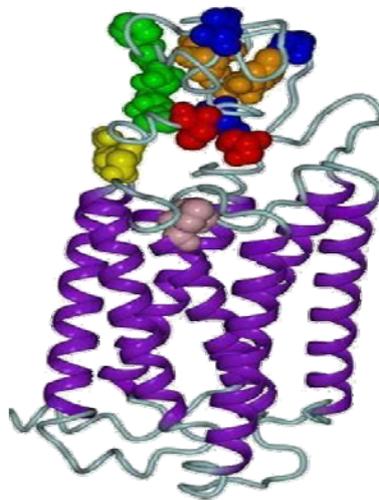


Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde

**Estudo de base populacional em um assentamento agrícola da Amazônia brasileira: Influência genética do antígeno *Duffy* receptor de quimiocinas (*DARC*) na resposta imune específica contra o *Plasmodium vivax***

por

**Letícia de Menezes Torres**



Belo Horizonte  
Fevereiro de 2013

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR      TORRES LM      2013

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

**Estudo de base populacional em um assentamento agrícola da Amazônia brasileira: Influência genética do antígeno *Duffy* receptor de quimiocinas (*DARC*) na resposta imune específica contra o *Plasmodium vivax***

por

**Letícia de Menezes Torres**

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências da Saúde na área de  
concentração Doenças Infecciosas e  
Parasitárias

Orientadora: Dra. Luzia Helena Carvalho

Co-Orientadora: Flora Satiko Kano

Belo Horizonte  
Fevereiro de 2013

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

T693e  
2013

Torres, Leticia de Menezes.

Estudo de base populacional em um assentamento agrícola da Amazônia brasileira: Influência genética do antígeno *Duffy*/receptor de quimiocinas (*DARC*) na resposta imune específica contra o *Plasmodium vivax* / Leticia de Menezes Torres. – Belo Horizonte, 2013.

xvi, 65 f.: il; 210 x 297mm.

Bibliografia: 71 - 81

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Malária vivax/imunologia 2. *Plasmodium vivax* /parasitologia 3. Eritrócitos/parasitologia 4. Sistema do grupo sanguíneo Duffy /análise I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

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

**Estudo de base populacional em um assentamento agrícola da Amazônia brasileira: Influência do polimorfismo no gene codificador do antígeno *Duffy*/receptor de quimiocinas (*DARC*) na resposta imune específica contra o *Plasmodium vivax***

por

**Letícia de Menezes Torres**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

**Prof. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)**  
**Prof. Dra. Érika Martins Braga**  
**Prof. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos**  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara (Suplente)**

**Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2013**

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René  
Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com auxílio financeiro  
do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

*Aos meus pais e irmãos pelo  
carinho e amor em todos os  
momentos.*

*Ao Gabriel pela paciência e  
carinho.*

*Aos que sofrem ou sofreram  
com a malária.*

## Agradecimentos

*A Deus pela coragem e força para vencer todos os desafios e por nunca me deixar esquecer as coisas simples que realmente importam na vida.*

*Aos meus pais que sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos e pelo exemplo e caráter e honestidade.*

*A meus irmãos pelo apoio e carinho mesmo nos momentos mais difíceis.*

*Ao Gabriel pelo amor, amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos.*

*A Dra Luzia, minha orientadora, pelo estímulo, dedicação e paciência para me ensinar ao longo desses anos de atividade científica.*

*A Dra Flora Kano, minha co-orientadora, pela paciência e apoio constantes.*

*A Flávia Alessandra, Jéssica, Lara e Michaelis pela ajuda nos experimentos.*

*A Dra Cristiana por todos os abraços cheios de carinho.*

*Ao Bruno Sanchez pelo apoio e todos os momentos de risadas juntos.*

*A Tais pelos ensinamentos tanto científicos quanto de serenidade.*

*A Alice pelo apoio todos os dias no Laboratório.*

*Ao Geraldo pela ajuda diária.*

*A todos os amigos do Laboratório de malária que tornaram meus dias repletos de sorrisos e alegria, em especial à Daniela, Flávia Alessandra e Flávia Carolina pela presença constante em minha vida.*

*Ao Dr. Cor pelo exemplo, ajuda e dedicação.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro.*

*A Plataforma de PCR em tempo real pelo apoio.*

*À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.*

*A todos que compõe o Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR).*

***“Só conheço uma liberdade  
e essa liberdade é a do pensamento”***

***“Foi o tempo que você investiu em sua rosa  
que fez dela tão importante”***

*Antoine de Saint-Exupéry*

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Ciclo biológico dos parasitos da malária humana .....	19
1.2 Invasão dos eritrócitos humanos pelos plasmódios .....	21
1.3 Duffy binding protein do <i>Plasmodium vivax</i> (PvDBP).....	23
1.4 Resposta imune a Duffy Binding Protein (PvDBP) do <i>P. vivax</i> .....	24
1.5 Caracterização do antígeno Duffy/receptor para quimiocinas ( <i>DARC</i> ) 26	
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS .....	32
3.1 Objetivo Geral .....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Áreas de estudo.....	33
4.2 Voluntários e coleta de sangue .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1 Obtenção de plasma e DNA .....	37
4.3 Diagnóstico de malária.....	37
4.3.1 Gota espessa.....	37
4.3.2 Extração de DNA.....	37
4.4 Determinação do grupo sanguíneo <i>DARC</i> .....	42
4.4.1 Genotipagem do antígeno de grupo sanguíneo <i>DARC</i> pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real .....	42
4.4.2 Genotipagem do Receptor <i>DARC</i> pela Reação em Cadeia da Polimerase Alelo-Específica (PCR-ASP) .....	43
4.5 Sequenciamento do Receptor <i>DARC</i> .....	44
4.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase para Amplificação do <i>DARC</i> ..	44
4.5.2 Reação de sequenciamento .....	45
4.5.3 Análise das seqüências .....	46
4.6 Proteínas recombinantes .....	46
4.7 Ensaio de ELISA .....	46
4.8 Transfecção de células COS-7 e ensaios de citoaderência .....	47
4.9 Análise estatística .....	49
5 RESULTADOS .....	51
	IX

---

5.1	Resposta de anticorpos anti- <i>P. vivax</i> na população de Rio Pardo/AM	51
5.2	Distribuição de frequência dos genótipos <i>DARC</i> na população estudada .....	52
5.3	Influência dos genótipos de <i>DARC</i> na susceptibilidade a infecção malária e na resposta imune.....	54
5.4	Estudo Prospectivo .....	57
5.4.1	Avaliação prospectiva da influência do <i>DARC</i> na infecção malária e na resposta imune.....	57
6	DISCUSSÃO .....	64
7	CONCLUSÕES .....	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
9	ANEXO.....	80

**LISTA DE FIGURAS**

**FIGURA 1.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO NO HOSPEDEIRO HUMANO E NO VETOR *ANOPHELES*. FONTE: MODIFICADO DE MUELLER ET AL., 2009 ..... 21

**FIGURA 2.** A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA DUFFY BIND PROTEIN (DBP). B) ESTRUTURA 3D DA REGIÃO II DA PVDBP COM SEUS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS EM AMOSTRAS NO BRASIL.. 24

**FIGURA 3.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO *DARC*..... 27

**FIGURA 4.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE *FY* QUE CODIFICA *DARC*, INCLUINDO A REGIÃO PROMOTORA, DOIS EXONS E O ÍNTRON ENTRE OS ÉXONS 1 E 2..... 28

**FIGURA 5.** VARIAÇÃO PLUVIOMÉTRICA NA REGIÃO ..... 34

**FIGURA 6.** A) MAPA DO ESTADO DO AMAZONAS, INDICANDO A LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE FIGUEIREDO E A CAPITAL DO ESTADO, MANAUS. B) MAPA DEMONSTRANDO O PLANO DE ASSENTAMENTO AGRÍCOLA DE RIO PARDO.. ..... 35

**FIGURA 7.** CURVAS DE DISSOCIAÇÃO OBTIDAS POR PCR EM TEMPO REAL, COM PRIMERS DESENHADOS PARA UMA REGIÃO GÊNERO-ESPECÍFICA NA SUBUNIDADE MENOR DO RNA RIBOSSOMAL, GENE *18S*..... 40

**FIGURA 8.** ENSAIO DE CITOADERÊNCIA ILUSTRANDO AS CÉLULAS COS-7 EXPRESSANDO A PVDBP II. (A) A FIGURA MOSTRA A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS ADERIDOS ÀS CÉLULAS COS-7 TRANSFECTADAS (ROSETAS) ATRAVÉS DA LIGAÇÃO DUFFY/*DARC*. (B) A FIGURA ILUSTRA A AUSÊNCIA DE LIGAÇÃO ENTRE ERITRÓCITOS E AS CÉLULAS COS-7 TRANSFECTADAS EM FUNÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS INIBITÓRIOS NO SORO. VISUALIZAÇÃO EM AUMENTO DE 200x ... 49

**FIGURA 9.** RESPOSTA DE ANTICORPOS CONTRA A PVDBP NO ELISA EM FUNÇÃO DOS GENÓTIPOS E NÚMERO DE ALELOS FUNCIONAIS DE *DARC*..... 55

**FIGURA 10.** FREQUÊNCIA DE RESPOSTA DE ANTICORPOS A PVDBP(A), MSP1<sub>19</sub>(B) EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DE *DARC*. ..... 56

**FIGURA 11.** RESPOSTA DE ANTICORPOS INIBITÓRIOS CONTRA A PVDBP EM FUNÇÃO DOS GENÓTIPOS E NÚMERO DE ALELOS FUNCIONAIS DE *DARC*. ..... 57

**FIGURA 12.** RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO NA REGIÃO DE RIO PARDO (AM)..... 58

**FIGURA 13.** RESPOSTA DE ANTICORPOS ANTI-PVDBP (ELISA) AO LONGO DO ESTUDO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA NA REGIÃO ESTUDADA. .... 60

**FIGURA 14.** RESPOSTA DE ANTICORPOS CONTRA A PVDBP, DETECTADOS PELO ELISA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ALELOS FUNCIONAIS DE *DARC*. ESTÃO REPRESENTADAS AS FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-PVDBP DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NO ESTUDO AO LONGO DA COORTE (ZERO, 6 E 12 MESES). ..... 61

**FIGURA 15.** RESPOSTA DE ANTICORPOS INIBITÓRIOS CONTRA A PVDBP EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ALELOS FUNCIONAIS DE *DARC*. ..... 62

**FIGURA 16.** REPRESENTAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS INIBITÓRIOS ANTI-PVDBP AO LONGO DO ESTUDO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA NA REGIÃO ESTUDADA. .... 63

**LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1.** SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL..... 40

**TABELA 2.** SEQUÊNCIAS DE INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS PARA O GENE *18S* SSURNA DOS PARASITAS DA MALÁRIA NA NESTED-PCR..... 42

**TABELA 3.** SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE GENOTIPAGEM DE *DARC* POR PCR EM TEMPO REAL ..... 43

**TABELA 4.** RELAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADOS NA GENOTIPAGEM DO RECEPTOR *DARC* POR PCR ALELO-ESPECÍFICA (PCR-ASP) ..... 44

**TABELA 5.** DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DE RESPOSTA DE ANTICORPOS DOS 690 INDIVÍDUOS ENVOLVIDOS NO ESTUDO (NOVEMBRO 2008 – NOVEMBRO 2009)..... 51

**TABELA 6.** DISTRIBUIÇÃO DO GENÓTIPO DE *DARC* PELA IDADE, GÊNERO E ANOS NA ÁREA. .... 53

**TABELA 7.** GENOTIPAGEM DE *DARC* DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *P. VIVAX* (*PV*) E INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS OU INFECTADOS POR *P. FALCIPARUM* (*PF*)..... 54

**TABELA 8.** INCIDÊNCIA ANUAL DE INFECÇÃO PELO *P. VIVAX* EM FUNÇÃO DOS GENÓTIPOS DE *DARC* DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS, RIO PARDO/AM. JUNHO DE 2008-NOVEMBRO DE 2009..... 59

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BIAbs** – Anticorpos inibitórios (*Binding inhibitory antibodies*)

**CPqRR** - Centro de Pesquisa René Rachou

**DARC** – Antígeno de grupo sanguíneo Duffy/receptor para quimiocinas (Duffy antigen/receptor for chemokines)

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

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

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

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

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

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

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

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

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

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

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

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

**FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz

**FY** – Locus do antígeno

**FY\*A, FY\*B** – Alelos *DARC* que codificam os antígenos Fya e Fyb, respectivamente.

**FY\*A<sup>ES</sup>, FY\*B<sup>ES</sup>** – Alelos *DARC* silenciados na linhagem eritróide

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

**GST** - glutationa S-transferase de *Schistosoma japonicum*

**IgG** - Imunoglobulina da classe G

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

**nm** - Nanômetro

**OD** - *Optical density*; densidade ótica

**OPD** - Cromógeno ortofenilenodiamino diidrocloreto (o-phelylenediamine dihydrochloride)

**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

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

**pEGFP** - Plasmídeo que codifica a proteína de fluorescência verde potencializada

**PNCM** – Programa Nacional de Controle da Malária

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

**PvRBP** - Proteína de ligação do *P. vivax* a reticulócitos (*P. vivax Reticulocyte Binding Protein*)

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

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SD1, SD2 e SD3** – Subdomínios 1, 2 e 3 da PvDBP

**SBF** - Soro Bovino Fetal (*Fetal bovine serum*)

**Tween 20** - Polioxietileno-sorbitano-monolaurato (*Polyoxyethylenesorbitan monolaurate*)

**X<sup>2</sup>** - teste estatístico qui-quadrado

**RESUMO**

A *Duffy binding protein* do *Plasmodium vivax* (PvDBP) e seu receptor na superfície dos eritrócitos, o antígeno *Duffy*/receptor para quimiocinas (*DARC*), estão envolvidos na principal via de invasão utilizada pelo *P. vivax*. No presente trabalho, realizou-se por um estudo do tipo coorte aberta, em área de assentamento agrícola da Amazônia brasileira, para avaliar a influência do receptor *DARC* na infecção e resposta imune ao *P. vivax*. Para isso, foi realizada a genotipagem do antígeno *DARC* através da técnica de PCR em tempo real. A pesquisa de anticorpos específicos foi realizada pela sorologia convencional (ELISA) e, por um ensaio funcional que avalia anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor. Entre os 690 indivíduos estudados, o genótipo *FY\*A/FY\*B* foi o mais frequente, consistente com a heterogeneidade étnica das populações que vivem na Amazônia brasileira. Na área estudada, não foi possível identificar associação entre a expressão *DARC* e a susceptibilidade a infecção pelo *P. vivax*. Em relação à resposta de anticorpos, nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos de *DARC* e anticorpos IgG anti-PvDBP e anti-MSP1<sub>19</sub> (outra proteína do *P. vivax*), ambos detectados pela sorologia convencional (ELISA). Contudo, a resposta de anticorpos inibitórios foi significativamente mais frequente em indivíduos heterozigotos carreadores de um alelo *DARC*-negativo (genótipos *FY\*A/FY\*B<sup>ES</sup>* e *FY\*B/FY\*B<sup>ES</sup>*). Por último, a resposta de anticorpos inibitórios se manteve estável durante todo o período estudado (12 meses). Em conjunto, estes resultados demonstraram, pela primeira vez, que a expressão do receptor *DARC* pode influenciar na resposta imune inibitória contra a PvDBP .

**ABSTRACT**

The *P. vivax* Duffy binding protein (PvDBP) and its erythrocytic receptor, the Duffy antigen receptor for chemokines (*DARC*), are involved in the major *P. vivax* erythrocyte invasion pathway. Here, in an agricultural settlement of the Brazilian Amazon area, we carried-out an open cohort study to analyzed *DARC* genotypes and its relationship to vivax susceptibility and the PvDBP immune response. To answer this question, *DARC* genotypes were determined by real-time PCR. Antibodies responses were analyzed by conventional serology (ELISA) using recombinant proteins, and by an in vitro functional assay that detect binding inhibitory antibodies (BIAbs) targeting PvDBP. Among 690 individuals enrolled in the study, the distribution of *DARC* genotypes was consistent with the heterogeneous ethnic origin of the Amazon population, with a predominance of genotype *FY\*A/FY\*B*. In the study area, *DARC* genotypes were not associated with *P. vivax* susceptibility. Also, there was no association between *DARC* and anti-PvDBP IgG, as detected by ELISA. However, the follow-up study demonstrated that BIAbs towards to be more frequent in heterozygous carrying a *DARC*-silent allele (genotypes *FY\*A/FY\*B<sup>ES</sup>* and *FY\*B/FY\*B<sup>ES</sup>*). In addition, antibodies to PvMSP1<sub>19</sub>, another *P. vivax* protein, were not associated with *DARC* expression. Moreover, the BIAbs response remained constant during the 12 months of the follow up. Together, these results provide the first evidence that *DARC* expression may influence the anti-PvDBP inhibitory immune response.

