnis,
443 J. H. Adams, and C. L. King, 2003, Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax*
444 Duffy binding protein: *Infect Immun*, v. 71, p. 2508-15.
- 445 Zumpano, J. F., M. O. C. Rocha, K. M. Chaves, R. B. Silva, R. C. Freitas, M. H. Betti, R. A. D.
446 Heneide, and V. D. A. Cerbino, 2004, Estudo das recaídas no surto de malária por *P. vivax* no
447 distrito de Sousa, município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil.: *Rev Soc Bras Med Trop*, v.
448 37, p. 267.

449 **Table 1.** Demographic, immunologic and genetic data of individuals who had been enrolled in
 450 the study carried-out in the *P. vivax* malaria outbreak area
 451

Characteristics		Cases (n = 15)	Non-cases (n = 18)
Age, years (mean \pm SD) ^a		32 \pm 13	34 \pm 19
Antibody Response, n (%) ^b	MSP1 ₁₉	12 (80%)	0 (0%)
	DBP	3 (20%)	0 (0%)
DARC functional alleles, n (%) ^c	One (<i>Fy*A</i> or <i>Fy*B</i>)	6 (40%)	6 (33%)
	Two (<i>Fy*A</i> and/or <i>Fy*B</i>)	9 (60%)	12 (67%)
	None (<i>Fy*B^{ES}</i>) ^d	0	0

452 ^a Difference not significant ($t = 0.02$, $P > 0.05$);

453 ^b Number (%) of individuals with a positive antibody response at the time of first cross-sectional
 454 survey

455 ^c The frequencies of individuals bearing the functional alleles *Fy*A* and *Fy*B* (*Fy^a* and *Fy^b*
 456 antigens on erythrocytes, respectively) were similar between cases and non-cases ($P > 0.05$).

457 ^d None = homozygosity for the allele *FY*B^{ES}*, which abrogate DARC antigens expression on
 458 erythrocytes

21

439 **Table 2.** The pattern of major polymorphism of DBP_{II}.

440

	Codons positions*							
	308	384	386	417	424	437	447	503
Reference Clone Sal-1	R	D	K	N	L	W	S	I
Outbreak	S	G	N	K	I	R	S	K
PNG 7.18**	S	G	Q	K	I	R	S	K

441

442 *Most commonly variant amino acids at DBP_{II} in PNG, according to VanBuskirk *et al.* (2004).

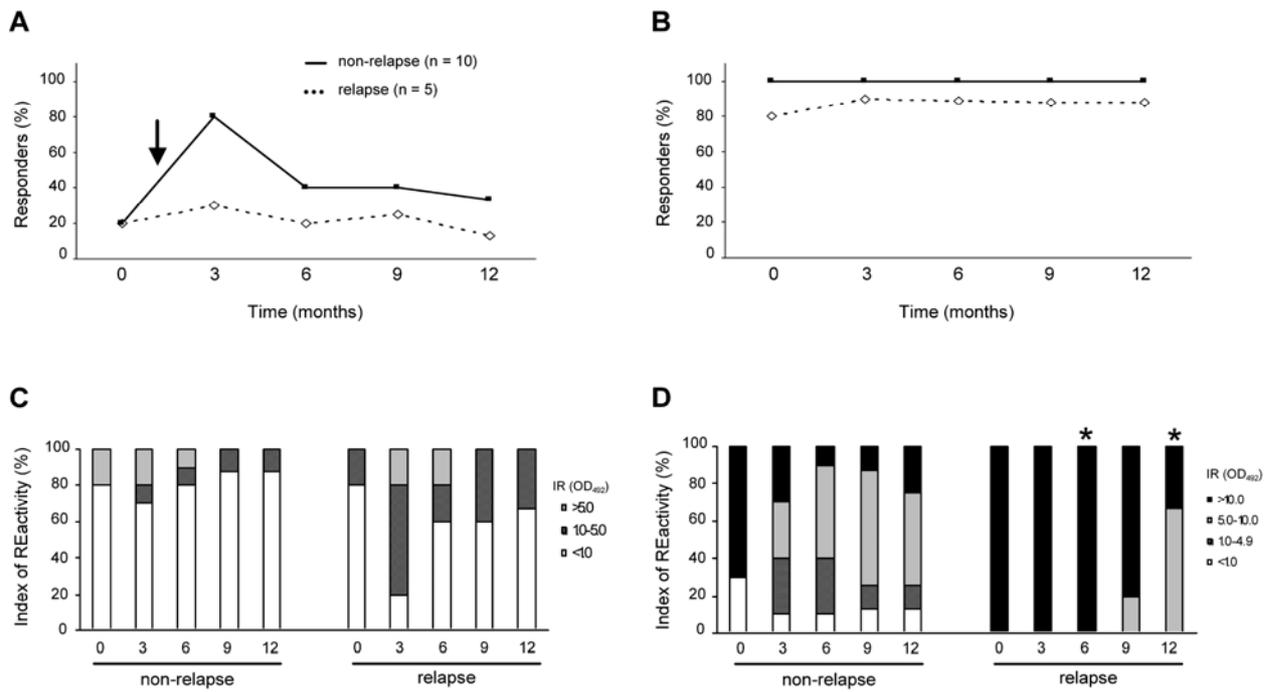
443 **Allele previously described in Papua New Guinea, which closely matched the outbreak *dbp*

444 allele.

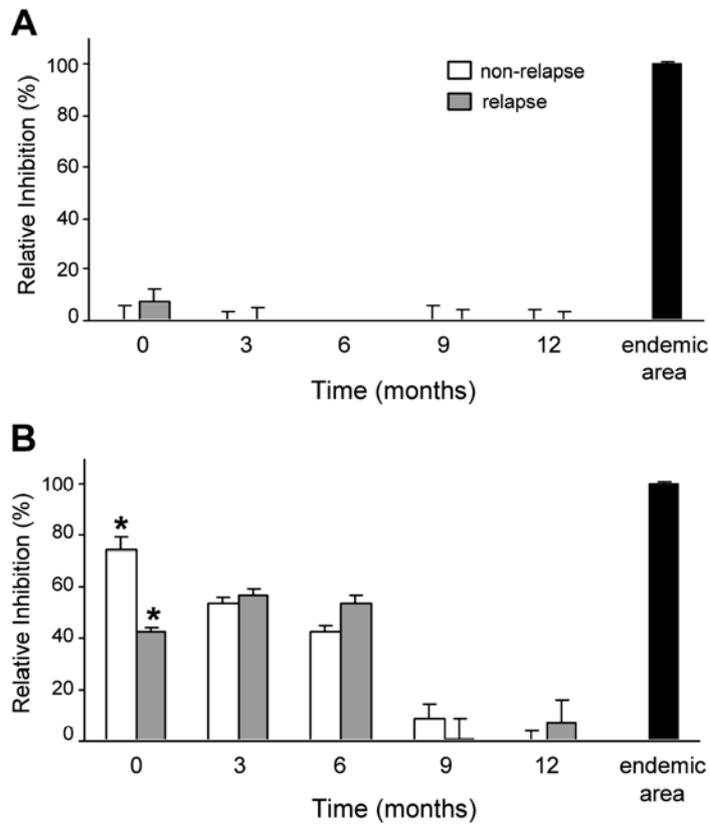
445 Grey boxes show the common residues between the outbreak and PNG 7.18 DBP_{II} variants.