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente quatro espécies são responsáveis pelo parasitismo humano: o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium malariae* e o *Plasmodium ovale*. Recentemente, foi demonstrado que uma quinta espécie, o *Plasmodium knowlesi*, que infecta naturalmente primatas não humanos, têm causado infecções graves em humanos, principalmente no sudeste asiático e no continente africano (Cox-Singh et al., 2008; Ong et al., 2009; White, 2008). A malária humana, endêmica em regiões tropicais e subtropicais, é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo. Afeta cerca de 216 milhões de indivíduos a cada ano, onde 81% desses casos se concentram no continente africano e os demais estão distribuídos na América Central e do Sul, sudeste asiático e ilhas da Oceania. A doença na África é causada principalmente pela espécie *P. falciparum*, que é a espécie mais patogênica e responsável pela maioria dos casos de morte e morbidade (Hay et al., 2010; Snow et al., 2005). Atualmente, a doença vem se propagando a outras regiões devido ao processo não planejado de urbanização. Além disso, devido à migração populacional intensa, acredita-se que, principalmente na África subsaariana, esse processo tem alterado profundamente a epidemiologia da doença (Tatem & Smith, 2010; Wesolowski et al., 2012)

Das espécies causadoras da malária humana, o *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo e principal causadora da malária em regiões fora do continente africano (Guerra, Snow, & Hay, 2006). Além disso, estima-se que 2,49 bilhões de pessoas vivem sob-risco de infecção por este parasito (Battle et al., 2012). Apesar do *P. vivax* ser responsável por uma doença altamente debilitante que afeta a qualidade de vida e a produtividade das pessoas infectadas (Greenwood, Bojang, Whitty, & Targett, 2005), esta espécie está relacionada a uma doença benigna e raramente fatal, estudos tem relatado a existência de casos de malária grave causada pelo *P. vivax* (Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008). Contudo, apesar da necessidade de maiores esforços a fim de controlar a expansão da doença, apenas 3,1% do

investimento da pesquisa em malária no mundo foi destinado à malária vivax entre os anos de 2007 e 2009 (PATH, 2011).

No Brasil, foram registrados aproximadamente 267.000 casos de malária em 2011 (WHO, 2012), com 99,9% desses casos na região da Amazônia legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, onde o *P. vivax* foi responsável por aproximadamente 85% dos casos (SVS, 2012). Na Amazônia legal, as condições socioeconômicas e sociais contribuem para a transmissão da malária. Além disso, a ocupação intensa e desordenada das áreas periurbanas, o desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos não oficiais contribuem o agravamento e manutenção da transmissão de malária nessa região (Marques et al., 1986; SVS, 2007; SVS, 2008). Outro fator colaborador foi o investimento governamental na piscicultura através da construção de tanques artificiais o que favoreceu a criação de novos criadouros do mosquito vetor (SVS, 2007).

O controle da malária no Brasil tem sido realizado através do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), no qual os objetivos são: i) a redução da incidência e mortalidade, ii) a eliminação da transmissão em áreas urbanas e, iii) manutenção da ausência da transmissão da doença nos locais onde ela foi interrompida. Para isso, as principais ações são a busca pelo diagnóstico precoce, o tratamento adequado para cada espécie causadora, o fortalecimento da vigilância em malária e capacitação dos profissionais (SVS, 2007). Essas ações têm contribuído para a diminuição do número de casos de malária nos últimos anos (SVS, 2008).

Embora várias ações tenham sido aplicadas a fim de controlar essa doença no mundo, os investimentos são direcionados principalmente a espécie *P. falciparum*. Entretanto, a malária causada pelo *P. vivax* é epidemiologicamente e biologicamente diferente do *P. falciparum*, desta forma, não é possível assumir que as medidas de controle destinadas ao *P. falciparum* possam ser eficazes e aplicadas ao controle do *P. vivax* (Battle et al., 2012). Assim, além da continuidade dos programas de controle já vigentes, fazem-se necessários maiores investimentos no controle malária causada

especificamente pelo *P. vivax*, com a melhoria das técnicas aplicadas na sua detecção e diagnóstico no mundo.

### 1.1 Ciclo biológico dos parasitos da malária humana

O ciclo biológico destes parasitos é complexo, e tem sido alvo de muitos estudos. Os plasmódios possuem um ciclo heteróxico, ou seja, necessitam necessariamente de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. A fase de reprodução sexuada ou esporogônica ocorre no hospedeiro invertebrado, enquanto a fase assexuada ou esquizogônica ocorre no hospedeiro vertebrado (Figura 1).

As formas infectantes do parasito, conhecidos como esporozoítos, penetram na pele através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Estima-se que cerca de 15 a 200 esporozoítos são depositados sob a pele dos hospedeiro, podendo permanecer na derme por um longo período após a picada do vetor (Amino et al., 2006; Yamauchi et al., 2007). Recentemente, foi descrito uma nova rota de migração dos esporozoítos em que esses, após atravessarem o epitélio do hospedeiro vertebrado, podem alcançar o sistema linfático. Porém, estes parasitos parecem não alcançar o fígado por esta via. Entretanto, esta rota pode ser importante para estimular o sistema imunológico do hospedeiro (Amino et al., 2006). Aqueles que escapam do sistema imunológico atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado, irão penetrar nos hepatócitos.

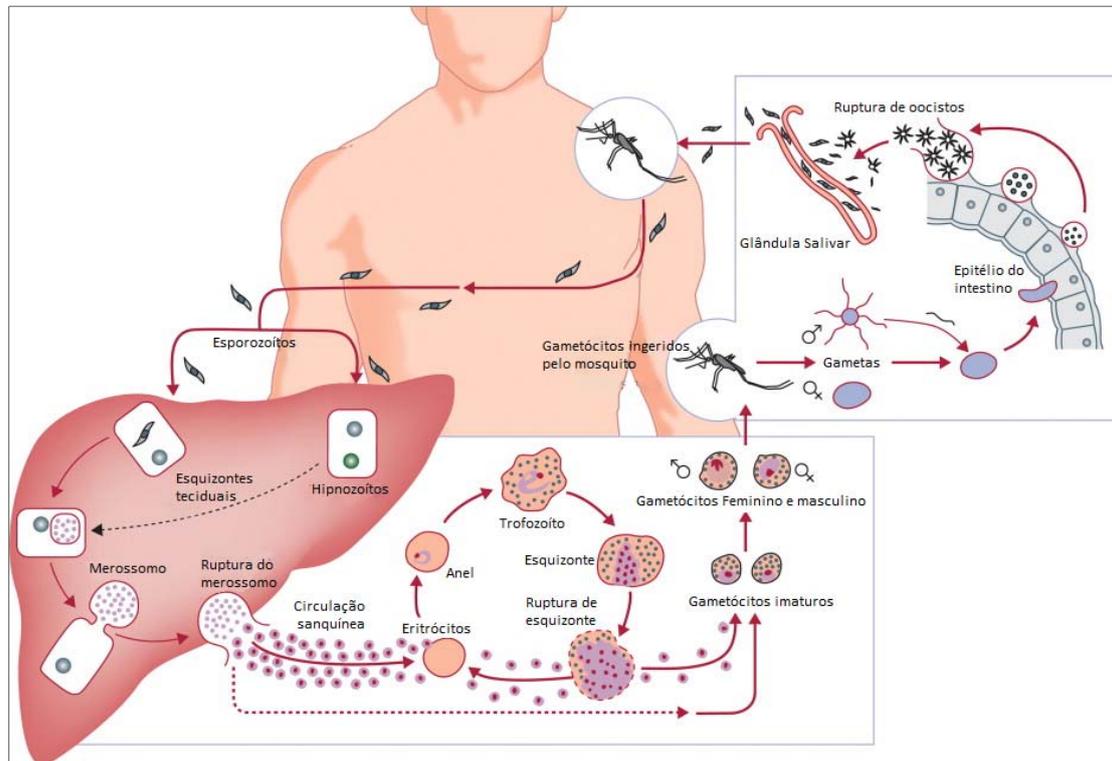
A invasão dos hepatócito pelo esporozoíto é complexa e envolve várias interações do tipo ligante-receptor. De importância, o parasito possui a capacidade de interagir com as células do fígado e migrar entre os hepatócitos, até por fim se instalar e desenvolver em uma das células ( Mota et al., 2001). Na malária de mamíferos, não está claro o mecanismo pelo qual os esporozoítos passam dos capilares sinusóides do fígado até os hepatócitos: pode ser através das células de Kupffer ou através das células do endotélio dos vasos sanguíneos (Pradel & Frevert 2001, Mota et al. 2002). Acredita-se que esta migração é importante para estimular a exocitose de organelas apicais do parasito e torná-los aptos a infectar os hepatócitos e se desenvolver

dentro do vacúolo parasitóforo (Amino et al., 2006; Mota & Rodriguez, 2004). Ainda no fígado, o *P. vivax* e o *P. ovale* podem se desenvolver em formas dormentes, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas que ocorrem meses ou anos após a infecção inicial (Krotoski, 1985, Barnwell et al., 1998).

Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam e multiplicam assexuadamente dando origem aos merozoítos, que são liberados diretamente na corrente sanguínea através de vesículas denominadas merossomas, estas repletas de parasitas, liberam os merozoítos (Sturm et al., 2006). Na circulação sanguínea, os merozoítos penetram nos eritrócitos através de interações específicas entre proteínas presentes na superfície dos parasitos e receptores presentes na superfície destas células, dando início à fase eritrocítica do ciclo, que é responsável pela sintomatologia clínica da doença. Nos eritrócitos os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e por fim esquizontes. Estes esquizontes, dependendo da espécie, geram de 10 a 30 merozoítos que penetram outros eritrócitos, reiniciando o ciclo eritrocítico. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns deles se diferenciam nas formas sexuais do parasito, os macrogametócitos (feminino) e os microgametócitos (masculinos) os quais amadurecem sem sofrer divisão celular. Estas formas sexuais ao serem ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dão início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado.

No interior do estômago do mosquito, os gametócitos irão se diferenciar em gametas masculinos e femininos, os quais sofrem influência das condições do ambiente e de fatores internos do mosquito e após fecundar, irão dar origem ao zigoto (revisto por Vlachou, 2006). Aproximadamente, um dia após a fecundação, o zigoto se desloca em movimentos amebóides, passando a se denominar oocineto e, por um mecanismo trans-celular, atinge a camada de células epiteliais do intestino médio onde se aloja entre o epitélio e a membrana basal e passa então a se chamar oocisto (Vlachou et al., 2004; Zieler & Dvorak, 2000; Baton & Ranford-Cartwright 2004). Em cada oocisto é ativada a maquinaria de replicação de DNA e de síntese de proteínas para a multiplicação assexuada dos parasitos, o que gera a produção de milhares de

esporozoítos. Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto se rompe liberando os esporozoítos, que por sua vez invadem a hemolinfa do inseto. Ao caírem na hemolinfa, muitos esporozoítos conseguem invadir as glândulas salivares, podendo, num novo repasto sanguíneo, serem inoculados no hospedeiro vertebrado.



**Figura 1.** Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Fonte: Modificado de Mueller et al., 2009

## 1.2 Invasão dos eritrócitos humanos pelos plasmódios

A invasão dos eritrócitos pelos parasitos é a parte do ciclo que garante o sucesso da infecção humana e é nesta etapa que ocorrem os sintomas clínicos da doença. Esta invasão é complexa e envolve várias etapas (Oh & Chishti, 2005; Cowman & Crabb, 2006): 1) após encontrar um eritrócito, o merozoíto reconhece o eritrócito e ocorre, primeiramente, uma ligação de baixa afinidade e reversível entre o parasito e a célula hospedeira; 2) Após o reconhecimento, o parasito se reorienta para posicionar sua porção apical em contato com a membrana eritrocítica e, assim, ocorre uma junção irreversível; 3) Depois de formada a junção, a mesma é deslocada em direção ao pólo posterior do

parasito e ao mesmo tempo são liberadas proteínas de adesão situadas em suas organelas apicais (as roptrias e os micronemas); 4) Por fim, o parasito alcança o interior da célula através da formação do vacúolo parasitóforo, onde o merozoíto irá se desenvolver.

O processo de invasão pelos dois plasmódios de maior interesse para a saúde pública, o *P. falciparum* e o *P. vivax*, tem sido muito estudado. No caso do *P. falciparum*, já se sabe que este utiliza vários ligantes e vários receptores no eritrócito para sua invasão (revisado por Person, 2010). Esta espécie do parasito possui uma característica importante que é a habilidade de utilizar vias alternativas para alterar seu processo de invasão. Já se conhece pelo menos 5 vias de invasão utilizadas pelo *P. falciparum* as quais são classificadas de acordo com a natureza do receptor no eritrócito (Gaur et al., 2004). Entretanto, recentemente foi descrito um par ligante-receptor essencial para a invasão em todas as cepas de *P. falciparum* testadas. Nesta via, o antígeno de grupo sanguíneo Ok, também conhecido como Basigina, é o receptor para PfRh5, um ligante do parasito essencial ao crescimento das formas sanguíneas (Crosnier et al., 2011). Entretanto, no caso do *P. vivax* uma única via parece ser a mais importante (Adams et al., 1992).

O *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos (eritrócitos jovens), que compreendem aproximadamente 1% da população de eritrócitos circulantes. A partir disso, tem sido proposto que exista uma pré-seleção da célula que será invadida e esta seleção parece ser mediada por um grupo de proteínas de ligação aos reticulócitos, as PvRBPs (*reticulocytes binding protein*) (Galinski, Medina, Ingravallo, & Barnwell, 1992; Barnwell & Galinski, 1998). De importância, o parasito parece utilizar uma via principal para invadir os reticulócitos. Essa invasão ocorre com a interação entre a *Duffy Binding Protein* (DBP), presente no parasito, e seu receptor nos eritrócitos, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor de quimiocinas (*DARC*) (Wertherimer & Barnwell, 1989). Depois de estabelecida a ligação entre a PvDBP e o *DARC* o processo de invasão se torna irreversível (Barnwell & Wertherimer, 1989). Portanto, indivíduos que não apresentam o receptor *DARC* na superfície de seus eritrócitos são altamente resistentes à infecção pelo *P. vivax* (Miller et al., 1976). Entretanto, estudos recentes vêm

demonstrando que indivíduos que não apresentam o receptor *DARC* na superfície de seus eritrócitos podem ser parasitados pelo *P. vivax*, o que mostra que este parasito pode estar utilizando uma via alternativa para invasão dos eritrócitos destes indivíduos (Cavasini et al., 2007; Ménard et al., 2010; Ryan et al., 2006).

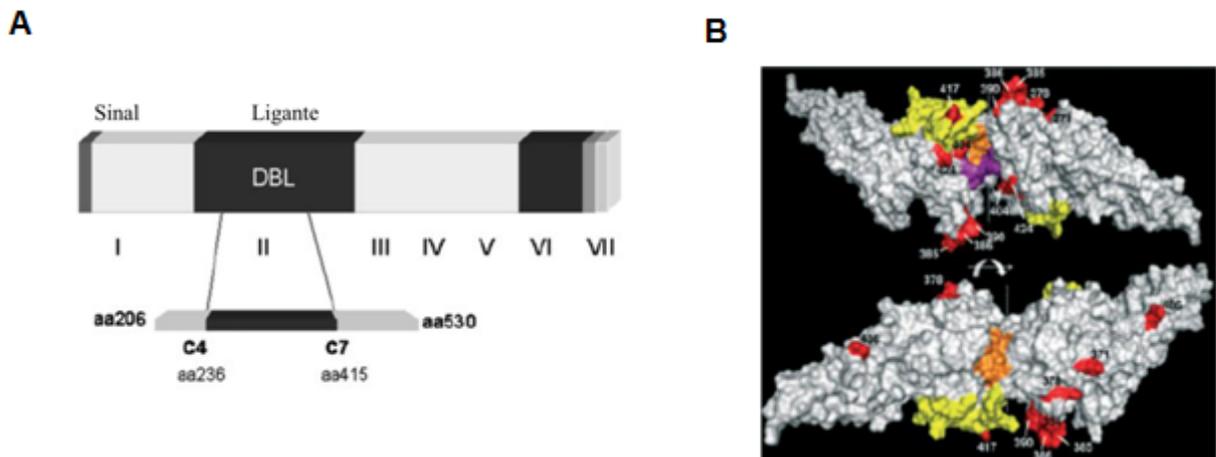
### 1.3 Duffy binding protein do *Plasmodium vivax* (PvDBP)

A PvDBP é uma proteína de invasão de 140 kDa pertencente a uma família de proteínas homólogas que se ligam aos eritrócitos conhecida como EBP (erythrocyte binding protein). Nesta família estão incluídas outras proteínas como, por exemplo, a EBP  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de *Plasmodium knowlesi*, um parasito de primatas não humanos do velho mundo, que também invade eritrócitos humanos que expressam *DARC*. As proteínas dessa família possuem em comum a presença de um domínio rico em resíduos de cisteína na região amino-terminal e funcionalmente importante, conhecido como domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/*DARC* (Duffy binding like domain, DBL) (Adams et al., 1992).

A PvDBP está localizada nos micronemas e, apenas no momento da invasão, é liberada na superfície do merozoíto, onde entra em contato com receptor de quimiocinas *DARC* na superfície dos eritrócitos humanos (Wertheimer & Barnwell, 1989). Uma vez estabelecida a junção PvDBP-*DARC* o processo de invasão passa a ser irreversível (Barnwell & Wertheimer, 1989).

Esquemáticamente, a PvDBP pode ser dividida em sete regiões, definidas a partir da similaridade da sua estrutura gênica e seqüência de aminoácidos com as outras DBL-EBPs (Figura 2): uma região que contém o peptídeo sinal (região I), duas regiões ricas em cisteínas amino e carboxiterminal (região II e VI, respectivamente), três regiões hidrofílicas (região III, IV e V), um domínio transmembrana e um curto segmento citoplasmático (região VII) (Adams et al., 1992; Fang et al., 1991). O ligante funcional da PvDBP encontra-se na região II (PvDBP<sub>II</sub>), que corresponde ao domínio DBL, que compreende 330 aminoácidos contendo 12 resíduos de cisteína e onde foi mapeado o sítio de ligação da proteína ao seu receptor nos eritrócitos do hospedeiro (Adams et al.,

1992; Ranjan & Chitnis, 1999). O sítio de ligação está localizado em um segmento de aproximadamente 170 aminoácidos entre as cisteínas 4 e 7 (Chitnis & Miller, 1994; Ranjan & Chitnis, 1999).



**Figura 2. A)** Representação esquemática dos domínios estruturais da proteína Duffy Bind Protein (DBP). A proteína possui as seis primeiras regiões de domínios extracelulares e a última região (VII) possui um domínio citoplasmático e transmembrana. No domínio II encontra-se a região referente ao ligante, localizada entre as cisteínas 4 e 7 (adaptado de VanBuskirk et al., 2004). **B)** Estrutura 3D da região II da PvDBP com seus polimorfismos encontrados em amostras no Brasil: (i) resíduos que formam um suposto bolso de sulfatirosina para a ligação na interface do dímero (Lys273, Arg274 and Gln356 – roxo); (ii) resíduos necessários para a interação com o antígeno *DARC* (Asn291, Asn292, Tyr293, Arg294, Tyr295, Asn296, Lys297, Asp298, Phe299 and Val365, Lys366, Lys367, Arg368, Leu369, Lys370, Gly371, Asn372, Phe373, Ile374, Trp375, Ile376, Cys377 – amarelo); (iii) resíduos que fazem contato formando uma estrutura dimérica (Phe267, Leu270, Il277, Tyr278, Val282, Tyr363 and Arg274, Glu249 – laranja); (iv) resíduos polimórficos identificados em isolados de Ri Pardo (em vermelho). As setas indicam a interface do dímero (Kano et al., 2012).

#### 1.4 Resposta imune a Duffy Binding Protein (PvDBP) do *P. vivax*

A PvDBP é expressa nos estágios eritrocíticos e se localiza em uma organela apical (micronema), sendo exposta na superfície do eritrócito somente no momento da invasão (Adams et al., 1990; VanBuskirk et al., 2004a). Após ser expressa na superfície do parasito, a região do ligante da PvDBP entra rapidamente em contato com o antígeno *DARC*. Porém, apesar desta região do ligante da proteína entrar em contato com os eritrócitos do hospedeiro, estudos avaliando a estrutura da proteína têm sugerido que a resposta de anticorpos naturalmente adquiridos são direcionados predominantemente para as regiões

opostas ao sítio de reconhecimento proposto (revisto por Chitnis & Sharma, 2008) Na última década, os estudos de resposta imune anti-PvDBP foram realizados, principalmente, em regiões de alta endemicidade da Papua Nova Guiné e os resultados demonstraram a existência de anticorpos anti-PvDBP em indivíduos residentes nestas áreas (Fraser et al., 1997; Michon et al., 2000; King et al., 2008). No Brasil, considerado uma área de baixa a média endemicidade, foi demonstrado pelo nosso grupo que anticorpos anti-PvDBP estão presentes em indivíduos residentes na Amazônia brasileira e que parte destes anticorpos são capazes de bloquear a interação do ligante com o receptor na superfície dos eritrócitos (Cerávolo et al, 2005; Cerávolo et al, 2009). Porém, os dados encontrados na Amazônia e em outras regiões de diferentes endemicidades demonstraram que uma parte significativa da população exposta não desenvolve anticorpos anti-PvDBP (Fraser et al., 1997; Michon et al., 1998; Ceravolo et al., 2005; Souza-Silva et al., 2010). As razões para esta falta de resposta à PvDBP não são conhecidas, entretanto o fato da proteína se localizar nos micronemas pode ter contribuído para a pouca exposição da mesma ao sistema imune. Outro fator que pode contribuir para a baixa resposta é a variabilidade genética da PvDBP, pois os polimorfismos da região II parecem influenciar na resposta imune do hospedeiro (McHenry & Adams, 2006; Sousa et al., 2010). Recentemente, estudos tem sido realizados a fim de identificar os epitopos de células T e B que sejam reconhecidos por anticorpos bloqueadores (Saravia et al., 2008; Chootong et al., 2010, Martinez et al., 2010).

Os estudos realizados por VanBuskirk e colaboradores (2004a) com diferentes variantes da PvDBP sugeriram que a resposta imune podia ser cepa específica. Entretanto, estes estudos foram realizados apenas *in vitro* com soros de coelhos imunes. É necessário entender melhor este processo de especificidade da resposta imune do hospedeiro às diversas variantes do parasito, pois isto pode contribuir nos estudos que visam a construção de uma vacina contra o *P. vivax*.

Diferentes abordagens têm sido usadas para identificar epítomos conservados da DBP que possam induzir uma imunidade que não seja cepa específica (Ntumngia et al., 2012). Assim, um estudo recente demonstrou que

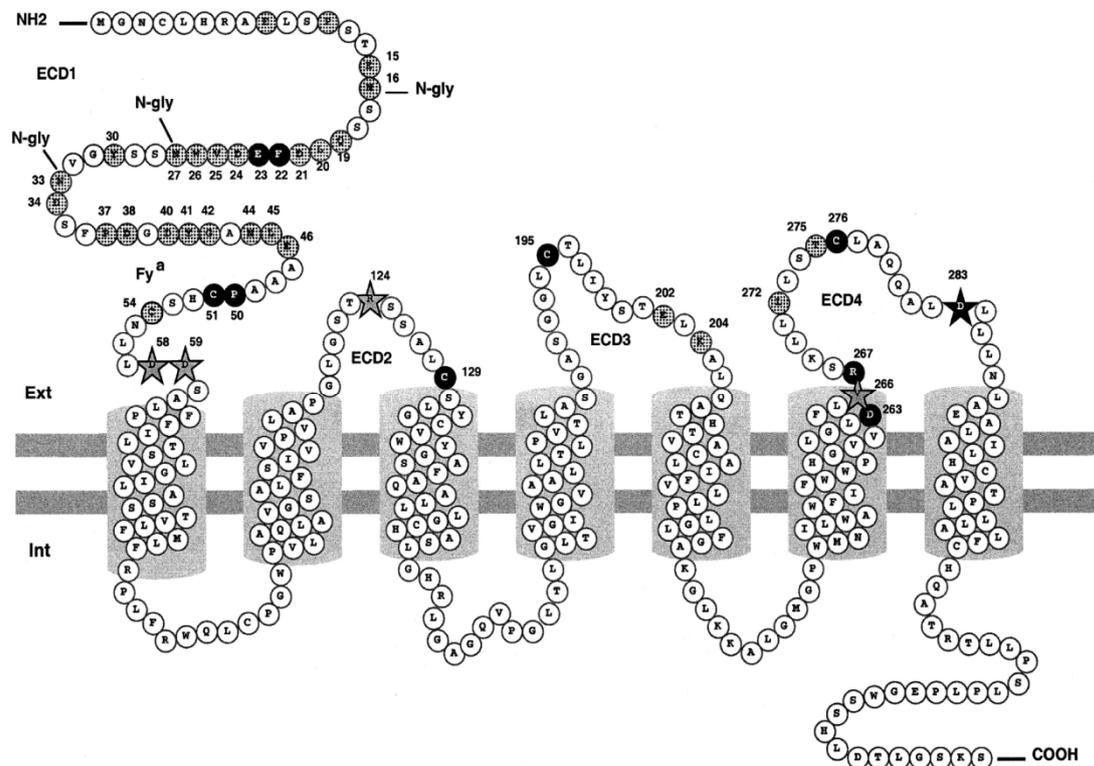
na região II da PvDBP - dividida em três subdomínios, SD1, SD2 e SD3 - existe um subdomínio, (o SD3) que induziu uma resposta imune que parece não depender da cepa do parasito (Siddiqui et al., 2012).

### **1.5 Caracterização do antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC)**

O receptor *DARC* que interage com a *Duffy binding protein* do *P. vivax* nos eritrócitos humanos, é também um receptor para vários membros de quimiocinas das classes CC CXCs e, foi descrito pela primeira vez por Moore *et al.* (1982). Essa glicoproteína de 40-45 KDa não é restrita a células da linhagem eritrocítica, podendo ser encontrada também em células endoteliais de vênulas pós-capilares de vários tecidos.

O receptor *DARC* possui grande importância clínica, pois anticorpos que reconhecem o antígeno de grupo sanguíneo Duffy são responsáveis por muitos casos de incompatibilidade transfusional e doença hemolítica em recém-nascidos. Recentemente, o receptor *DARC* tem sido associado com várias doenças inflamatórias, doenças infecciosas e tumorais, e com a infecção pelo vírus HIV (revisado por Smolarek et al., 2010). De grande importância, um estudo recente demonstrou que o *DARC* é importante na infecção pelo *P.falciparum* (McMorran et al., 2012). Mais especificamente, estes autores mostram que a interação do *DARC* com uma proteína plaquetária (Pf4 ou CXCL4) é fundamental para que as plaquetas atuem destruindo o parasito.

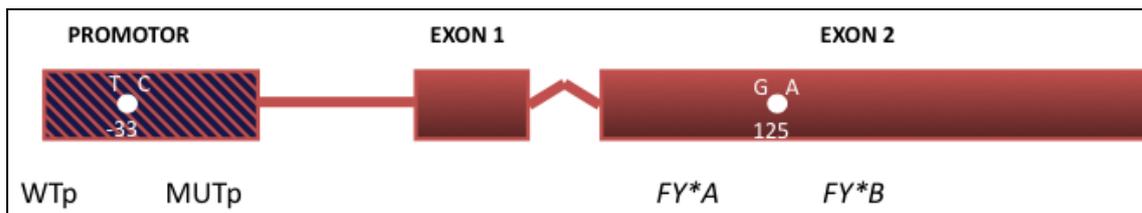
O receptor *DARC* é constituído por uma região extracelular amino-terminal (extracelular amino-terminal domain 1, ECD1) de aproximadamente 60 aminoácidos; uma região central (~250 resíduos) constituída por sete domínios transmembrana, três alças extracelulares (ECD2 a ECD4) e três alças intracelulares; e uma região citoplasmática de 28 resíduos (Figura 3) (Hadley & Peiper, 1997). A região de *DARC* que interage com a DBP é constituída por 35 aminoácidos (Ala8-Asp42) e está localizada na região ECD1 (Chitnis et al., 1996; Tournamille et al., 2005). O sítio de ligação para quimiocinas é formado pela associação dos quatro domínios extracelulares de *DARC* (ECD1-4) (Tournamille et al., 1997; 2003).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura do *DARC*. A figura ilustra os domínios do receptor *DARC* que é constituído por uma região extracelular amino-terminal (extracelular amino-terminal domain 1, ECD1), uma região central (~250 resíduos) constituída por sete domínios transmembrana, três alças extracelulares (ECD2 a ECD4) e três alças intracelulares; e uma região citoplasmática de 28 resíduos. Figura modificada de Tournamille e colaboradores (2003).

O gene que codifica o antígeno *DARC* está no *locus* *FY* do cromossomo 1 (Figura 4), sendo caracterizado por três alelos principais: *FY*<sup>\*A</sup>, *FY*<sup>\*B</sup> e *FY*<sup>\*B</sup><sup>ES</sup> (*ES*, silenciado na linhagem eritrocítica) (Hadley & Peiper, 1997). Os dois alelos funcionais co-dominantes, *FY*<sup>\*A</sup> e *FY*<sup>\*B</sup>, codificam os antígenos *Fy*<sup>a</sup> e *Fy*<sup>b</sup>, respectivamente. Esses alelos se diferem apenas em uma mutação que é responsável pela substituição de uma glicina em *Fy*<sup>a</sup> por um ácido aspártico em *Fy*<sup>b</sup> (Chaudhuri et al., 1995; Iwamoto et al., 1995; Mallinson et al., 1995). Estes antígenos irão definir os fenótipos *Fy*(a+b-), *Fy*(a-b+) e *Fy*(a+b+), sendo que a completa ausência de expressão desses antígenos na superfície dos eritrócitos define o fenótipo *DARC* negativo *Fy*(a-b-). Esse fenótipo é caracterizado por dois alelos não funcionais *FY*<sup>\*B</sup><sup>ES</sup>, cujo silenciamento ocorre por causa de uma

mutação na região promotora que impede a ligação do fator de transcrição à região promotora GATA1 mutada do gene nos eritrócitos, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos (Tournamille et al., 1995a). O genótipo  $FY^*A^{ES}$  também pode aparecer caso a mutação no promotor seja no alelo  $FY^*A$ , porém este genótipo é extremamente raro e foi melhor caracterizado na Papua Nova Guiné (Zimmerman et al., 1999).