467

Ceravolo et al, Fig. 1



Cerávolo et al, Fig. 2



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*B^{ES}* allele (ES stands for erythroid silent) [13]. The *FY*B^{ES}* 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*A^{ES}* - 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*B^{ES}*. 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

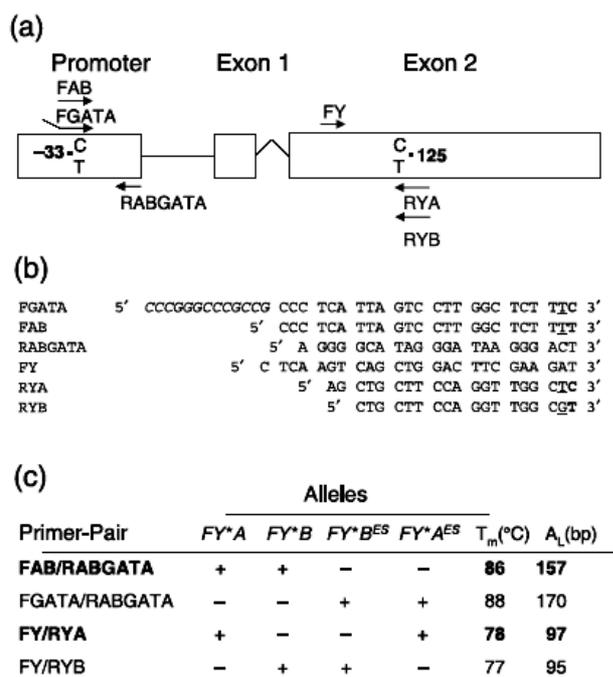


Fig. 1 Schematic diagram of primers for Duffy genotyping by real-time PCR. (a) Schematic representation of *FY* gene showing FAB/RABGATA and FGATA/RABGATA primer-pairs to detect the polymorphism -33T>C in gene promoter, amplifying the wild-type and mutated promoter, respectively. FY/RYA and FY/RYB primer-pairs 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 italic, 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 (A_L). 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

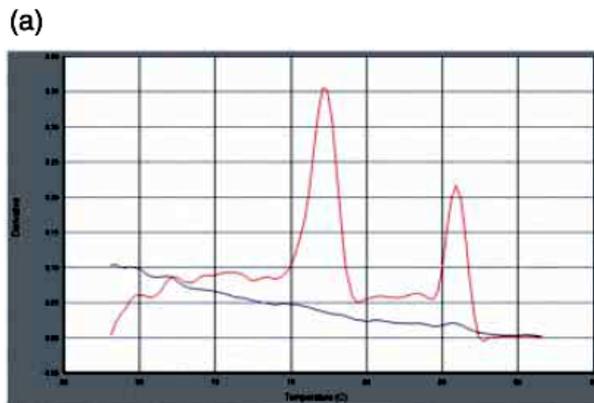
To measure the accuracy of real-time PCR, we previously identified 76 samples from our Research Institute by Duffy phenotyping, after which these samples were codified and the Duffy genotyping performed by using PCR-ASP and real-time PCR. Our results of Duffy genotyping on real-time PCR totally agree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

Comparative costs

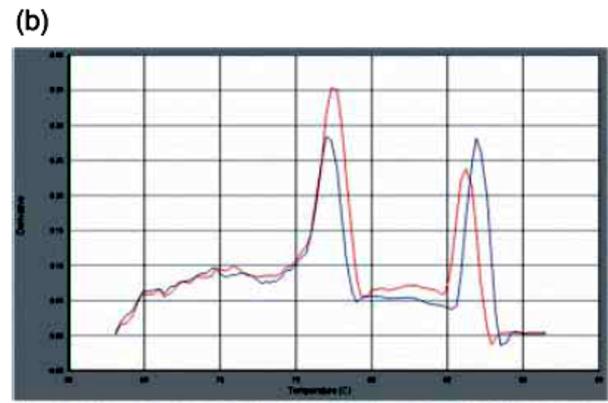
Table 2 shows the comparison of costs to perform the different protocols described for the Duffy genotyping. Excluding the equipment, our methodology implies in the lowest final cost for Duffy genotyping.

Analysis of Duffy genotyping among field populations

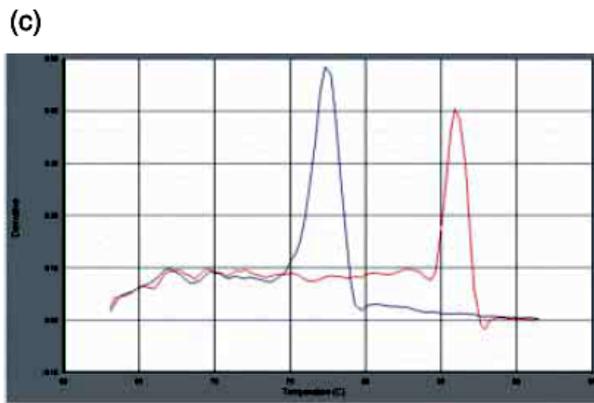
In order to validate our assay, we analysed field samples from Brazilian endemic areas, including *P. vivax*-infected, *P. falciparum*-infected, and non-infected individuals (Table 3). The last two groups were analysed together, as a control group because *P. falciparum* does not use Duffy pathway to 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



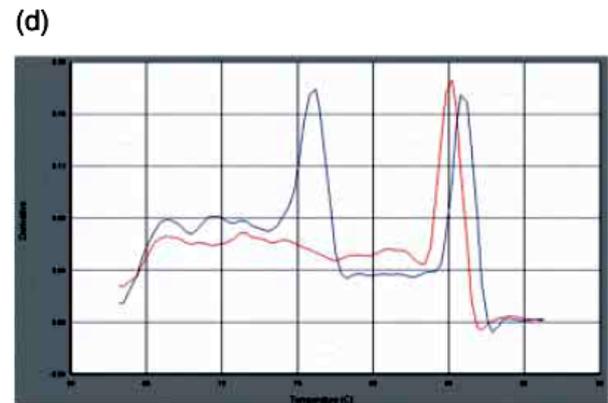
Tube 1 (red) FY^*A + WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B - MUTp -
 Genotype - FY^*A/FY^*A



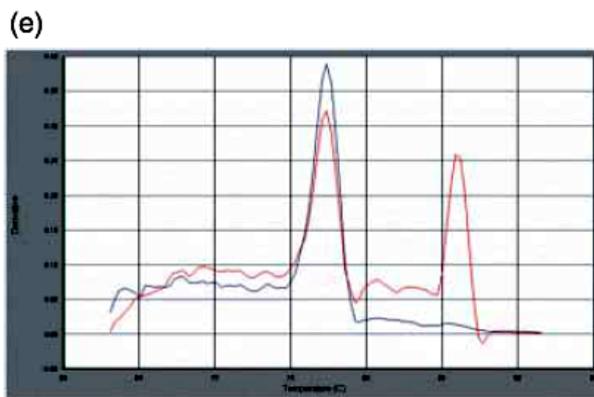
Tube 1 (red) FY^*A + WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp +
 Genotype - FY^*A/FY^*B^{ES} or FY^*A^{ES}/FY^*B