**Figura 4.** Representação esquemática do gene *FY* que codifica *DARC*, incluindo a região promotora, dois exons e o íntron entre os éxons 1 e 2. Está representado na figura: a mutação G125A, que define os alelos  $FY^*A$  e  $FY^*B$ , respectivamente e; a mutação T-33C, que diferencia o promotor selvagem (WT) do promotor mutado (MUT). Fonte: Adaptado de Cavasini et al., (2001)

Com relação à expressão do receptor *DARC* na superfície dos eritrócitos, têm-se observado que a expressão de *DARC* varia de acordo com a idade dos eritrócitos, sendo maior nos reticulócitos do que em eritrócitos maduros (Woolley et al., 2000). Além disso, estudos têm demonstrado expressão reduzida desse antígeno nos eritrócitos de indivíduos heterozigotos para a mutação T-33C (alelos  $FY^*B^{ES}$  e  $FY^*A^{ES}$ ). Esses indivíduos expressavam aproximadamente duas vezes menos *DARC* na superfície dos eritrócitos do que os indivíduos homozigotos para o promotor não mutado (alelos  $FY^*A$ ,  $FY^*B$ ) (Woolley et al., 2000; Yazdanbakhsh et al., 2000; Zimmerman et al., 1999). Estudos têm demonstrado que a diminuição do nível de expressão de *DARC* nos eritrócitos possa estar envolvida na suscetibilidade do indivíduo à adquirir a infecção por *P. vivax*. Uma evidência indireta dessa associação foi obtida por Michon e colaboradores (2001), no qual foi observado que a expressão diminuída de *DARC* nos eritrócitos de indivíduos com um único alelo *DARC* funcional resultou na redução significativa da citoaderência em ensaios *in vitro*. Esses resultados sugerem que a presença de um único alelo não-funcional ( $FY^*B^{ES}$  ou  $FY^*A^{ES}$ ) poderia reduzir a suscetibilidade à infecção por *P. vivax*. Similarmente, Zimmerman e colaboradores (1999) evidenciaram um

aumento de duas vezes na prevalência de infecção por *P. vivax* em indivíduos da Papua Nova Guiné, com o genótipo  $FY^*A/FY^*A$  comparado com  $FY^*A/FY^*A^{ES}$ . Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos avaliados com o genótipo  $FY^*A/FY^*A^{ES}$  (Zimmerman et al., 1999). A evidência mais direta foi obtida em um estudo epidemiológico conduzido na Papua Nova Guiné, onde o genótipo  $FY^*A/FY^*A^{ES}$  estava significativamente associado à susceptibilidade reduzida à infecção por *P. vivax* (Kasehagen et al., 2007). Recentemente, um trabalho de coorte realizado no Brasil demonstrou que os indivíduos com hemácias  $FY^*A$  (em homozigose ou heterozigose) têm muito menos incidência de malária vivax quando comparados àqueles habitantes da mesma área que apresentam hemácias  $FY^*B$  (King et al., 2011).

Embora o receptor *DARC* seja essencial ao processo de invasão dos eritrócitos pelo merozoíto do *P. vivax*, a influência deste receptor na resposta imune tem sido pouco estudada. Até o momento, apenas um estudo realizado na Colômbia avaliou a influência dos genótipos de *DARC* na aquisição da imunidade ao *P. vivax* (Maestre et al., 2010). Este estudo demonstrou que o perfil de reconhecimento imune a PvDBP variou de acordo com o genótipo de *DARC*. No entanto, a população incluída naquele estudo era constituída, em sua grande maioria, de afrodescendentes, sendo baixa a susceptibilidade deste grupo à infecção ao *P. vivax*. Além disso, um estudo recente demonstrou que a variabilidade genética dos parasitos que circulam na Colômbia são diferentes da maior parte das áreas de risco de malária no mundo (Sousa et al., 2011).

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando a malária causada pelo *P. vivax* como um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, fazem-se necessários estudos que visem conhecer a interação deste parasito com seu hospedeiro. De importância, estudos desta natureza poderão contribuir para o desenvolvimento de medidas mais eficazes que auxiliem no controle da malária causada pelo *P. vivax*.

Atualmente, a PvDBP é considerada o principal antígeno candidato a vacina contra o *P. vivax*. Diante desta importância, nosso grupo tem estudado o perfil da resposta imune contra esta proteína em áreas endêmicas da Amazônia (Cerávolo et al., 2009; Sousa-Silva et al., 2010). Entre os principais achados o grupo identificou uma baixa resposta imune contra a PvDBP, que pode estar relacionada com características do parasito. Particularmente, com o alto polimorfismo na região do ligante desta proteína (região II) (Sousa et al., 2010; Sousa et al., 2011). Porém, pouco se sabe ainda sobre o perfil dos anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor em populações nativas e naturalmente expostas ao *P. vivax* na Amazônia.

Além da influência de fatores do parasito na resposta imune, pode-se considerar ainda fatores genéticos do hospedeiro vertebrado, que no caso do *P. vivax* tem sido pouco estudados. Este é o caso, por exemplo, da possível influência dos genótipos do receptor *DARC* na produção de anticorpos anti-PvDBP (Maestre et al., 2010; King et al., 2011). Até o momento, estudos relacionados à influência dos genótipos de *DARC* na resposta imune funcional à PvDBP são inexistentes. Portanto, a caracterização do genótipo de *DARC* em populações naturalmente exposta ao *P. vivax* pode esclarecer se este fator genético do hospedeiro influencia no desenvolvimento de uma resposta imune eficiente, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de uma vacina anti-PvDBP.

Em 2008, o nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo de base populacional, do tipo coorte, em uma área de assentamento agrícola, no estado

do Amazonas, comunidade de Rio Pardo (Kano et al., 2012). Assim, o trabalho de campo no assentamento ofereceu uma oportunidade única para caracterizar a população quanto ao seu receptor *DARC* e avaliar a influência deste fator genético do hospedeiro na susceptibilidade a infecção e na resposta de anticorpos específicos contra o *P. vivax*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Em uma população naturalmente exposta ao *P. vivax* na Amazônia brasileira, caracterizar genotipicamente o receptor *DARC* e avaliar a sua influência na susceptibilidade e ou resposta imune específica ao *P. vivax*.

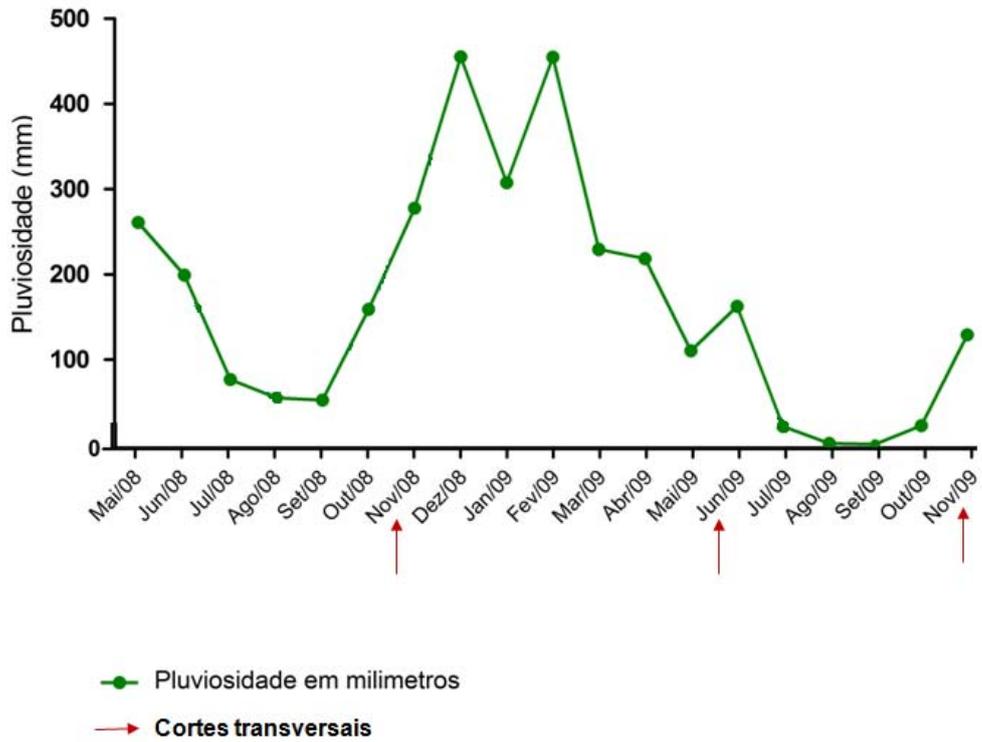
#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Genotipar o receptor *DARC* na população estudada, comunidade de Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, AM
2. Avaliar a influência dos genótipos de *DARC* na prevalência e incidência de malária por *P. vivax* ;
3. Avaliar a influência dos genótipos *DARC* na resposta imune específica, com ênfase na resposta de anticorpos convencionais e funcionais contra a PvDBP.

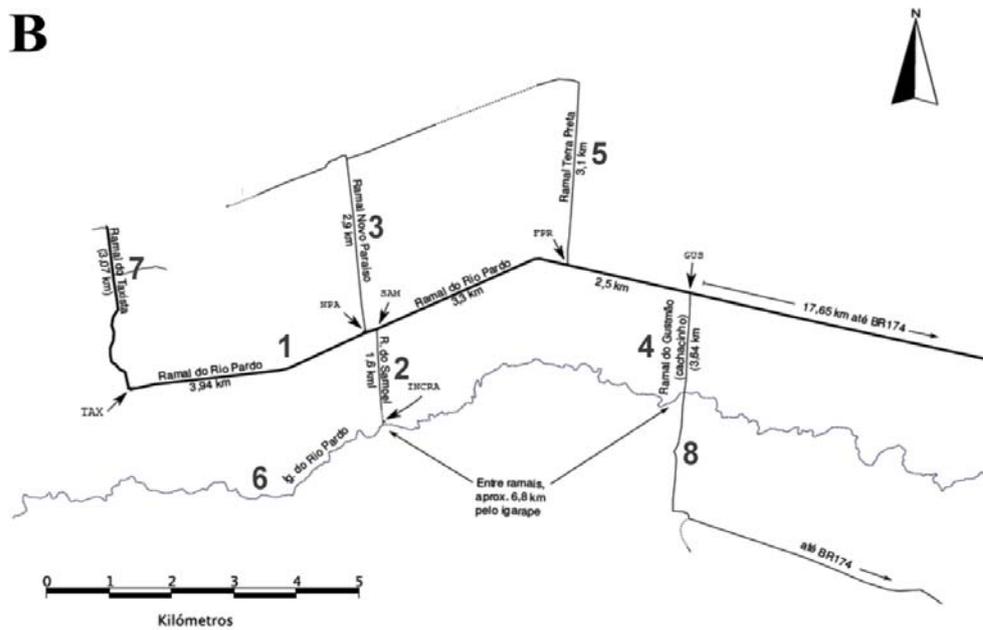
## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Área de estudo**

O estudo foi desenvolvido no assentamento agrícola de Rio Pardo (1°46'S, 1°54'S, 60°22'O, 60°10'O), localizado no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas (Kano et al., 2012). A localidade rural de Rio Pardo fica a aproximadamente 160 km de Manaus, com acesso pela rodovia (BR-174) que liga o estado do Amazonas ao estado de Roraima (Figure 6A e 6B). O assentamento agrícola foi oficialmente criado em 1996, pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), como parte dos grandes projetos de colonização da Amazônia focados na agricultura e ocupação humana da região (deCastro et al., 2006). No assentamento de Rio Pardo, a população vive principalmente da agricultura de subsistência e pesca. A qualidade das habitações foi considerada inadequada, aumentando assim a exposição ao mosquito vetor. Os serviços de saúde disponíveis são restritos, apenas um posto de diagnóstico de malária, administrado pelo município, fornece o diagnóstico e tratamento gratuito para os moradores da área. Na localidade, a temperatura média anual é de 31°C, com clima úmido e precipitação média anual de 2.000 mm por ano (Figura 5). Existem duas estações bem definidas: um período chuvoso (Novembro a Maio) e um período de seca (Junho a Outubro). O assentamento é composto por 7 áreas denominadas "ramais": Principal, Samuel, Novo Paraíso, Gusmão, Terra Preta, Taxista e Novo Progresso - que inclui as famílias assentadas de ambos os lados de vias não pavimentadas. Além disto, tem uma população ribeirinha, que vive às margens do Igarapé de Rio Pardo (Figura. 6). Nesta área, um recenseamento da população (Outubro a Setembro de 2008) identificou 701 habitantes, onde 360 (51,4%) residiam nas áreas de ramais e 341 (48,6%) no Igarapé.



**Figura 5.** Variação pluviométrica mensal na região de Rio Pardo, Município de Presidente Figueiredo, AM (Período: Maio de 2008 a Novembro de 2009). Os resultados foram expressos como milímetros de chuva (mm), sendo as setas vermelhas correspondente aos cortes-transversais realizados. **Fonte:**



**Figura 6.** A) Mapa do Estado do Amazonas, indicando a localização do município de Presidente Figueiredo e a capital do Estado, Manaus. B) Mapa demonstrando o plano de assentamento agrícola de Rio Pardo. O assentamento de Rio Pardo é composto por 8 áreas denominadas Ramais: Rio Pardo ou Principal (1), Samuel (2), Novo Paraíso (3), Gusmão (4), Terra Preta (5), Taxista (7), Novo Progresso (8) e a comunidade ribeirinha do Igarapé do Rio Pardo (6) (Adaptado de Kano et al., 2012).

## 4.2 Delineamento experimental

O sangue para obtenção de plasma e DNA foi obtido dos voluntários de acordo com protocolos aprovados pelo comitê de ética do CPqRR (Protocolo CEPSh/CPqRR No.007/2006 e No. 07/2009). Os critérios gerais de inclusão no estudo foram: (i) participação voluntária, através de consentimento por escrito; (ii) residência permanente na área de Rio Pardo. O delineamento básico do estudo envolveu uma coorte aberta, que teve seu início em Novembro de 2008 e foi encerrado em Novembro de 2009. Durante a primeira visita às áreas foram estabelecidos os seguintes procedimentos (linha de base): (i) aplicação de um questionário estruturado para todos os voluntários a fim de obter dados demográficos, epidemiológicos e clínicos; (ii) exames físicos dos indivíduos, incluindo temperatura corporal e avaliação do tamanho do fígado e do baço; (iii) busca ativa de pacientes com malária diagnosticados através de microscopia óptica (gota espessa); e (iii) coleta de sangue, sendo que dos indivíduos acima de 5 anos de idade foi coletado sangue venoso (10ml em EDTA) e das crianças com menos de 5 anos de idade, o sangue foi coletado em papel filtro no momento do diagnóstico. Seis e 12 meses após o início do estudo (linha de base), dois outros cortes-transversais idênticos foram realizados. Durante a linha de base foram incluídos 541 indivíduos. Entretanto, durante o segundo corte (entre Maio e Junho de 2009) foram incluídos na coorte mais 155 indivíduos e, no terceiro corte, mais 70 indivíduos (ocorrido entre Outubro e Novembro de 2009). Com isto, um total de 766 indivíduos, correspondente a cerca de 1.600 amostras, foram incluídos no estudo. Como a maior parte da população é nativa da região amazônica, a idade do indivíduo refletiu a exposição à malária. Assim, foi estimada a exposição cumulativa do indivíduo como sendo a duração da residência em áreas endêmicas de malária (no estado do Amazonas ou em outro lugar de área endêmica) e o número de episódios prévios de malária. A infecção recente ao *P. vivax* foi estimada como o número de lâminas positivas para o *P. vivax*, registrados no posto local de diagnóstico de malária a partir dos seis meses antes da pesquisa de base (Novembro de 2008).

#### **4.2.1 Obtenção de plasma e DNA**

Para a obtenção das amostras, o sangue total dos indivíduos foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA (Becton Dickinson, Rutherford, NJ), e após centrifugação (150 x *g* por 10min a 4°C), os soros/plasmas foram aliquotados e conservados a -20°C até o uso. O DNA das amostras foi extraído com um kit para purificação de DNA genômico (PUREGENE®, Gentra Systems, Minneapolis, USA). As amostras de DNA extraídas também foram estocadas a -20°C até que fossem utilizadas.

#### **4.3 Diagnóstico de malária**

##### **4.3.1 Gota espessa**

O diagnóstico de malária foi feito através da técnica da gota espessa de sangue corada por Giemsa em todas as amostras dos estudos. Microscopistas bem treinados da comunidade de Rio Pardo estavam encarregados de examinar o equivalente a 0,2 µL de sangue (o equivalente a 100 campos de microscopia) e estimar a densidade parasitária por microlitros de sangue. Para garantia da qualidade, uma amostra aleatória de 10% das lâminas foi analisada por um segundo microscopista treinado.

##### **4.3.2 Extração de DNA**

###### **4.3.2.1 Extração de DNA a partir de sangue total**

A extração do DNA genômico dos indivíduos foi realizada utilizando-se o kit QIAGEN (PUREGENE®, Gentra Systems, Minneapolis, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, para cada 1 mL de sangue total, acrescenta-se solução de lise para eritrócitos. Após lise visível, a mistura foi centrifugada. O sobrenadante foi então removido e o material ressuspenso em solução de lise celular. Nesta etapa, as amostras foram estocadas na geladeira (4°C) e transportadas em gelo até o Laboratório de Malária/CPqRR até onde foram realizadas as etapas seguintes de extração. Nesta próxima etapa, adiciona-se solução de precipitação de proteína. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi precipitado em um tubo contendo isopropanol P.A. absoluto (Merck). Em seguida, o DNA foi centrifugado, sendo o sobrenadante descartado. Adicionou-se etanol 70% (gelado) para a lavagem do DNA seguido de centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e

após a completa evaporação do etanol por aproximadamente 15 minutos, o DNA foi hidratado com solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e foi incubado por uma hora a 65°C. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o seu uso.

#### **4.3.2.2 Extração de DNA mediante sangue total em papel de filtro**

Para a extração do DNA genômico em papel de filtro, utilizou-se o kit QIAGEN QIAamp® DNA mini kit (PUREGENE®, Gentra Systems, Minneapolis, USA), que apresenta grande eficiência na extração de DNA para esse tipo específico de amostra. A extração foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, um ou dois círculos de sangue em papel de filtro foram cortados e colocados em microtubos (Eppendorf) de 1,5 mL. Foi adicionado tampão de lise celular ao tubo, que foi incubado. Foi acrescentado da solução de proteinase K e a mistura foi homogeneizada e incubada. Foi adicionado de tampão de lise, os tubos foram novamente homogeneizados e incubados. Em seguida, foi adicionado etanol P.A. (gelado) e o material foi homogeneizado. Posteriormente, todo o material foi colocado em uma coluna QIAamp spin. Os tubos foram centrifugados e, em seguida, os tubos contendo o filtrado foram descartados e as colunas contendo os DNAs foram colocadas em tubos novos de 2 mL. Foi adicionado tampão para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado. Em seguida, as colunas foram colocadas em tubos novos de 2 mL e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Cada coluna foi colocada em novos microtubos do tipo eppendorf 1,5 mL e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Foi acrescentada água destilada para eluir o DNA, em seguida o material foi incubado a temperatura ambiente e centrifugado. Finalmente as colunas foram descartadas e o DNA foi armazenado a -20°C até seu uso.

#### **4.3.2.3 PCR em tempo real para diagnóstico de malária**

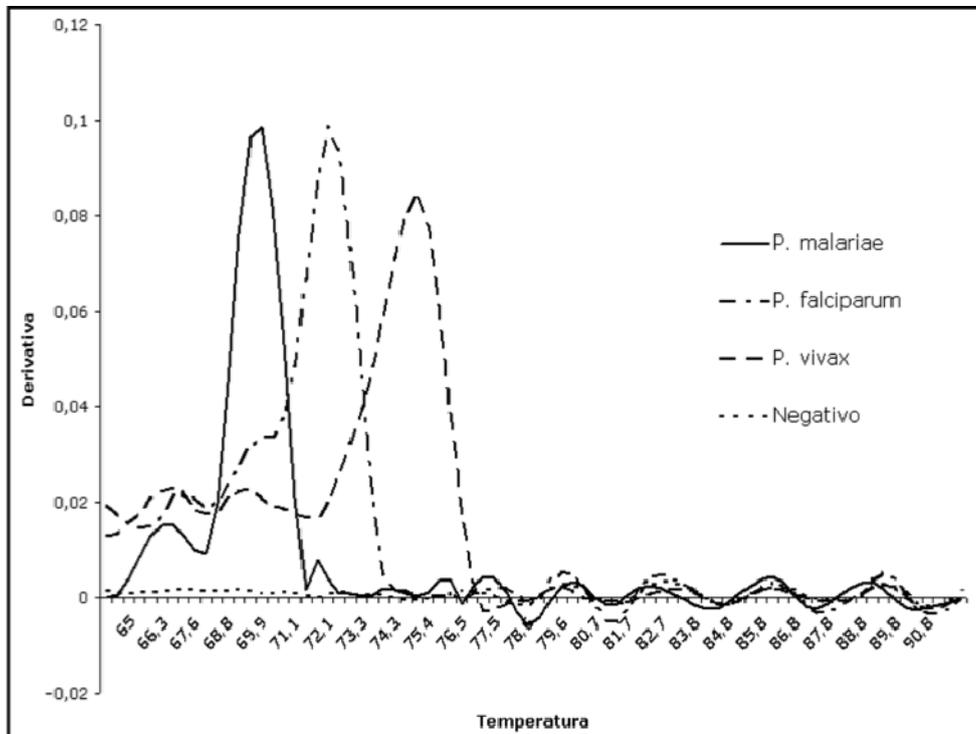
O protocolo de PCR em Tempo Real utilizado neste trabalho foi baseado no descrito por Mangold e colaboradores (2005), com algumas modificações realizadas pelo nosso grupo. O protocolo se baseia na detecção das quatro espécies de plasmódios humanos com a utilização de apenas um par de iniciadores consenso, desenhado para uma região gênero-específica da

subunidade menor do RNA ribossomal do gene *18S*. Tais iniciadores amplificam fragmentos que variam no número de nucleotídeos e esses diferentes tamanhos são analisados e discriminados por meio de curvas de dissociação (Figura 7), que permitem a diferenciação das espécies de plasmódios, onde a espécie *P. malariae* tem uma curva de melting em 73,5-75,5°C, a espécie *P. falciparum* tem uma curva de melting em 75,5-77,5°C, a espécie *P. ovale* possui sua curva de melting em 77,5-79,0°C e a espécie *P. vivax* possui uma curva de melting em 79,0-81,0°C. As reações foram realizadas em volumes de 20 µL, utilizando 100 a 200ng da amostra de DNA, 0,5 mM de cada iniciador, 2,5mM de MgSO<sub>4</sub> e 10 µL de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As amplificações e a detecção da fluorescência foram conduzidas no ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições da PCR foram um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 90°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos. As sequências dos iniciadores utilizadas nesta reação estão especificadas na Tabela 2. Em todos os ensaios de PCR foram utilizados como controles negativos amostras de DNA de indivíduos de área livre de transmissão, sabidamente negativos para malária e como controles positivos foram utilizados: (i) DNA de *P. falciparum*, proveniente de cepa 3D7 de cultivo contínuo mantido no Laboratório de Malária (CPqRR-FIOCRUZ); (ii) DNA de *P. vivax*, proveniente de indivíduos de áreas endêmicas de malária com infecção aguda e parasitemia confirmada pela microscopia óptica; (iii) DNA de *P. malariae/P. brasiliensis*, proveniente do Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária ([www.mr4.org](http://www.mr4.org)). Após a amplificação, os resultados foram observados através de curvas de dissociação resultantes da medição contínua de fluorescência a 530 nm, onde a temperatura foi aumentada gradativamente de 60°C a 95°C. Os picos de fusão de cada fragmento amplificado foram visualizados plotando a derivada negativa da fluorescência em função da temperatura versus a temperatura ( $-dF/dT^{\circ}$  vs  $T^{\circ}$ ).

**Tabela 1.** Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real

Nome dos Iniciadores	Região	Sequência dos iniciadores	Região
P1	5'	TAA CGA ACG AGA TCT TAA	3'
P2	5'	GTT CCT CTA AGA AGC TTT	3'

Fonte: Mangold et al. (2005)



**Figura 7.** Curvas de dissociação obtidas por PCR em tempo real, com primers desenhados para uma região gênero-específica na subunidade menor do RNA ribossomal, gene 18S. As curvas foram obtidas a partir de DNA de cultura de *P. falciparum*, DNA de pacientes infectados com *P. vivax* e DNA de *P. malariae/P. brasiliensis* e cedido gentilmente pelo MR4 (*Malaria Research and Reference Reagent Resource Center*).

#### 4.3.2.4 Diagnóstico de malária pela Reação de Nested PCR

Amostras de DNA foram amplificadas através da técnica de Nested-PCR descrita por Snounou e colaboradores (1993), com modificações. Este protocolo utiliza iniciadores que se anelam em uma região gênero-específicas e

espécie-específicas dentro da subunidade menor do RNA ribossomal, gene 18S. A Nested-PCR amplifica na primeira reação um fragmento de 1200 pb (iniciadores gênero-específica) e na segunda reação são utilizados iniciadores complementares às regiões espécie-específicas, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados e seus iniciadores descritos na Tabela 1. As reações foram realizadas em volumes de 20 µL utilizando-se: 80 ng de amostra de DNA, 250 nM de cada um dos iniciadores, 10 µL de Master Mix (PROMEGA - 0,3 U Taq DNA Polimerase, 200 µM de cada um dos dNTPs e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100™ Version 7.0 - MJ Research e as condições da PCR foram, para a primeira reação: 24 ciclos de 95°C por cinco minutos, 58°C por dois minutos, 72°C por dois minutos e extensão final a 72°C por cinco minutos. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições anteriores, porém com 29 ciclos utilizando 0,5 µL do produto da primeira reação. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em eletroforese em gel contendo 2% de agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), sendo adicionados 5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras de DNA foram misturadas em tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarose) e aplicadas em cada uma das canaletas do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100 V, por cerca de 40 minutos. O gel foi analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e arquivado em sistema digital.

**Tabela 2.** Sequências de iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados para o gene 18S ssuRNA dos parasitas da malária na Nested-PCR.

Alvo	PCR	Nome dos Iniciadores	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do fragmento
<i>Plasmodium sp.</i>	1ª reação	rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1.200 pb
		rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	
<i>Plasmodium vivax</i>	2ª reação	rVIV1	GTT CCT CTA AGA AGC TTT	120 pb
		rVIV2	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	
<i>Plasmodium falciparum</i>	2ª reação	rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205 pb
		rFAL2	ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC	
<i>Plasmodium malariae</i>	2ª reação	rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATACCGC	144 pb
		rMAL2	AAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	

Fonte: Snounou et al. (1993)

#### 4.4 Determinação do grupo sanguíneo *DARC*

##### 4.4.1 Genotipagem do antígeno de grupo sanguíneo *DARC* pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

O protocolo de PCR em Tempo Real utilizado neste trabalho foi baseado no descrito por nosso grupo (Sousa et al., 2007, com modificações). As amostras foram processadas em placas óticas de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O volume final da reação foi de 20 µL contendo 50-100 ng de DNA genômico, 5 µL SYBR® Green PCR master mix (Biosystems), e 10 pmoles de cada primer (Biosystems). A amplificação e a fluorescência foram detectadas utilizando ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições da PCR foram: um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, foi realizado um ciclo de dissociação com variação crescente de temperatura (60°C a 95°C).

Os pares de iniciadores FY/RYA e FAB/RABGATA foram utilizados na mesma reação, como uma reação de PCR multiplex, bem como os pares FY/RYB e FGATA/RABGATA. Os iniciadores RYA e RYB apresentam o polimorfismo G125A na extremidade 3' e juntamente com o iniciador senso FY amplificam os alelos *FY*\*A e *FY*\*B, respectivamente. Para detecção da mutação T-33C na região promotora do gene *FY*, foram utilizados os iniciadores FAB e FGATA, que amplificam juntamente com o iniciador RABGATA, o promotor selvagem e mutado, respectivamente (Tabela. 3).

**Tabela 3.** Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de genotipagem de *DARC* por PCR em tempo real

Nome dos Iniciadores	Região	Sequência dos iniciadores	Região
FGATA	5'	CCCGGGCCCGCCG CCC TCA TTA GTC GGC TCT TTC	3'
FAB	5'	CCC TCA TTA GTC GGC TCT TTT	3'
RABAGATA	5'	A GGG GCA TAG GGA TAA GGG ACT	3'
FY	5'	C TCA AGT CAG CTG GAC TTC GAA GAT	3'
RYA	5'	AC CTG CTT CCA GGT TGG CTC	3'
RYB	5'	CTG CTT CCA GGT TGG CGT	3'

Fonte: Sousa et al. (2007)

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

Em casos de dúvida foi utilizado este segundo método de PCR para confirmação. A amplificação dos alelos *FY*\*A, *FY*\*B, *FY*\*A<sup>ES</sup> e *FY*\*B<sup>ES</sup> foi realizada através da reação em cadeia da polimerase, utilizando iniciadores alelo-específicos (Tabela 4) descrita por Olsson e colaboradores (1998). Os pares de iniciadores FyAB2/FyAREV, FyAB2/FyBREV2, GATAFy2/FyAREV e GATAFy2/FyBREV2 foram utilizados para detecção dos alelos *FY*\*A, *FY*\*B, *FY*\*A<sup>ES</sup> e *FY*\*B<sup>ES</sup>, respectivamente. Para um volume final de reação de 25µL foi

utilizado 200ng de DNA genômico, 0,2µM de cada iniciador, 200µM dNTPs, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA polimerase (Promega Corporation, Wisconsin, USA) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As amplificações foram conduzidas em termociclador automático PTC100TM Programmable Thermal Controller e as condições da PCR foram: um ciclo de 5min a 95°C; quatro ciclos de 1min a 95°C, 1min a 69°C e 1min a 72°C; 31 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 68°C e 1min a 72°C e uma extensão final de 5min a 72°C.

**Tabela 4.** Relação dos iniciadores utilizados na genotipagem do receptor *DARC* por PCR alelo-específica (PCR-ASP)

Nome dos Iniciadores	Região	Sequência dos iniciadores	Região
FyAB2	5'	CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT	3'
FyAREV	5'	AGCTGCTTCCAGGTTGGCAC	3'
FyBREV2	5'	AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT	3'
GATAFy2	5'	CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC	3'

Fonte: Olsson et al. (1998)

#### 4.5 Sequenciamento do Receptor *DARC*

Todos os indivíduos portadores do genótipo *FY\*B<sup>ES</sup>/FY\*B<sup>ES</sup>* (fenótipo *DARC* negativo) tiveram seu receptor *DARC* sequenciados para confirmação.

##### 4.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase para Amplificação do *DARC*

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas para a amplificação de um fragmento de 942bp do *DARC*. Os iniciadores utilizados foram: senso – 5' TCAAACAGGAAGACCCAAG 3' e anti-senso – 5' TTCATGCTTTTCAGACCTCT 3'. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20µl, utilizando 100-200ng da amostra de DNA, 0,5µM de cada iniciador, 1,25mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,75mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U da enzima *platinum Taq DNA polimerase high fidelity* (Invitrogen, California, USA) e o tampão 1X fornecido com a enzima. As amplificações foram

conduzidas em termocicladores automáticos *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e *PTC100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller* (MJ Research Inc., Massachusetts, USA). As condições da PCR foram um ciclo de 3min a 94°C, seguido por 22 ciclos de 40s a 94°C, 40s a 60°C, 1min a 72°C, e um ciclo de extensão final de 5min a 72°C.

#### 4.5.2 Reação de seqüenciamento

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

Resumidamente, para a reação de seqüenciamento adicionou-se a cada poço de uma placa de 96 poços até 5µl de DNA (cerca de 100ng), 1µl de iniciador (3,3µM dos mesmos iniciadores utilizados na PCR) e 4µl de *DYEnamic ET terminator mix* contendo tampão, enzima, dNTPs e ddNTPs para um volume total de 10µl de reação. As reações foram conduzidas em termociclador automático *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) programado para 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 20s e anelamento e extensão a 60°C por 3min. O DNA foi precipitado adicionando-se 1µl de acetato de amônio 7,5M e 30µl de etanol 96%. O homogeneizado foi incubado por 20min a 25°C e centrifugado a 2500 x g por 45min a 25°C. O sobrenadante foi removido por inversão da placa e o sedimento lavado com 100µl de etanol 70%. Após descarte do excesso de álcool, a placa foi centrifugada a 600 x g por 1 segundo a 25°C sobre papel absorvente e o restante do álcool deixado evaporar por cerca de 10min a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 10µl de tampão (70% formamida, 1mM EDTA) e armazenado a 4°C. As reações de seqüenciamento foram analisadas através de eletroforese capilar utilizando o seqüenciador automático de DNA *MegaBACE* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

### 4.5.3 Análise das seqüências

Os polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados a partir do alinhando das seqüências do gene *DARC* com os programas *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) e *Contig Assembly Program (CAP)* (Huang, 1992), dentro do pacote de programas *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9* (Hall, 1999). No *BioEdit*, quando necessário foi realizada a edição manual do alinhamento.

### 4.6 Proteínas recombinantes

Foram utilizadas no estudo de resposta imune duas proteínas recombinantes de *P. vivax* a fim de detectar anticorpos. A porção de 19 kDa proteína recombinante merozoite surface protein-1 de formas sanguíneas do *P. vivax* (MSP1-19 em fusão com 6xHistTag), foi gentilmente cedida Dra. Irene Soares (Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Universidade de São Paulo, Brasil). Para a expressão da proteína recombinante PvDBP, foi utilizado o plasmídeo pGEX-2T contendo as seqüências codificadoras da região II a IV (aa-177 a 815) da PvDBP, gentilmente cedido pelo Dr. John Adams (University of South Florida, Florida, USA). O protocolo foi revisto por Ceravolo *et al.*, 2005.