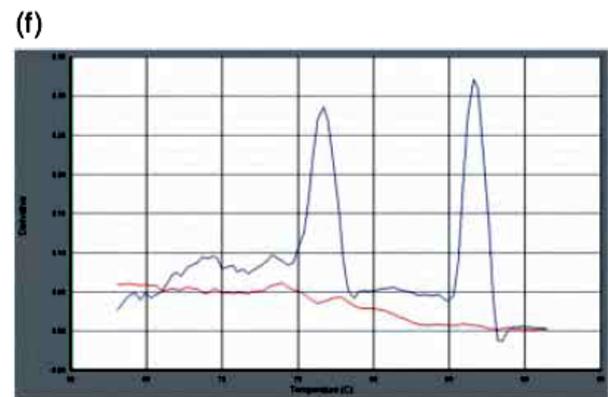
Tube 1 (red) FY^*A - WTp +
 Tube 2 (blue) FY^*B + MUTp -
 Genotype - FY^*B/FY^*B



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



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



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
	<i>FY*A/FY*A</i>	<i>FY*A/FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B/FY*B</i>	<i>FY*B/FY*B^{ES}</i>	<i>FY*A/FY*B</i>	<i>FY*B^{ES}/FY*B^{ES}</i>	
<i>FY*A/FY*A</i>	10 ^a	0	0	0	0	0	10
<i>FY*A/FY*B^{ES}</i>	0	7	0	0	0	0	7
<i>FY*B/FY*B</i>	0	0	17	0	0	0	17
<i>FY*B/FY*B^{ES}</i>	0	0	0	17	0	0	17
<i>FY*A/FY*B</i>	0	0	0	0	20	0	20
<i>FY*B^{ES}/FY*B^{ES}</i>	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	0-21/0-376 ^a		
Primers	0-002	0-0023	0-8	0-0319
Enzymes	0-65 ^b	NA	NA	NA
Results visualization	0-1	0-01	NA	NA
Consumables	0-098	0-098	0-18	0-075
Total/reaction ^c	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 *Ban*I and *Sty*I.

^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 deliberated 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.

378 T. N. Sousa *et al.*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	7	FY*A	0.39	0.35
			FY*A/FY*B ^{ES}	12	19	FY*B	0.49	0.42
Fy(a-b+)	38	37	FY*B/FY*B	24 ^c	11	FY*B ^{ES}	0.13 ^e	0.23
			FY*B/FY*B ^{ES}	14 ^d	26	FY*A ^{ES}	0	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. malariae*-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*AE^S* or *FY*BE^S* 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
- Mathew 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, Boatin 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: Arg89Cys 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. *Vox 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, Arent 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 A, 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,

380 T. N. Sousa *et al.*

- Castellano HM, Weimer TD, 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

Available online at www.sciencedirect.com

Molecular & Biochemical Parasitology 146 (2006) 251–254

MOLECULAR
& BIOCHEMICAL
PARASITOLOGY

Short communication

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

Taís N. Sousa^a, Isabela P. Cerávolo^a, Cor Jésus Fernandes Fontes^b,
Álvaro Couto^c, Luzia 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 140 kDa 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 (DBPII) contains the binding motifs necessary for adherence of DBP to DARC on the erythrocyte surface. The minimal binding motif of DBPII 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 DBPII 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 DBPII ligand domain which were previously

Abbreviations: DBP, Duffy binding protein; DARC, Duffy antigen receptor for chemokines; DBL-EBP, Duffy binding-like erythrocyte binding protein; DBPII, 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).

252

T.N. Sousa et al. / Molecular & Biochemical Parasitology 146 (2006) 251–254

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 DYEnamicTM ET dye terminator kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and a MegaBace 500 DNA sequencer (Amersham). The sequences were analyzed using on 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	<u>K</u>	2.5	
III	R	D	K	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	S	<u>K</u>	7.5	PNG, SK
IV	R	<u>G</u>	K	N	L	W	S	I	22.5	Col
V	R	<u>G</u>	K	N	L	W	S	<u>K</u>	37.5	
VI	R	<u>G</u>	K	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	S	I	12.5	
VII	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	N	<u>I</u>	W	S	I	5	PNG
VIII	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	S	<u>K</u>	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-1: 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 L424I, 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/Word Bank/WHO/TDR, CNPq, and FAPEMIG.

References

- [1] Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGiniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *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] 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.
- [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, Pattnaik 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A invasão dos eritrócitos é um passo chave para o estabelecimento da infecção pelo *Plasmodium*. Esse processo abrange uma cascata complexa de eventos envolvendo a interação entre receptores presentes no eritrócito e proteínas do parasito e, parece, portanto, ser um alvo para a resposta imune protetora. No presente trabalho, estudou-se a proteína PvDBP visto que ela apresenta um papel importante na invasão do parasito durante o desenvolvimento assexuado de estágios sanguíneos do *P. vivax*. Diante disso, a proposta do presente estudo foi avaliar aspectos imuno-epidemiológicos e moleculares da resposta imune induzida pela PvDBP em indivíduos expostos à transmissão de malária em diferentes regiões do Brasil.

1. Anticorpos anti-PvDBP são naturalmente induzidos em indivíduos expostos à transmissão de malária na Amazônia brasileira

O presente estudo correspondeu à primeira demonstração de que a PvDBP é naturalmente imunogênica em diferentes populações da Amazônia brasileira (Cerávolo *et al.*, 2005, **Artigo 1**). Nessas áreas de transmissão de malária, a prevalência e os níveis de anticorpos anti-PvDBP variaram em função do nível de exposição. Assim, a frequência de respondedores a PvDBP apresentou-se maior entre indivíduos que apresentavam história de longa exposição à malária em Apicás, MT (65%), do que entre aqueles que tinham sido esporadicamente expostos à doença (Belém, PA) (14%). Esses dados estão de acordo com os obtidos em comunidades situadas em áreas endêmicas da PNG (Fraser *et al.*, 1997; Michon *et al.*, 2000; Xainli *et al.*, 2003), onde foi sugerido um possível “boosting” da resposta imune devido à exposição cumulativa, que naquelas áreas de alta transmissão, corresponde ao aumento da idade do hospedeiro.

Tran *et al.* (2005) demonstraram que a resposta de anticorpos anti-PvDBP na Amazônia brasileira é constituída por anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3. Os autores demonstraram ainda que anticorpos anti-PvDBP correlacionam-se com a exposição cumulativa, o que corrobora os dados aqui apresentados. Assim, dados sobre resposta imune contra PvDBP obtidos em ambos os trabalhos (Cerávolo *et al.*, 2005, **Artigo 1**; Tran *et al.*, 2005) demonstram que populações expostas à transmissão instável de malária, como é o caso do Brasil, desenvolvem anticorpos anti-PvDBP como também observado em áreas hiperendêmicas da PNG (Fraser *et al.*, 1997). Apesar de estes achados serem de grande importância para o desenvolvimento de uma vacina, deve-se deixar claro que nem todos os anticorpos detectados pela sorologia convencional são capazes de bloquear a interação parasito-célula hospedeira. Assim, o presente trabalho teve como contribuição adicional, em uma segunda etapa, avaliar se esses anticorpos detectados pelo ELISA apresentavam um papel bloqueador.

2. A resposta de anticorpos anti-PvDBP na Amazônia brasileira inclui anticorpos que têm capacidade de inibir a interação ligante-receptor

Para realizar essa parte do estudo fez-se necessário a implantação no Laboratório de Malária do IRR de um ensaio funcional para anticorpos anti-PvDBP (região II, DBP_{II}) até, então, pioneiro no Brasil. Nesse ensaio, células de mamíferos COS-7 são transfectadas com um plasmídeo que contém a sequência que codifica a DBP_{II}, o que resulta na expressão do ligante (DBP_{II}) em fusão com a GFP (marcador de transfecção) na superfície celular. Após incubação das células transfectadas com os soros-testes e adição de eritrócitos, a porcentagem de inibição da interação ligante-receptor era determinada a partir da comparação do número de rosetas das amostras, com aquelas quantificadas no controle negativo. A partir da realização desse ensaio *in vitro* foi possível determinar se os anticorpos anti-PvDBP presentes nos soros/plasmas dos indivíduos avaliados inibiam a interação específica do ligante com seu receptor presente na superfície dos eritrócitos.