### 4.7 Ensaio de ELISA

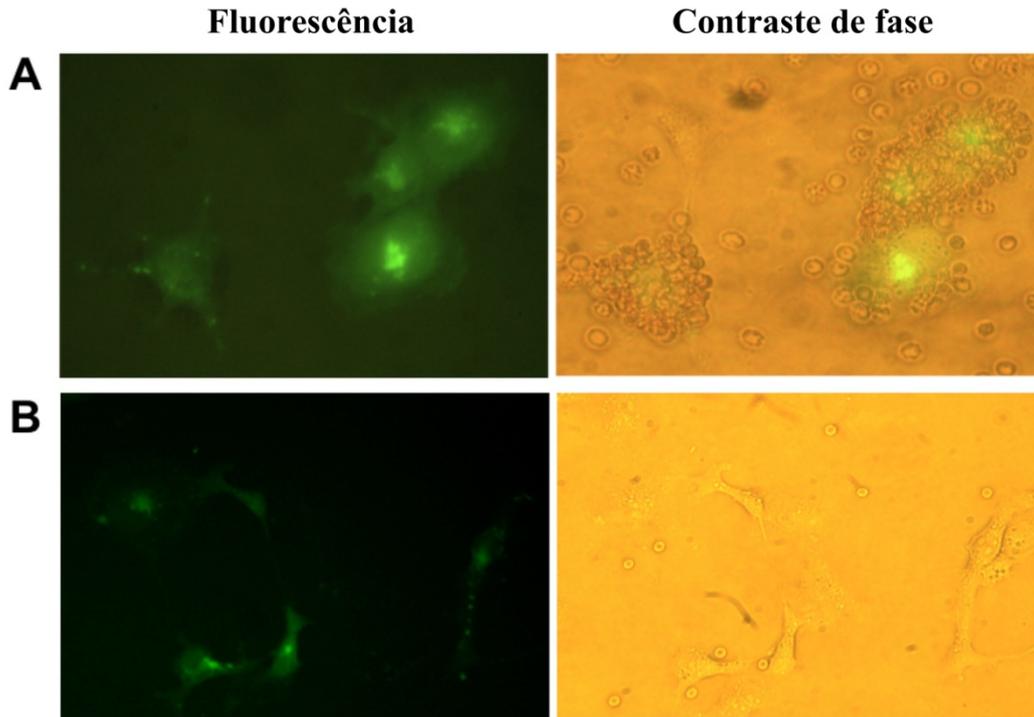
Para avaliar os anticorpos IgG totais contra as proteínas recombinantes PvDBP II-IV e MSP1-19, foram realizados ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) conforme o protocolo bem estabelecido pelo grupo (Ceravolo *et al.*, 2005). Resumidamente, as placas de 96 poços (Maxysorp, Nunc, Denmark) foram sensibilizadas com 5 µg/mL de PvDBP II-IV ou 1 µg/mL de PvMSP1-19, diluídas em PBS 1X (formula), durante 18h a 4°C. Após a sensibilização as placas foram lavadas por três vezes com PBS contendo 0,05% de tween 20 (Sigma-Aldrich). Para o bloqueio, foram adicionados 200 µL de PBS-tween 20 com 5% de leite em pó desnatado. Após 1h de bloqueio a 37°C as placas foram lavadas três vezes com PBS-tween 20. Para cada poço, 100 µL dos soros-testes foram diluídos a 1:100 (PvDBPII-IV) ou 1:80 (PvMSP-119) em tampão PBS-tween 20 com 1,5% de leite em pó (duplicatas) e

incubados a 37°C por 1 hora. Após incubação, as placas foram lavadas por dez vezes e incubadas, novamente a 37°C por 1 hora, com 100 µL/poço do conjugado anti-IgG humano ligada a peroxidase (específica para cadeia  $\gamma$ , Sigma-Aldrich) na diluição de 1:1.000. Após a lavagem, as placas foram reveladas acrescentando-se 100 µL/poço de solução contendo OPD (10 mg/tablete) (Sigma-Aldrich) diluído em 50 mL de tampão citrato de sódio (0,1M pH 5,0) na presença de 40 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30% (Sigma-Aldrich). A reação foi interrompida após 15 minutos pela adição de 50 µL de uma solução de ácido sulfúrico 4N. A leitura das placas foi realizada em um leitor automático de ELISA (Stat Fax-2.100, Awareness Technology, Palm City, FL), onde a densidade ótica (DO) foi medida em um comprimento de onda de 492 nm. A DO obtida utilizando o antígeno controle (GST) foi subtraída da DO do antígeno-teste (PvDBPII-IV ou PvMSP-119), para que a DO específica fosse determinada. O resultado foi expresso em Índice de Reatividade (IR= OD<sub>492nm</sub> da amostra testada dividido pelo valor do *cut-off*).

#### 4.8 Transfecção de células COS-7 e ensaios de citoaderência

Para os ensaios de transfecção utilizou-se um plasmídeo construído previamente pelo nosso grupo de pesquisa que representa a variante de *P. vivax* mais frequente no Brasil (Souza-Silva *et al.*, 2010). Para os ensaios de transfecção utilizou-se a lipofectamina e reagente *Plus* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), nas concentrações e protocolos indicados pelo fabricante. Resumidamente, as células COS-7 foram adicionadas às placas de cultura de seis poços (Nunc, Denmark) (1,5 x 10<sup>5</sup> células/poço) e então transfectadas com 0,5µg/poço de DNA plasmidial e complexos de lipossomos (5% de reagente *Plus* e 3% de lipofectamina) em meio de cultura DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Rockville, MD) sem soro bovino fetal (SBF) (meio DMEM incompleto). Este meio incompleto continha 25mM de bicarbonato de sódio, 2mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) e 25mM de HEPES (Sigma). Após 6h de incubação do complexo lipossoma-DNA (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> 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), sendo as placas incubadas a 37° C. Após 24 h, o meio de cultura foi novamente substituído por meio DMEM completo, e a eficiência da transfecção verificada por meio da visualização das células em um microscópio de fluorescência. Quarenta e oito horas após a transfecção, as placas foram lavadas com meio DMEM incompleto, e as células incubadas com os soros/plasmas-testes (37°C, 1h, 5% de CO<sub>2</sub>) diluídos em meio DMEM incompleto. A diluição utilizada foi de 1:40, pois em ensaios prévios, essa diluição apresentou a melhor interação ligante-receptor quando diferentes soros foram testados. Posteriormente, foram adicionados 200µL/poço de uma solução a 10% de eritrócitos humanos O/DARC positivos em meio DMEM completo e as placas incubadas à temperatura ambiente por 2h. Ao final da incubação as placas foram lavadas, três vezes com meio DMEM incompleto, para que os eritrócitos não aderentes fossem retirados. Os resultados foram expressos como porcentagem relativa de inibição (Ceravolo et al., 2008).



**Figura 8.** Ensaio de citoaderência ilustrando as células COS-7 expressando a PvDBP-II. (A) A figura mostra a presença de eritrócitos aderidos às células COS-7 transfectadas (rosetas) através da ligação Duffy/DARC. (B) A figura ilustra a ausência de ligação entre eritrócitos e as células COS-7 transfectadas em função da presença de anticorpos inibitórios no soro. Visualização em aumento de 200x (Microscópio de fluorescência invertido e com contraste de fase, Nikon, Melville, NY).

#### 4.9 Análise estatística

O desenho experimental deste trabalho foi construído com a ajuda do médico e epidemiologista Dr. Cor Jesus Fontes (UFMT), que colabora com nosso grupo há vários anos. Um banco de dados foi construído com as informações obtidas dos pacientes (pacote estatístico EpiData 2002). Dependendo da distribuição dos dados amostrais (distribuição normal ou não) testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos foram utilizados. Assim, os testes de análise de variância (ANOVA) ou Krukall-wallis foram utilizados para comparar a diferença de médias/medianas entre os grupos, seguido de teste de Tukey ou Dunn como teste post hoc. O qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher foram utilizados para comparações de proporções entre os grupos. As análises multivariadas foram realizadas para analisar a independência das variáveis e excluir fatores de confusão. A incidência de malária foi avaliada pela densidade de incidência, sendo calculada pela

contribuição de cada indivíduo por tempo de acompanhamento no estudo ( casos novos por 1000 pessoas-mês). Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resposta de anticorpos anti-*P. vivax* na população de Rio Pardo/AM

Dos 690 indivíduos estudados, mediana de idade 25 anos e proporção homens e mulheres 1.35:1, 70 (10%) estavam infectados no momento da primeira coleta de sangue, sendo que 63 (9%) das infecções foram causadas por *P. vivax* (Tabela 5). Nesse estudo, 631 indivíduos foram avaliados pela presença de anticorpos IgG contra a PvDBP e MSP1<sub>19</sub>. Desses, 47% (297/631) apresentaram anticorpos anti-PvDBP e 55% (346/631) anticorpos anti-MSP1<sub>19</sub> (Tabela 5). Para ambos os antígenos, não houve diferença na resposta de anticorpos entre os indivíduos infectados e não infectados (dados não mostrados).

**Tabela 5.** Dados demográficos, epidemiológicos e de resposta de anticorpos dos 690 indivíduos envolvidos no estudo (Novembro 2008 – Novembro 2009).

Característica	
Mediana de idade, anos (intervalo interquartil)	25 (11 - 45)
Gênero (M:F)	1.35:1
Prevalência de malária, n (%) <sup>a</sup>	
<i>P. vivax</i>	63 (9)
<i>P. falciparum</i>	7 (1)
Total	70 (10)
Anos de exposição à malária, mediana (intervalo interquartil)	22 (11 - 38)
Episódios prévios de malária, mediana (intervalo interquartil)	4 (1 - 11)
Anticorpos, n=631 (%) <sup>b</sup>	
<i>Anti-PvDBP</i> (positivo, %)	297 (47)
<i>Anti-PvMSP1<sub>19</sub></i> (positivo, %)	346 (55)
<i>Anti-Pv</i> (positivo, %)	451 (71)

<sup>a</sup> A infecção malárica foi detectada pela microscopia convencional e/ou PCR em tempo Real para o gene 18S rRNA (Mangold *et al.* 2005)

<sup>b</sup> Número (%) de indivíduos com resposta positiva de anticorpos no tempo de sua primeira coleta de sangue (Linha de base do indivíduo)

## 5.2 Distribuição de frequência dos genótipos *DARC* na população estudada

Visando avaliar a distribuição dos genótipos e alelos de *DARC* na população estudada, o receptor *DARC* foi genotipado por PCR em tempo real (Tabela 6). Na população de Rio Pardo, o genótipo  $FY^*A/FY^*B$  (29,6%) foi o mais frequente, seguido dos genótipos  $FY^*A/FY^*A$  e  $FY^*A/FY^*B^{ES}$ . Como esperado, o genótipo  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$ , correspondente ao fenótipo *DARC* negativo, foi pouco frequente na população estudada (3%). De interesse, os indivíduos *DARC* negativos apresentaram uma mediana de idade mais elevada que aqueles pertencentes aos outros genótipos e, história de maior exposição à malária (Teste de Kruskal Wallis,  $p=0,006$ ).

**Tabela 6.** Distribuição do genótipo de *DARC* pela idade, gênero e anos na área.

<b>Genótipo de <i>DARC</i></b> n = 690	<i>FY</i> *A / <i>FY</i> *B	<i>FY</i> *A / <i>FY</i> *A	<i>FY</i> *A / <i>FY</i> *B <sup>ES</sup>	<i>FY</i> *B / <i>FY</i> *B	<i>FY</i> *B / <i>FY</i> *B <sup>ES</sup>	<i>FY</i> *B <sup>ES</sup> / <i>FY</i> *B <sup>ES</sup>
n (%)	204 <sup>a</sup> (29.6)	160 <sup>b</sup> (23.2)	139 <sup>b</sup> (20.1)	93 <sup>c</sup> (13.5)	73 <sup>c</sup> (10.6)	21 <sup>d</sup> (3.0)
Mediana de idade (intervalo interquartil)	21.0 (9.0-38.0)	25.0 (9.3-46.0)	23.0 (13.0-43.0)	34.0 (16.0-46.0)	32 (13.5-51.0)	44* (13.0-58.0)
Gênero (M:F)	1.43:1	1.13:1	1.4:1	1.27:1	1.61:1	1.6:1
Mediana de anos na área (interval interquartil)	19.5 (9.0-33.0)	22 (9.0-44.5)	20 (13.0-35.0)	28.5 (15.3-41.3)	25 (12.8-43.5)	31.5* (13.0-52.0)

<sup>a-d</sup> As diferentes letras significam diferenças nas frequências do genótipo *DARC* (teste de  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

\* Estatisticamente significativo (mediana de idade : Teste Kruskal Wallis = 16,168 ,  $p = 0,006$ ; mediana de anos na área:

Teste Kruskal Wallis = 14,088 ,  $p = 0,015$ )

### 5.3 Influência dos genótipos de *DARC* na susceptibilidade a infecção malária e na resposta imune

Na linha de base do estudo, foi possível observar que a frequência de infecção malárica não variou em função do genótipo e/ou alelos de *DARC* do indivíduo. Como mostrado na Tabela 7, as infecções pelo *P. vivax* foram igualmente distribuídas entre os diferentes genótipos de *DARC*. Além disso, não houve diferença quando comparados a frequência de infecção malárica distribuídas pelos diferentes alelos de *DARC*.

**Tabela 7.** Genotipagem de *DARC* nos indivíduos infectados pelo *P. vivax* (*Pv*) e indivíduos não infectados ou infectados por *P.falciparum* (*Pf*).

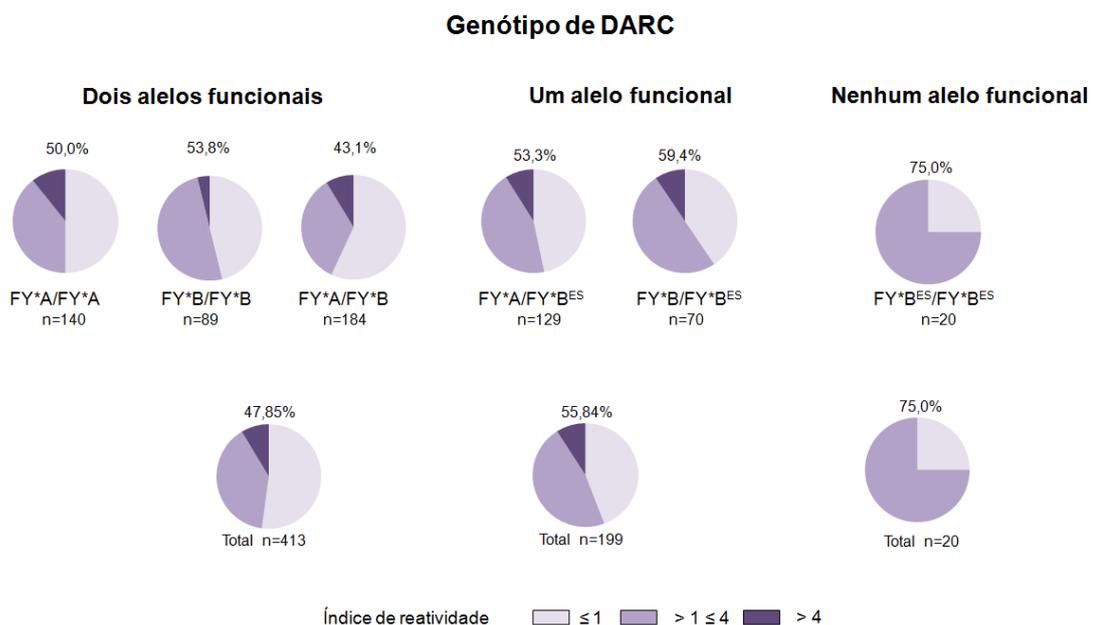
Genótipo <i>DARC</i>	Indivíduos infectados com <i>Pv</i> (n=37)		Indivíduos infectados com <i>Pf</i> ou não infectados (n=653)		Alelo <i>DARC</i>	Indivíduos infectados com <i>Pv</i> (n=74)		Indivíduos infectados com <i>Pf</i> ou não infectados (n=1306)	
	Indivíduos infectados com <i>Pv</i> (n=37)	Indivíduos infectados com <i>Pf</i> ou não infectados (n=653)	Indivíduos infectados com <i>Pv</i> (n=74)	Indivíduos infectados com <i>Pf</i> ou não infectados (n=1306)					
<i>FY*A / FY*A</i>	9 (24.3)	151 (23.1)	<i>FY*A</i>	39 (52.7)	<i>FY*A</i>	39 (52.7)	624 (47.8)		
<i>FY*A / FY*B<sup>ES</sup></i>	7 (18.9)	132 (20.2)	<i>FY*B</i>	24 (32.4)	<i>FY*B</i>	24 (32.4)	439 (33.6)		
<i>FY*B / FY*B</i>	3 (8.2)	90 (13.8)	<i>FY*B<sup>ES</sup></i>	11 (14.9)	<i>FY*B<sup>ES</sup></i>	11 (14.9)	243 (18.6)		
<i>FY*B / FY*B<sup>ES</sup></i>	4 (10.8)	69 (10.6)							
<i>FY*A / FY*B</i>	14 (37.8)	190 (29.2)							
<i>FY*B<sup>ES</sup> / FY*B<sup>ES*</sup></i>	0	21 (3.2)							

\*O genótipo *FY\*B<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup>* não foi incluído na análises pois é altamente resistente a infecção pelo *P.vivax*. Entre os outros genótipos não houve diferença estatística entre os grupos.