Os resultados obtidos permitiram demonstrar que a resposta imune anti-PvDBP na Amazônia inclui anticorpos que bloqueiam a interação ligante-receptor (Cerávolo *et al.*, **Artigo 2**). Esse dado é de grande relevância, visto que até o momento um único estudo tinha avaliado a atividade funcional desses anticorpos em área endêmica (Michon *et al.*, 2000). Além disso, aquele estudo foi realizado em uma área hiperendêmica (PNG) onde o perfil de transmissão de malária é diferente das áreas de transmissão de malária da América Latina, incluindo a Amazônia brasileira. O presente trabalho demonstrou que indivíduos com história de longa exposição à malária na Amazônia brasileira (≥ 10 anos, TNN e Apiacás, MT) apresentaram anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor contra diferentes variantes da DBP_{II} do parasito (Cerávolo *et al.*, **Artigo 2**). A detecção de anticorpos bloqueadores contra as três variantes avaliadas sugere que esses indivíduos com história de longa exposição à doença devem ter sido expostos a inúmeras variantes de *dbpII*. É de grande importância ressaltar que os títulos de anticorpos inibitórios foram relativamente elevados na Amazônia brasileira (até 1:1280), quando comparados àqueles detectados na PNG (até 1:80). Entretanto, como no estudo da PNG foi avaliada apenas uma variante da DBP_{II} (Sal-1) (Michon *et al.*, 2000; VanBuskirk *et al.*, 2004b), não se pode descartar a possibilidade de que a variante escolhida naquele estudo não fosse a mais adequada para avaliar a inibição da interação ligante-receptor na região.

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos realizados no Brasil têm demonstrado claramente a existência de infecções assintomáticas (Camargo *et al.*, 1999; Fontes, 2001; Alves *et al.*, 2002). Na área de Apiacás infecções assintomáticas foram identificadas em 7% dos garimpeiros (Fontes, 2001), o que nos possibilitou uma excelente oportunidade para avaliar a relação entre a malária assintomática e a resposta de anticorpos. Entretanto, no presente estudo não foi possível observar uma relação clara entre os níveis de anticorpos IgG anti-PvDBP e infecções maláricas assintomáticas. No entanto, a falta de um critério homogêneo para a

definição de “infecção assintomática” no Brasil tem dificultado a identificação e o acompanhamento desses indivíduos nas populações brasileiras, já que os estudos realizados têm monitorado a sintomatologia da população estudada por um período variável (Coura *et al.*, 2006). No presente trabalho foi considerado assintomático indivíduos com ausência de sintomas clínicos por um período de até 72h (Fontes, 2001), o que não descarta a possibilidade de que esses indivíduos tenham desenvolvido sintomas após o período de acompanhamento. Portanto, embora tenha sido demonstrado que indivíduos residentes em área de transmissão instável de malária adquirem anticorpos bloqueadores, ainda não está claro se esses achados correlacionam-se a um maior nível de proteção. Diante disso, a realização de um estudo prospectivo visando-se determinar a natureza protetora desses anticorpos na imunidade clínica da malária, ainda se faz necessário.

3. Indivíduos expostos pela primeira vez a infecção pelo *P. vivax* em área não endêmica desenvolvem anticorpos IgG anti-PvDBP

Até o presente momento, a maioria dos trabalhos realizados sobre resposta imune contra a PvDBP tinha sido desenvolvido em áreas endêmicas de malária e, por isso, nenhum estudo até então caracterizou com detalhes a resposta de indivíduos com história de exposição única a malária. Portanto, a ocorrência de um surto de transmissão autóctone de *P. vivax* na região metropolitana de Belo Horizonte concedeu uma excelente oportunidade para estudar a resposta anti-PvDBP nestas condições únicas de transmissão (Cerávolo *et al.*, **Artigo 3**).

Na área do surto foram estudados 33 indivíduos expostos à transmissão de malária por *P. vivax*, dos quais 15 se infectaram (casos), e 18 não se infectaram (não-casos, controles da área). Como todos os indivíduos tinham sido inicialmente considerados igualmente expostos à transmissão, a primeira hipótese a ser investigada foi a de que os 18 indivíduos que não se infectaram (não-casos) eram refratários à infecção por *P. vivax* devido à ausência do receptor do antígeno de grupo sanguíneo DARC na superfície dos eritrócitos (Miller *et al.*, 1976). Para avaliar essa hipótese, fez-se necessário a padronização da genotipagem do antígeno DARC pela técnica de PCR no Laboratório de Malária do IRR (Sousa *et al.*, 2007, **Artigo 4**). Inicialmente foi feita a genotipagem pela PCR convencional utilizando iniciadores alelo-específicos e, posteriormente, pela PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Apesar dos resultados obtidos por ambas as técnicas terem se mostrado sensíveis e adequados, optou-se pelo *Real Time PCR* devido a sua rapidez, praticidade e menor risco de contaminação. A genotipagem do antígeno do grupo sanguíneo DARC demonstrou que nenhum dos indivíduos estudados nessa região era DARC-negativo, sendo, portanto, suscetíveis à infecção pelo *P. vivax*. Além disso, a frequência de alelos funcionais (*FY*A* e *FY*B*) também se apresentou semelhante entre os casos e não-casos (Cerávolo *et al.*, **Artigo 3**). Essa análise foi importante já que indivíduos com apenas um alelo funcional (*FY*A* ou *FY*B*) expressam cerca de 50% menos antígeno (Fy^a ou Fy^b) na

superfície dos eritrócitos, sugerindo, assim, uma menor suscetibilidade à infecção pelo *P. vivax* (Zimmerman *et al.*, 1999; Cavasini *et al.*, 2001; Michon *et al.*, 2001). De fato, nosso grupo e outros pesquisadores recentemente demonstraram que indivíduos que apresentam dois alelos são mais suscetíveis à infecção pelo *P. vivax*, do que aqueles com apenas um alelo funcional (Sousa *et al.*, 2007, **Artigo 4**; Kasehagen *et al.*, 2007). Portanto, conclui-se que a ausência de infecção nos 18 indivíduos que não se infectaram (não-casos) não pode ser atribuída à ausência e/ou menor expressão do receptor DARC, mas provavelmente ao curto período de exposição à transmissão, ou a outros fatores que podem estar envolvidos. De fato, o período de transmissão do surto de malária ocorrido na comunidade de Souza foi considerado curto (~50 dias), já que ele foi interrompido a partir do tratamento de todos pacientes com drogas anti-maláricas, e da aplicação e aspersão de inseticidas residuais nas casas (Zumpano *et al.*, 2004).

A PvDBP apresentou baixa imunogenicidade no grupo que se infectou (casos), visto que apenas 20% dos indivíduos desenvolveram anticorpos anti-PvDBP após exposição às formas sanguíneas do parasito (primeiro coorte). Nenhum dos indivíduos do grupo não-caso desenvolveu anticorpos anti-PvDBP. O perfil de resposta de anticorpos anti-PvDBP apresentou-se diferente da PvMSP-1₁₉, já que praticamente 100% dos indivíduos que se infectaram desenvolveram anticorpos contra essa proteína (Cerávolo *et al.*, **Artigo 3**). A baixa imunogenicidade da PvDBP pode ser atribuída provavelmente à sua localização, visto que ela se encontra nos micronemas do parasito. Entretanto, a AMA-1, outra proteína presente nos micronemas, já demonstrou ser altamente imunogênica em indivíduos primo-infectados (Rodrigues *et al.*, 2005). Talvez a explicação mais plausível para esse fato seja a diferente expressão dessas proteínas no parasito. Enquanto a AMA-1 é expressa durante os estágios de merozoíto e esporozoíto (Healer *et al.*, 2002; Silvie *et al.*, 2004), a PvDBP está presente apenas no merozoíto, sendo liberada somente no momento da invasão (teoria do *just-in-time*) (VanBuskirk *et al.*, 2004b). Esse fato possibilita ao parasito minimizar a exposição direta do ligante funcional aos anticorpos inibitórios, sendo, portanto, um mecanismo de escape do *P. vivax* ao sistema imune do hospedeiro.

Considerando que a transmissão de malária por *P. vivax* foi prontamente interrompida nesta região, os novos episódios clínicos de malária que ocorreram aproximadamente dois meses após a infecção inicial, foram considerados recaídas devido aos hipnozoítos hepáticos. Nos indivíduos que tiveram recaída foi observado um “booster” da resposta de anticorpos anti-PvDBP, o que resultou em 80% de respondedores entre o 1º e o 2º coorte. Esse achado é relevante do ponto de vista do desenvolvimento de uma vacina, visto que apesar da PvDBP ser pouco imunogênica após uma infecção primária, uma segunda exposição às formas sanguíneas induz anticorpos anti-PvDBP na maioria dos indivíduos infectados. Apesar disso, o acompanhamento por 12 meses desses indivíduos demonstrou que essa resposta é de curta duração mesmo no grupo de indivíduos que apresentaram recaídas.

4. Anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor são induzidos contra uma variante semelhante à DBP_{II} que causou o surto

O sequenciamento da DBP_{II} de isolados de *P. vivax* da região do surto demonstrou que apenas um único alelo de *dbpII* foi detectado na região, sendo este mesmo alelo detectado nas infecções primárias e recaídas. Adicionalmente, o alelo circulante identificado no distrito de Souza demonstrou pertencer à família alélica VIII, uma das oito famílias variantes da DBP_{II} recentemente descritas pelo nosso grupo na Amazônia brasileira (Sousa *et al.*, 2006, **Artigo 5**). O fato de uma única variante ter sido detectada em Souza se justifica visto que o surto causado pelo *P. vivax* ocorreu a partir de um único indivíduo que retornou da Amazônia brasileira (Cerbino *et al.*, 2004; Zumpano *et al.*, 2004). Na região do surto, a presença de anticorpos anti-PvDBP desenvolvidos contra apenas uma variante da DBP_{II}, permitiu investigar se estes anticorpos eram variante-específicos. Para isso, no ensaio funcional foram utilizadas células COS-7 expressando uma variante de DBP_{II} relacionada (PNG 7.18) (VanBuskirk *et al.*, 2004a), ou não (Sal-1) (Fang *et al.*, 1991) à sequência da variante identificada no surto. Foi observado que, enquanto os anticorpos IgG anti-PvDBP não foram capazes de inibir a ligação de eritrócitos a variante Sal-1 de DBP_{II}, uma significativa inibição da interação ligante-receptor foi observada com a variante relacionada PNG 7.18 (~80%). Esse resultado sugere que os polimorfismos presentes nos códons que diferem as duas variantes avaliadas foram capazes de alterar a característica antigênica da DBP_{II} e, conseqüentemente, de comprometer a inibição imune, como anteriormente sugerido com soros-ímmunes de coelhos (VanBuskirk *et al.*, 2004a). Juntos, esses resultados sugerem que a especificidade da resposta imune funcional anti-DBP_{II} em uma população exposta pela primeira vez à infecção pelo *P. vivax* parece ser variante-específica.

Acredita-se que esse primeiro estudo realizado sobre o perfil da resposta imune a diferentes variantes da DBP_{II} no Brasil poderá contribuir para os atuais esforços direcionados para o desenvolvimento de uma vacina, e, até mesmo, para futuras triagens clínicas realizadas em áreas que apresentem transmissão instável de malária.

CONCLUSÕES

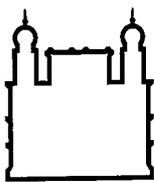
(i) A PvDBP é naturalmente imunogênica em diferentes populações da Amazônia brasileira, sendo a resposta de anticorpos proporcional ao tempo de exposição dos indivíduos ao parasito nas áreas de transmissão de malária.

(ii) A resposta de anticorpos anti-PvDBP na Amazônia brasileira incluiu anticorpos bloqueadores capazes de inibir a interação entre o ligante do parasito (DBP_{II}) e o seu receptor (DARC) presente na superfície dos eritrócitos.

(iii) Anticorpos IgG anti-PvDBP podem ser induzidos após uma única e breve exposição ao *P. vivax*, mas essa resposta é de curta duração mesmo nos indivíduos que apresentam recaída.

(iv) A recaída funciona como um *boosting* aumentando o nível de anticorpos IgG anti-PvDBP.

(v) Em uma população exposta pela primeira vez à malária, a especificidade da resposta imune funcional anti-PvDBP parece ser variante-específica.

ANEXO 1

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Malária

CONSENTIMENTO POR ESCRITO

Prezado Sr./Sra.

Você foi escolhido para fazer parte de um projeto de pesquisa que será conduzido no Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz sob a coordenação da Dra. Luzia Helena Carvalho, pesquisadora do Laboratório de Malária. O objetivo desse estudo é avaliar o desenvolvimento de uma resposta imune contra a malária, o que pode contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de uma vacina contra essa doença. Antes de assinar esse documento você deverá tomar conhecimento de:

- (1) O seu sangue será coletado (10ml).
- (2) O sangue coletado será usado para os ensaios sorológico bem como para obtenção de DNA necessários aos estudos relacionados a esse projeto de malária.
- (3) Você pode recusar participar do estudo.
- (4) A sua identidade será mantida em sigilo em qualquer publicação futura resultante desse estudo.
- (5) Não haverá nenhum custo para qualquer dos exames ou procedimentos realizados.

Eu declaro que concordo com este consentimento por escrito e que decidi participar desse projeto de pesquisa após ter sido completamente esclarecido sobre o mesmo. Eu estou ciente que receberei uma cópia desse consentimento escrito e que uma segunda cópia será registrada nos arquivos do Centro de Pesquisas René Rachou.

Nome:

Endereço:

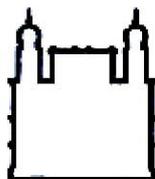
Assinatura:

Investigador:

Assinatura:

Data e Local:

ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzCentro de Pesquisas René Rachou
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos**REPORT # 002/2002 – CEPESH-CPqRR**

Protocol #: 004/2002

Research Project: "Molecular and immunological characterization of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in endemic areas of the Brazilian Amazon" (Caracterização imunológica e molecular da Duffy Binding Protein (DBP) do *Plasmodium vivax* em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira)

Responsible Researcher: Luzia Helena Carvalho**Institution:** Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ**Date of Submission:** December 14th, 2001.

The Ethical Committee of Research on Human Beings from the Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, according to the Resolution of the Brazilian Council on Health – CNS 196/96, decided for the approval of the proposed project on April 18th, 2002.