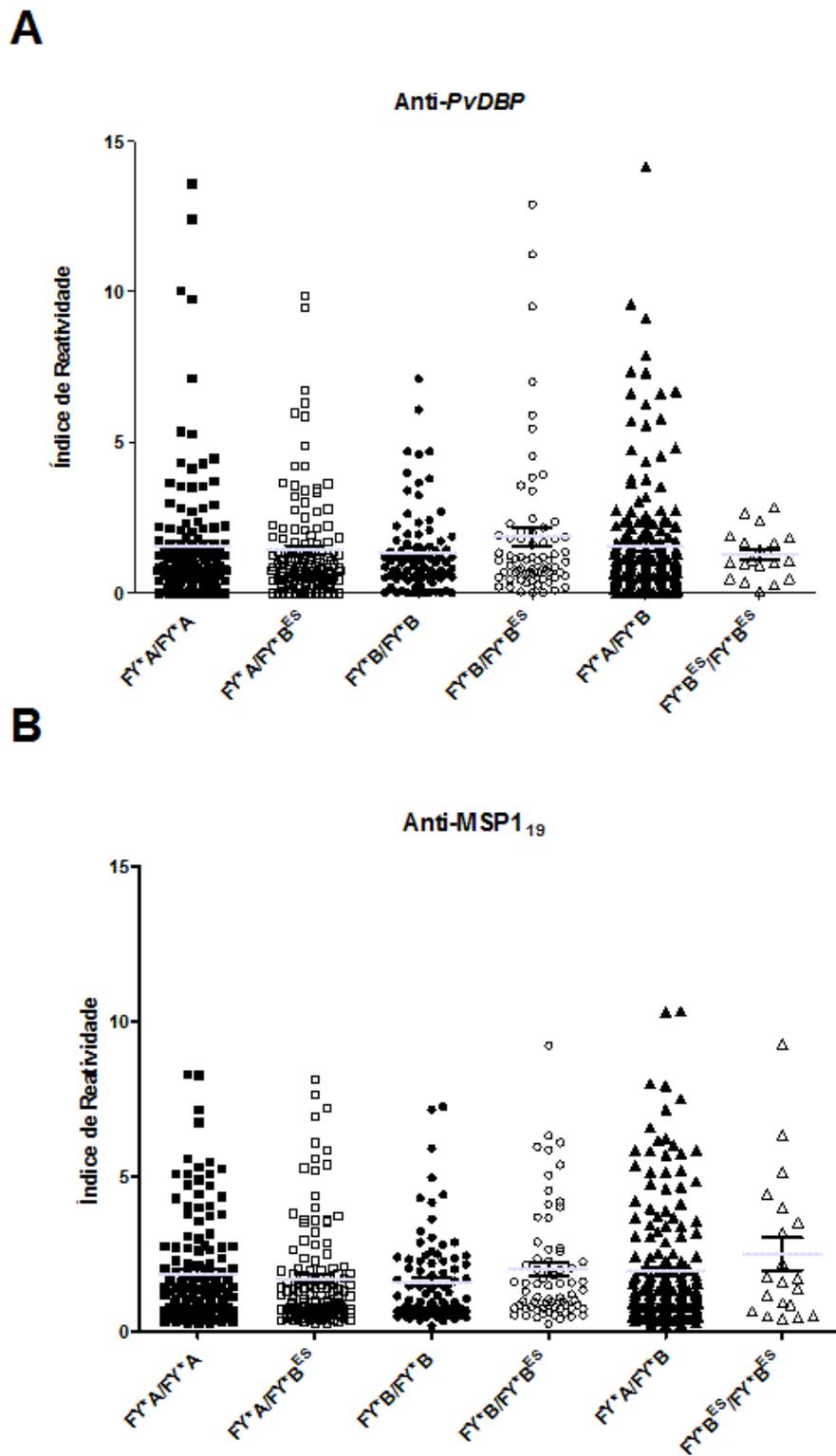
Para determinar a influência dos genótipos de *DARC* na resposta imune, avaliou-se tanto anticorpos detectados pela sorologia convencional (anti-PvDBP e anti-MSP1<sub>19</sub> no ELISA), quanto pela sorologia funcional (anticorpos anti-PvDBP inibitórios). A Figura 9 mostra que a frequência de resposta à PvDBP foi semelhante entre os diferentes genótipos de *DARC*. Embora,

aparentemente os indivíduos *DARC* negativos apresentaram maior frequência de resposta de anticorpos, quando comparados aos outros genótipos, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Além disso, nenhuma diferença estatística foi observada na magnitude de resposta de anticorpos contra a PvDBP (Figura 10A) ou contra a PvMSP1 (Figura 10B).

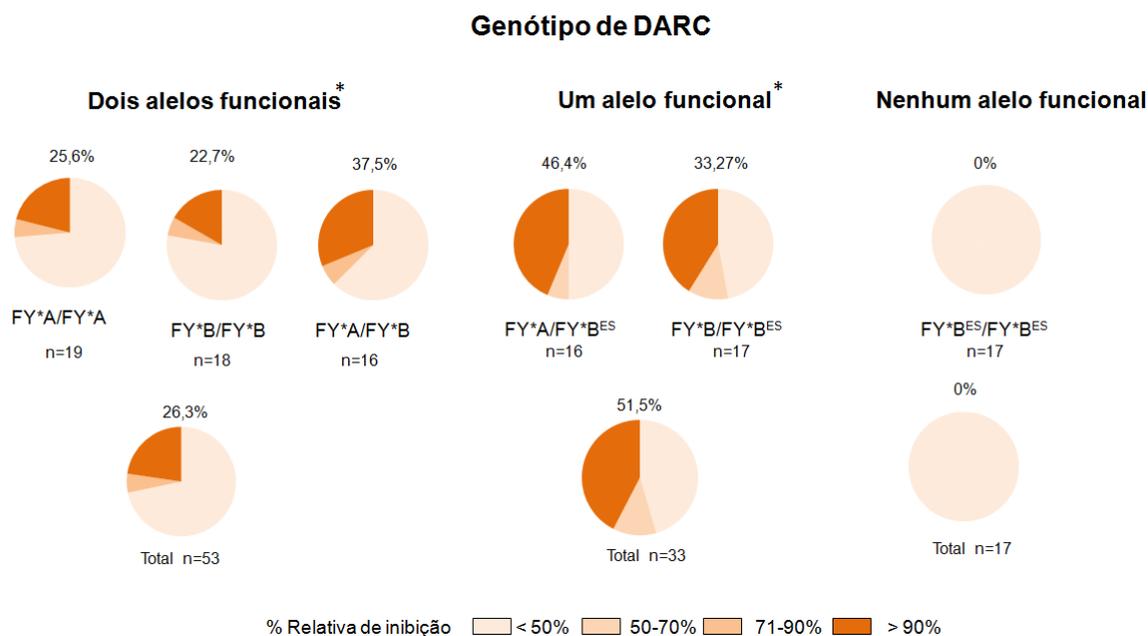
Em relação aos ensaios inibitórios, a frequência de respondedores variou em função do alelo/genótipo de *DARC* do indivíduo. Mais especificamente, os resultados mostraram uma menor frequência de resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP em indivíduos carreadores de dois alelos funcionais de *DARC* (teste do  $\chi^2$  com correção de Yates,  $p = 0,0012$ ). A Figura 11 ilustra a menor frequência destes anticorpos em indivíduos que expressam os antígenos Fya e Fyb em homozigose ( $FY^*A/FY^*A$ , 26% e  $FY^*B/FY^*B$ , 22%). Observou-se ainda uma resposta de anticorpos intermediária entre indivíduos com esses antígenos em heterozigose ( $FY^*A/FY^*B$ , 37%). Como esperado, indivíduos *DARC* negativos não produziram anticorpos inibitórios.



**Figura 9.** Resposta de anticorpos contra a PvDBP no ELISA em função dos genótipos e número de alelos funcionais de *DARC*. Estão representadas as frequência de anticorpos anti-PvDBP em indivíduos incluídos na linha de base do estudo. Dois alelos funcionais (genótipos  $FY^*A/FY^*A$ ,  $FY^*B/FY^*B$  e  $FY^*A/FY^*B$ ), um alelo funcional (genótipo  $FY^*B/FY^*B^{ES}$  e  $FY^*A/FY^*B^{ES}$ ) ou nenhum alelo funcional (*DARC* negativos, genótipo  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$ ). Positividade no ELISA foi definida pelo índice de reatividade maior que 1



**Figura 10.** Frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP(A), anti-MSP1<sub>19</sub> (B) em relação aos genótipos de *DARC*. Não houve diferença estatística entre os grupos.



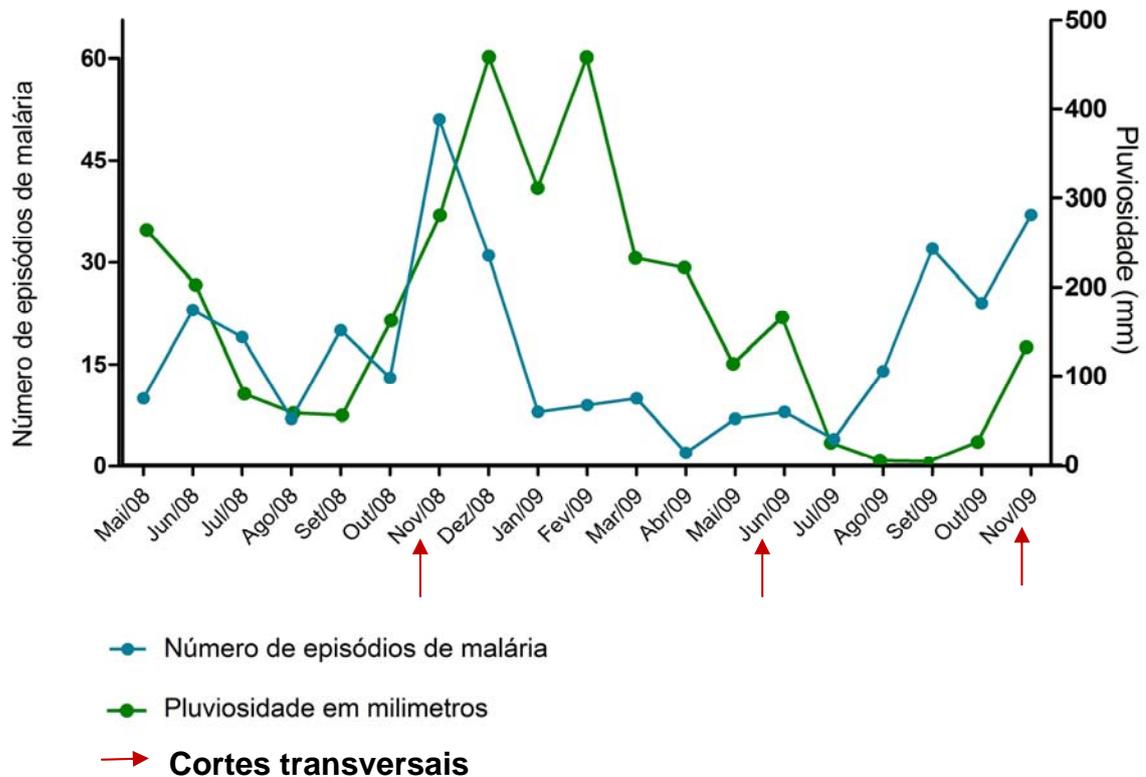
**Figura 11.** Resposta de anticorpos inibitórios contra a PvDBP em função dos genótipos e número de alelos funcionais de *DARC*. Estão representadas as frequências de anticorpos inibitórios anti-PvDBP em indivíduos incluídos na linha de base do estudo. Dois alelos funcionais (genótipos *FY\*A/FY\*A*, *FY\*B/FY\*B* e *FY\*A/FY\*B*), um alelo funcional (genótipo *FY\*B/FY\*B<sup>ES</sup>* e *FY\*A/FY\*B<sup>ES</sup>*) ou nenhum alelo funcional (*DARC* negativos, genótipo *FY\*B<sup>ES</sup>/FY\*B<sup>ES</sup>*). O asterisco (\*) significa que houve significância estatística verificada pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates, considerando um nível de 5% de significância. O ensaio de inibição é considerado positivo quando a % de inibição relativa é  $\geq 50\%$  (Ceravolo et al., 2008)

## 5.4 Estudo Prospectivo

### 5.4.1 Avaliação prospectiva da influência do *DARC* na infecção malárica e na resposta imune

Dos 690 indivíduos estudados, 494 (71,6%) tiveram uma segunda ou terceira amostra coletadas durante o segundo e/ou terceiro corte-transversal, respectivamente. A Figura 12 ilustra o número de casos agudos detectados ao longo do estudo. Vale ressaltar que, como esperado, o número de episódios de malária variou de acordo com o índice pluviométrico da região, sendo o maior número de casos detectados em novembro de 2008 (primeiro corte transversal).

Assim, avaliamos, prospectivamente, a influência do *DARC* na infecção malárica e na resposta imune.



**Figura 12.** Relação entre o número de casos de malária e índice pluviométrico na região de Rio Pardo (AM). O gráfico em linha azul indica a variação do número de casos de malária na população estudada (meses) e a linha verde indica a variação pluviométrica da região no mesmo período

#### 5.4.1.1 Genótipos de *DARC* e infecção malárica

Em relação a incidência de malária vivax - avaliada aqui como infecção por 1000 pessoas-mês – não houve diferença entre os grupos pertencentes aos diferentes genótipos *DARC* (Tabela 8). De fato, a incidência de malária variou de 24,9 a 38,5 nos diferentes genótipos, porém esta variação não foi estatisticamente significativa (em nº de casos/1000 pessoas-mês). Quando analisado o risco de infecção pelo *P. vivax* dos indivíduos carreadores de cada genótipo de *DARC*, a variação foi de 0,9 a 1,3. Portanto, sem nenhuma diferença estatística estes grupos (Tabela 8). Vale ressaltar que indivíduos carreadores do genótipo  $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$  (fenótipo *DARC* negativo) não foram

incluídos nestas análises por serem altamente resistentes a infecção pelo *P. vivax*.