Decision: PROJECT APPROVALBelo Horizonte, April 19th, 2002.

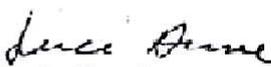
Alvaro Jose Romanha, PhD.
CEPESH-CPqRR – Coordinator

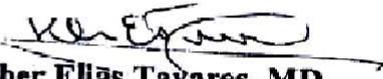


Maria Elizabeth Uchoa Denichelli, MD, PhD.
CEPESH-CPqRR - Vice-Coordinator

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


Maria Fernanda Furtado Lima e Costa, MD, PhD.
Representative of the CPqRR Researchers


Luci Maria Sant'ana Dusse, PhD.
Representative of the Regional Council of Pharmacy - MG

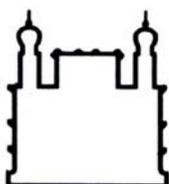

Kleber Elias Tavares, MD.
Representative of the Regional Council of Medicine - MG


Roberto Chateaubriand Domingues
*Representative of the Non Governmental Organization
 Group of Supporters to the AIDS Patients*


Tereziinha Marta Colombo Drumond
Representative of the Regional Council of Psychology - MG


Márcio Moreira Priest
Representative of a Religious Community

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

PARECER N° 07/2006 – CEPESH- CPqRR

Protocolo CEPESH/CPqRR n°: 01/2006

Projeto de Pesquisa: "*Plasmodium vivax* na Região Amazônica e extra-Amazônica brasileira: anticorpos bloqueadores da infecção e polimorfismos funcionais"

Pesquisador Responsável: Luzia Helena Carvalho

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

Data de entrada no CEP: 14/02/2006

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, após consideradas as respostas as pendências anteriores, constatou-se que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: PROJETO APROVADO

Belo Horizonte, 8 de maio de 2006.

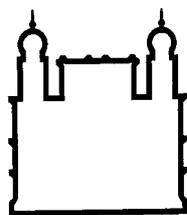
João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEPESH- CPqRR

Dr. João Carlos Pinto Dias
Pesquisador Titular
SIAPE 0319611 - CRM-MG 3688
LTEDC - CPqRR / FIOCRUZ

Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto, Belo Horizonte, MG, Brasil CEP: 30190-002

Tel.: 55 0xx31 3295 3566 (ramal 180) Fax: 55 0xx31 3295 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

ANEXO 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto René Rachou

Dra. Luzia Helena Carvalho, Laboratório de Malária (lhcarvalho@cpqrr.fiocruz.br)

Data ____/____/____

Paciente N° _____

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: (1) F (2) M Cor: (1) branca (2) parda (3) negra

Município de Residência: _____

Endereço: _____

Telefone de contato: _____

Você já tinha ouvido falar em malária antes do surto de Souza? (1) sim (2) não

Em caso positivo, como? _____

Você teve malária em Souza? (1) sim (2) não (3) duvidoso

Espécie? (1) *P.vivax* (2) *P.falciparum* (3) não sabe (9) não se aplica

Quando? _____

Como você suspeitou da doença? _____

Teve sintomas? (1) sim ..(2) não Quais? _____

Você concluiu o tratamento? (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica

Há quanto tempo? _____

Você chegou a ser hospitalizado por malária? (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica

Se sim, por quanto tempo? _____

Teve casos de malária na sua casa? (1) sim (2) não

Teve casos de malária na vizinhança? (1) sim (2) não distância? _____

Você reside nessa área? (1) sim (2) não

Há quantos anos você reside nessa área? _____

Você viajou recentemente? (1) sim (2) não Local: _____

Data: Ida: ____/____/____ Volta: ____/____/____

Você já residiu em áreas endêmicas de malária? (1) sim (2) não Local: _____

Apresentou nos últimos cinco anos, alguma doença grave? (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica Se positivo, qual? _____

Está gripado, ou com alguma infecção? _____

(1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica

Sinais/sintomas? _____

Está fazendo uso de algum medicamento? (1) sim (2) não (3) não sabe

Caso positivo, qual? _____ Há quanto tempo? _____

Você sabe como a malária é transmitida? _____

Como iniciou a doença aqui em Rio Manso? _____

Obs: _____

ANEXO 4



**GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE EPIDEMIOLOGIA**

OF.SE Nº 062/2003

Belo Horizonte, 09 de maio 2003.

Assunto: Projeto da FIOCRUZ

Senhora Coordenadora,

Tendo em vista que este estudo poderá contribuir para pesquisa de vacina para malária, damos parecer favorável às propostas do projeto anexo.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'V. de M. R. e O.', written over the typed name of the signatory.

Dra. Valéria de Melo Rodrigues e Oliveira
Superintendente de Epidemiologia – SES/SUS
Masp: 367408-2 - CRMMG: 11124

Ilma. Sra.
Dra. Luzia Helena Carvalho
CPqRR/FIOCRUZ
CAPITAL



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE MINAS GERAIS
SUPREINTENDÊNCIA DE EPIDEMIOLOGIA
COORDENADORIA DE CONTROLE DE ZOOSE

MEMO.CCZ/Nº 403/03

Belo Horizonte, 09 de maio de 2003

Valéria de Melo Rodrigues e Oliveira
Superintendente de Epidemiologia – SES - MG

Assunto: parecer - Projeto da FIOCRUZ

Senhora Superintendente,

Tendo em vista que este estudo poderá contribuir para pesquisa de vacina para malária, damos parecer favorável às propostas do projeto anexo.

Atenciosamente,

Francisco Leopoldo Lemos
Consultor da CCZ/SE/SES-MG

Anexos: 11

Rua Rio Grande do Norte, 613 – Funcionários - fones: 3213 – 4298 – 32137635 – fax: 3274-7849
Belo Horizonte-MG-CEP.: 30.130-130

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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: 7.085-7.089.
- Adams JH, Blair PL, Kaneko O, Peterson DA. An expanding *eb1* family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 2001; 17: 297-299.
- Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell. Biol.* 1978; 77: 72-82.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LHP, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66: 641-648.
- Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* 2005; 42: 777-779.
- Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht, F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C. R. Biologies* 2006a; 329: 858-862.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Med.* 2006b; 12: 220-224.
- 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: 269-272.
- Andrade ALSS, Martelli CMTA, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20: 475.
- Arevalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Mol. Immunol.* 2001; 38: 443-455.
- Arevalo-Herrera M, Castellanos A, Yazdani SS, Shakri AR, Chitnis CE, Dominik R, Herrera S. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in *Aotus* monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73: 25-31.
- Baird JK, Jones TR, Danidirgo EW, Annis BA, Bans MJ, Basri H, Purnomo KM, Masbar S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 45: 65-76.
- Bannister LH, Butcher GA, Dennis ED, Mitchell GH. Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites *in vitro*. *Parasitology* 1975; 71: 483-491.
- Barillas-Mury C, Kumar S 2005. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell. Microbiol.* 2005; 7: 1.539-1.345.
- Barnwell JW, Nichols ME, Rubisntein P 1989. *In vitro* evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 1.795-1.802.
- Barnwell JW, Wertheimer SP. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989; 313: 1-11.

- Barnwell JW, Galinski MR 1998. Invasion of vertebrate cells: erythrocytes. In U Frevert, A Crisanti, *Malaria Parasite, Pathogenesis and Protection*. Sherman IW, Washington. p. 73-92.
- Barnwell JW, Galinski MR, DeSimone SG, Perler F, Ingravallo P. *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-2 (PvRBP-2) shares structural features with PvRBP-1 and the *Plasmodium yoelii* 235 kDa rhoptry protein family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999; 198: 257-262.
- Berzins K, Anders RF 1999. The malaria antigens. In: ____ *Malaria Molecular and Clinical Aspects*. Switzerland: Harwood Academic Publishers, p.181-216.
- Black CG, Barnwell JW, Huber CS, Galinski MR, Coppel RL. The *Plasmodium vivax* homologues of merozoite surface proteins 4 and 5 from *Plasmodium falciparum* are expressed at different locations in the merozoite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002; 120: 215-224.
- Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet.* 2003; 361: 2.226 - 2.234.
- Bolad A, Berzins K. Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization. *Scand. J. Immunol.* 2000; 52: 233-239.
- Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU. Low cellular response *in vitro* among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66: 299-303.
- Camargo LM, Ferreira MU, Krieger H, Camargo EP, da Silva LP 1994. Unstable hypoendemic malaria in Rondônia (western Amazon Region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51: 16-25.
- Camargo LM, Dal Coletto GM, Ferreira UM, Gurgel SD, Escobar AL, Marques A, Krieger H, Camargo EP, da Silva LH. Hypoendemic malaria in Rondônia (western Amazon Region, Brazil): seasonal variation and risk groups in an urban locality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55: 32-38.
- Camargo LM, Noronha E, Villalobos JM, Dutra A, Krieger H, Pereira da Silva H. The epidemiology of malaria in Rondônia (Western Amazon region, Brazil): study of a riverine population. *Acta Trop.* 1999; 72: 1-11.
- Camus D, Hadley TJ. A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 1985; 230: 553-556.
- Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historic aspects of the burden of malaria. *Clin. Microbiol.* 2002; 15: 564-594.
- Carvalho LH, Fontes CJ, Fernandes AA, Marinuzzi HC, Krettli AU. Cross-reactive cellular immune response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. *Parasite Immunol.* 1997;19: 47-59.
- Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU. Cellular responses to *Plasmodium falciparum* major surface antigens and their relationship to human activities associated with malaria transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60: 674-679.
- Cavasini CE, Pereira FJT, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU. Duffy blood groups among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34: 591-595.

- Cavasini CE, Mattos LC, Alves RT, Couto AA, Calvosa VSP, Bonini-Domingos CR, Castilho L, Rossit ARB, Machado RLD. Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas. *Hum. Biol.* 2006; 78: 215-219.
- Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC, Alves RT, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2007 Jun 28 [Epub ahead of print].
- Cerbino VDA, Zumpano JF, Leopoldo FL, Oliveira VMR, Heneide RAD, Chaves KM, Rocha MOC, Dayrell M, Nobi RCA. Evolução e controle do surto de malária por *P. vivax* em Rio Manso, Minas Gerais - 2003. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37: 269.
- 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.
- Chizzolini C, Trottein F, Bernard FX, Kaufmann MH. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 45: 57-64.
- Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003; 127: 121-132.
- Collins WE, Cedillos RA, Warren M. The seroepidemiology of malaria in Middle America. IV. Passage of malaria antibodies from mothers to infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26: 1.105-1.107.
- Collins WE, Kaslow DC, Sullivan JS, Morris CL, Galland GG, Yang C, Saekhou AM, Xiao L, Lal AA. Testing the efficacy of a recombinant merozoite surface protein (MSP-1(19)) of *Plasmodium vivax* in *Saimiri boliviensis* monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60: 350-356.
- Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of mosquito infection on humans infected with *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68: 366-371.
- Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006; 101: 229-237.
- Cowman B, Crabb A. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006; 124: 755-766.
- 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: 385-396.
- David PH, del Portillo HA, Mendis KN. *Plasmodium vivax* malaria: parasite biology defines potential targets for vaccine development. *Biol. Cell.* 1988; 64: 251-260.
- Day KP, Marsh K. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunol. Today* 1991; 12: A68-A71.
- Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1986; 81: 5-14.
- Dolan SA, Miller LH, Wellems TE. Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 618-624.

- Dutta S, Daugherty JR, Ware LA, Lanar DE, Ockenhouse CF. Expression, purification and characterization of a functional region of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; 109: 179-184.
- Dutta S, Ware LA, Barbosa A, Ockenhouse CF, Lanar DE. Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2001; 69: 5.464-5.470.
- Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 1975; 187: 748-750.
- Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 44: 125-132.
- Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, Saul A. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; 108: 53-66.
- Fontes CJF 2001. *Epidemiologia da malária e fatores associados à infecção assintomática por Plasmodium em uma população de garimpeiros da Amazônia brasileira (Mato Grosso, 1996)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 178p.
- Fraser T, Michon P, Barnwell JW, Noe AR, Al-Yaman F, Kaslow DC, Adams JH. Expression and serological activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect. Immun.* 1997; 65: 2.772-2.777.
- FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Malária, PNCM, dezembro de 2002.
- Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW 1992. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell* 1992; 69: 1.213-1.226.
- Galinski MR, Corredor-Medina C, Pova M, Crosby J, Ingravallo P, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999; 101: 131-147.
- Galinski MR, Xu M, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-2 (PvRBP-2) shares structural features with PvRBP-1 and the *Plasmodium yoelii* 235 kDa rhoptry protein family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; 108: 257-262.
- Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34: 1.413-1.429.
- Gibson HL, Tucker JE, Kaslow DC, Krettli AU, Collins WE, Kiefer MC, Bathurst IC, Barr PJ. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 50: 325-333.
- Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: Burden of Disease. *Curr. Mol. Med.* 2006; 6: 137-140.
- Han ET, Park JH, Shin EH, Choi MH, Oh MD, Chai JY. Apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene sequences of re-emerging *Plasmodium vivax* in South Korea. *Korean J. Parasitol.* 2002; 40: 157-162.

- Hans D, Pattnaik P, Bhattacharyya A, Shakri AR, Yazdani SS, Sharma M, Choe H, Farzan M, Chitnis CE. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Mol. Microbiol.* 2005; 55: 1.423-1.434.
- Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect. Immun.* 2002; 70: 5.751-5.758.
- Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol.* 2007; 23: 122-128.
- Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog. Allergy* 1988; 41: 72-97.
- 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: 1.182-1.184.
- Joshi H. Markers for population genetic analysis of human plasmodia species, *P. falciparum* and *P. vivax*. *J. Vector Borne Dis.* 2003; 40: 78-83.
- Kasehagen LJ, Mueller I, Kiniboro B, Bockarie MJ, Reeder JC, Kazura JW, Kastens W, McNamara DT, King CH, Whalen CC, Zimmerman PA. Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygotes. *PLoS ONE* 2007; 2: e336.
- 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: 143-150.
- Kim S, Ahn HJ, Kim TS, Nam HW. ELISA detection of vivax malaria with recombinant multiple stage-specific antigens and its application to survey of residents in endemic areas. *Korean J. Parasitol.* 2003; 41: 203-207
- Kocken CH, Dubbeld MA, Van Der Wel A, Pronk JT, Waters AP, Langermans JA, Thomas AW. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect. Immun.* 1999; 67: 43-49.
- Ladeia-Andrade S 2005. *Aspectos epidemiológicos da malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil*. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 287p.
- Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, Matos GJ, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9: 425-430.
- MacDonald G 1957. *The Epidemiology and Control of Malaria*. Oxford University Press., London.
- Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, Long CA, Lambert L, Miles AP, Wang J, Stowers A, Miller LH, Saul A. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 2005; 23: 3.131-3.138
- Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR. Cross-sectional study defines differences in malaria morbidity in two Yanomani communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004; 99: 369-376.

- Mendis KN, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001; 64: 97-106.
- Michon PA, Arévalo-Herrera M, Fraser T, Herrera S, Adams JH. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998; 59: 597-599.
- Michon PA, Fraser T, Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. Infect. Immun. 2000; 68: 3.164-3.171.
- 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.
- 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.
- Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Persistence and Correlation with Malaria Transmission Intensity. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 75: 582-587.
- Mota MM, Rodrigues A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. Biosays 2002; 24: 149-156.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucleic Acids Res. 1990; 18: 6.169.
- Oaks JSC, Mitchell VS, Pearson GW, Carpenter CJ 1991. Malaria: obstacles and opportunities, p.169-210. National Academy Press, Washington, D.C.
- Oliveira CI, Wunderlich G, Levitus G, Soares IS, Rodrigues MM, Tsuji M, del Portillo HA. Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. Vaccine 1999; 17: 2.959-2.968.
- Oliveira-Ferreira J, Vargas-Serrato E, Barnwell JW, Moreno A, Galinski MR. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-9 recombinant proteins expressed in *E. coli*. Vaccine 2004; 22: 2.023-2.030.
- Olsson ML, Hansson C, Arent ND, Akesson IE, Grenn 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.
- Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Choe K. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001; 8: 14-20.
- Picot S. Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? Med. Mal. Infect. 2006; 36: 406-413.
- Playfair JH, Taverne J, Bate CA, de Souza JB. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? Immunol. Today 1990; 11: 25-27.
- Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira JrOC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. Malaria J. 2003; 2: 39.

- Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo NA, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35: 185-192.
- Rogier C, Trape JF. Malaria attacks in children exposed to high transmission: who is protected? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; 87: 245-246.
- Roshanravan B, Ari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metclafe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 69: 45-52.
- Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R. Evidence for Transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy Antigen Negative Population in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75: 575-581.
- Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.*
- Scopel KKG 2003. *Infecção assintomática por Plasmodium sp. na Amazônia brasileira: Detecção por PCR e resposta de anticorpos anti-proteína 1 de merozoíto de Plasmodium falciparum.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 123p.
- Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, PNCM, Plano Nacional de Controle da Malária, 2003.
- Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Ministério da Saúde, 2005.
- Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Serviço de Informação de Vigilância Epidemiológica, SIVEP, Ministério da Saúde, 2006.
- Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2007.
- Sierra AY, Barrero CA, Rodriguez R, Silva Y, Moncada C, Vanegas M, Patarroyo MA. Splenectomised and spleen intact *Aotus* monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. *Vaccine* 2003; 21: 4.133-4.144.
- Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G, Mazier D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem.* 2004; 279: 9.490-9.496.
- Sim BKL, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocyte by *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994; 264: 1.941-1.944.
- Singh S, Pandey K, Chattopadhyay R, Yazdani SS, Lynn A, Bharadwaj A, Ranjan A, Chitnis C. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* duffy-binding protein. *J. Biol. Chem.* 2001; 18: 17.111-17.116.
- Singh AP, Ozwara H, Kocken CH, Puri SK, Thomas AW, Chitnis CE. Targeted deletion of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during invasion. *Mol. Microbiol.* 2005; 55: 1.925-1.934.

- Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária, SIVEP, Ministério da Saúde, 2005.
- Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária, SIVEP, Ministério da Saúde, 2006.
- Smith JA 2002. Electroelution of proteins from stained gels. In JE Coligan, AM Kruisbeek, DH Margulies, EM Shevach, W Strober, *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, New York, p.8.8.1-8.8.5.
- Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM 1997. Acquired immune responses to the N-and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect. Immun.* 65: 1.606-1.614.
- Soares IS, Barnwell JW, Ferreira MU, Gomes da Cunha M, Laurino JP, Castilho BA, Rodrigues MM. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Mol. Med.* 1999a; 5: 459-470.
- Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N-and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop.* 1999b; 15: 13-24.
- Spencer HC, Miller LH, Collins WE, Knud-Hansen C, McGinnis MH, Shiroishi T, Lobos RA, Feldman RA. The Duffy blood group and resistance to *Plasmodium vivax* in Honduras. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978; 27: 664-670.
- Stevenson MM, Zavala F. Immunology of malaria infections. *Parasite Immunol.* 2006; 28: 1-4.
- Suárez-Mutis MC, Bonilla MP, Blandón ME 2000a. Diagnosis of the health situation of the Yujup-Maku, a seminomadic indigenous group of the Colombia Amazonas. Abstracts 2, XV th International Congress for Tropical Medicine and Hygiene and Malaria, Cartagena, p.192.
- Suárez-Mutis MC, Bonilla MP, Blandón ME 2000b. Prevention and control of malaria among the Yujup-Maku, of la Libertad: an ethnic group on the brink of extinction. Abstracts 2, XV th International Congress for Tropical Medicine and Hygiene and Malaria, Cartagena, p.113.
- Suh IB, Choi HK, Lee SW, Woo SK, Kang HY, Won YD, Cho M, Lim CS. Reactivity of sera from cases of *Plasmodium vivax* malaria towards three recombinant antigens based on the surface proteins of the parasite. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2003; 97: 481-487.
- Tauil PL. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39: 275-277.
- Tran TM, Oliveira-Ferreira J, Moreno A, Santos F, Yazdani SS, Chitnis CE, Altman JD, Meyer E VS, Barnwell JW, Galinski MR. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a brazilian amazon population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73: 244-255.
- Tsuboi T, Kappe SHI, Al-Yaman F, Prickett MD, Alpers M, Adam JH. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect. Immun.* 1994; 62: 5.581-5.586.
- Valderrama-Aguirre A, Quintero G, Gomez A, Castellanos A, Perez Y, Mendez F, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 PV200: a potential malaria vaccine subunit. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73: 16-24.

- VanBuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M, Sevova ES, Bockarie M, King CL, Adams JH. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J. Infect. Dis.* 2004a; 190: 1.556-1.562.
- 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* 2004b; 101: 15.754-15.759.
- WHO. *Roll Back Malaria*, Geneva, World Health Organization, 1998.
- WHO. *World Malaria Report*, Geneva, World Health Organization, 2005a.
- Wickramarachchi T, Illeperuma RJ, Perera L, Bandara S, Holm I, Longacre S, Handunnetti SM, Udagama-Randeniya PV. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37: 199-208.
- 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: 253-260.
- Xainli J, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Adams JH, King CL. Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *J. Immunol.* 2002; 169: 3.200-3.207.
- Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Yazdani SS, Chitnis CE, Adams JH, King CL. Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect. Immun.* 2003; 71: 2.508-2.515.
- Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell. Microbiol.* 2007; 9: 1.215-1.222.
- Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Kaslow DC, Xiao L, Lal AA. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infect. Immun.* 1999; 67: 342-349.
- Yazdani SS, Shakri AR, Mukherjee P, Baniwal SK, Chitnis CE. Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Vaccine* 2004; 22: 3.727-3.737.
- Zakeri S, Barjesteh H, Djadid ND. Merozoite surface protein-3alpha is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. *Malaria J.* 2006; 5: 53.
- 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: 13.973-13.977.
- Zumpano JF, Rocha MOC, Chaves KM, Silva RB, Freitas RC, Betti MH, Heneine RAD, Cerbino VDA. Estudo das recaídas no surto de malária por *Plasmodium vivax* no distrito de Sousa, município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37 (suppl. I), p.267.