**Tabela 8.** Incidência anual de infecção pelo *P. vivax* em função dos genótipos de *DARC* dos indivíduos estudados, Rio Pardo/AM. Junho de 2008-Novembro de 2009

Genótipo de <i>DARC</i>	Incidência anual de <i>P. vivax</i> <sup>a</sup>				
	Pessoas-mês	n <sup>b</sup>	Índices (casos/1000 pessoas-mês)	Risco relativo (95% CI)	<i>P</i> -value
<i>FY*A / FY*A</i>	2.160	71	32.9	1,0 (0,8-1,4)	0,363
<i>FY*A / FY*B<sup>ES</sup></i>	1.728	48	27.8	1,3 (0,9-1,8)	0,105
<i>FY*B / FY*B</i>	1.122	29	25.9	1,3 (0,9-2,0)	0,083
<i>FY*B / FY*B<sup>ES</sup></i>	1.038	40	38.5	0,9 (0,6-1,3)	0,273
<i>FY*A / FY*B</i>	2.532	88	34.9	referencia <sup>c</sup>	-

<sup>a</sup> A incidência anual de malária vivax foi calculada baseada no número de casos de malária em relação ao tempo de contribuição (em meses) de cada indivíduo ao longo do estudo (12 meses)

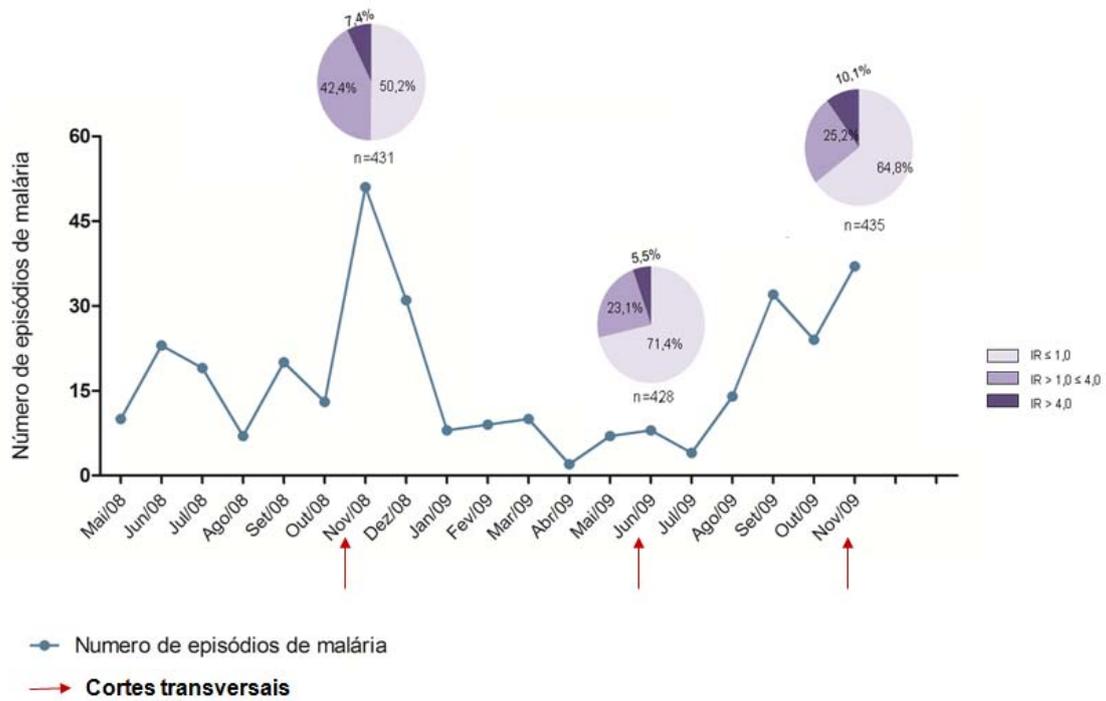
<sup>b</sup> Número total de indivíduos infectados pelo *P. vivax*, detectado pela microscopia, PCR em tempo real e/ou pelo sistema de vigilância em malária (SIVEP)

<sup>c</sup> O risco relativo foi calculado em relação ao genótipo *FY\*A/FY\*B* usado como referência

#### 5.4.1.2 Polimorfismos de *DARC* e a resposta de anticorpos ao *P. vivax*

Em um segundo momento, avaliou-se a resposta de anticorpos anti-PvDBP, detectados no ELISA, nos 3 cortes transversais. Como ilustrado na Figura 13, após o primeiro corte (linha de base), observou-se uma redução na frequência de resposta de anticorpos. Esta redução ocorreu em ambos os cortes transversais subsequentes (6 meses e 12 meses) Este perfil de resposta coincidiu com o período de baixa transmissão de malária, caracterizado aqui pela redução do número de casos de malária. De importância, esta queda de anticorpos no ELISA se manteve o mesmo independente do genótipo de *DARC* (Figura 14).

Figura 13. Resposta de anticorpos anti-PvDBP (ELISA) ao longo do estudo em relação ao



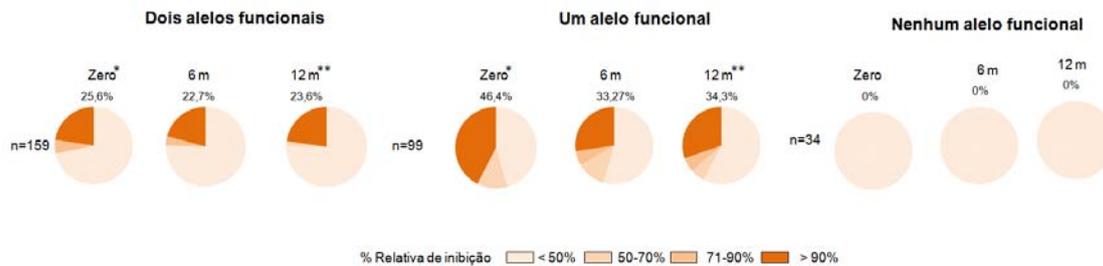
número de casos de malária na região estudada. As setas indicam os meses em que foram realizadas as coletas de sangue para obtenção do plasma; e o gráfico em linha indica o número de casos de malária na população. Os gráficos de pizza indicam a resposta de anticorpos anti-PvDBP. IR= índice de reatividade do ELISA, sendo os resultados positivos IR>1



**Figura 14.** Resposta de anticorpos contra a PvDBP, detectados pelo ELISA em função do número de alelos funcionais de *DARC*. Estão representadas as frequências de anticorpos anti-PvDBP dos indivíduos incluídos no estudo ao longo da coorte (zero, 6 e 12 meses). Dois alelos funcionais (genótipos  $FY^*A/FY^*A$ ,  $FY^*B/FY^*B$  e  $FY^*A/FY^*B$ ), 1 alelo funcional (genótipo  $FY^*B/FY^*B^{ES}$  e  $FY^*A/FY^*B^{ES}$ ) ou nenhum alelo funcional (*DARC* negativos, genótipo  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$ ). Os resultados estão representados pela frequência de respondedores, sendo o índice de reatividade  $> 1$  considerado como positivo

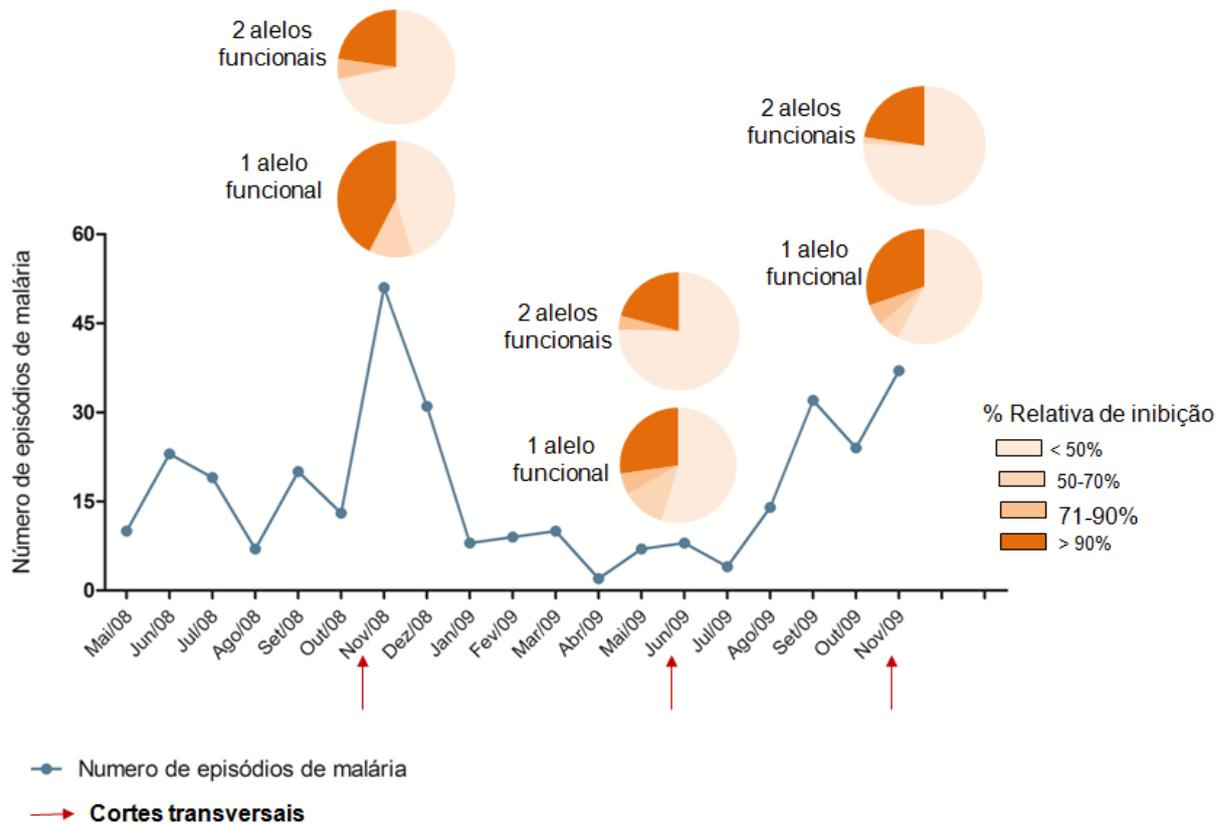
### 5.2.1.3 Influência dos polimorfismos de *DARC* na resposta de anticorpos inibitórios

Durante o estudo prospectivo, avaliou-se a influência do genótipo do receptor *DARC* na resposta de anticorpos bloqueadores da interação PvDBP-*DARC*. Devido à complexidade da realização dos ensaios inibitórios, o que inviabilizaria a realização destes com todas as amostras estudadas, optou-se por selecionar uma amostra representativa da população de estudo. Para isso, selecionou-se 86 indivíduos pertencentes a diferentes genótipos de *DARC* ( $FY^*A/FY^*A$ ,  $FY^*A/FY^*BES$ ,  $FY^*B/FY^*B$ ,  $FY^*B/FY^*BES$  e  $FY^*A/FY^*B$ ). Isto correspondeu a cerca de 17 indivíduos por genótipo, sendo que os mesmos foram pareados de acordo com as variáveis que poderiam influenciar na resposta de anticorpos, tais como idade, sexo, exposição à malária e local de residência (variáveis de confusão). Além disso, todos os indivíduos selecionados tinham resposta de anticorpos detectados na sorologia convencional. Como o número de indivíduos *DARC* negativos foi muito pequeno, foram incluídas no estudo, todas as amostras de plasma referentes a estes indivíduos ( $n = 17$ ). Os resultados dos cortes transversais confirmaram os dados obtidos na linha de base, isto é, uma menor frequência de resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP em indivíduos correspondentes a 2 alelos funcionais de *DARC* (teste do qui-quadrado com correção de Yates,  $p = 0,0012$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Resposta de anticorpos inibitórios contra a PvDBP em função do número de alelos funcionais de *DARC*. Estão representadas as frequências de anticorpos inibitórios anti-PvDBP em indivíduos incluídos no estudo ao longo da coorte (zero, 6 e 12 meses). Dois alelos funcionais (genótipos  $FY^*A/FY^*A$ ,  $FY^*B/FY^*B$  e  $FY^*A/FY^*B$ ), 1 alelo funcional (genótipo  $FY^*B/FY^*B^{ES}$  e  $FY^*A/FY^*B^{ES}$ ) ou nenhum alelo funcional (*DARC* negativos, genótipo  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$ ). Os símbolos \* e \*\* significam que houve significância estatística verificada pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates, considerando um nível de 5% de significância

O presente estudo permitiu avaliar ainda, a estabilidade da resposta de anticorpos inibitórios ao longo dos 12 meses do estudo. Assim, foi possível demonstrar que a frequência de respondedores se manteve estável ao longo do tempo, e, portanto, o número de casos de malária e a sazonalidade da transmissão na área estudada parecem não ter afetado esta resposta (Figura 16).



**Figura 16.** Representação da resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP ao longo do estudo em relação ao número de casos de malária na região estudada. As setas indicam os meses em que foram realizadas as coletas de sangue para obtenção do plasma. O Gráfico em linha indica o número de casos de malária registrados na região. Os gráficos de pizza indicam a resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP onde os diferentes tons indicam a % relativa de inibição, como representado na legenda

## 6 DISCUSSÃO

Em geral, as populações que vivem na Amazônia brasileira são consideradas susceptíveis a malária, embora possuam diferentes níveis de imunidade adquirida (Silva-Nunes et al., 2008; Ladeia-Andrade et al., 2009). Com relação aos anticorpos anti-PvDBP, vários estudos, realizados tanto em regiões altamente endêmicas (Michon et al., 2000; King et al., 2008) quanto em áreas de média e baixa endemicidade (Cerávolo et al., 2005; Cerávolo et al., 2008; Souza-Silva et al., 2010), têm demonstrado que uma parte significativa da população exposta ao *P. vivax* não desenvolve estes anticorpos. Vários fatores podem contribuir para baixa resposta contra a PvDBP, sendo os mais estudados, as variáveis ligadas ao parasito, tais como, a baixa imunogenicidade e/ou limitada exposição da PvDBP ao sistema imune e polimorfismos genéticos da proteína (Sousa-Silva et al., 2010; Sousa et al., 2011). Contudo, fatores genéticos do hospedeiro também podem contribuir para essa diferença na resposta imune contra a PvDBP. Dentre estes fatores, os polimorfismos no *DARC* são candidatos potenciais que poderiam influenciar nesta resposta imune; particularmente, porque a invasão dos eritrócitos por este parasito é altamente dependente deste antígeno.

A distribuição dos genótipos do *DARC* na população estudada, Rio Pardo/AM, foi consistente com a heterogeneidade da origem étnica da população amazônica brasileira, com uma mistura de nativos americanos (ameríndios), europeus e africanos (Perna et al., 2007; Palha et al., 2010). No presente estudo, o genótipo *FY\*A/FY\*B* foi o mais frequente. De fato, este genótipo tem sido descrito como o mais frequente na maior parte dos estudos realizados na Amazônia brasileira (Anexo 1). Como esperado, o genótipo  $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$ , que caracteriza o fenótipo *DARC* negativo, estava frequente na população estudada, porém em baixa proporção. Esse achado é consistente com o que tem sido descrito para a população da Amazônia brasileira, e difere apenas do estudo realizado por Perna e colaboradores (2007), em comunidades descendentes de escravos africanos, onde a maior parte dos indivíduos carrega o genótipo negativo (Anexo 1). Com

relação a América Latina, apenas dois estudos foram realizados a fim de descrever a distribuição do genótipo de *DARC* nesta região. Nestes estudos, realizados na Argentina e na Colômbia, a distribuição do genótipo *DARC* foi heterogênea e consistente com perfil histórico de colonização dessas regiões. Na Argentina, o genótipo  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  estava ausente, enquanto na Colômbia o genótipo  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  foi o mais frequente. Esse fenômeno corrobora com o *background* genético dessas populações onde os argentinos possuem componentes genéticos principalmente de europeus, já os colombianos (Costa pacífica) carregam componentes genéticos ligados a população africana (Michon et al., 1998). De fato, estudos da distribuição geográfica mundial do receptor *DARC*, demonstram que o alelo negativo tem origem no continente africano, já o alelo positivo de *DARC* tem origem no continente europeu e americano (Howes et al., 2011). Em resumo, o presente estudo avaliou a distribuição de *DARC* em uma população da Amazônia brasileira, e esta distribuição foi consistente com outros estudos realizados em regiões semelhantes. Além disso, este estudo corrobora com os estudos de distribuição mundial deste receptor que caracteriza as Américas e a Europa com a presença principalmente dos genótipos positivos de *DARC* e o continente Africano com a presença principalmente de alelos negativos de *DARC*.

O receptor *DARC* influencia na distribuição geográfica da malária causada pelo *P. vivax*, já que indivíduos que não expressam este receptor são altamente resistentes a malária vivax. De fato, na África, por exemplo, a prevalência e a incidência de infecção pelo *P. vivax* é muito pequena, coincidindo com a alta frequência do genótipo negativo do receptor *DARC* (Battle et al., 2012). Diante disso, no presente estudo, avaliou-se a prevalência e incidência da malária vivax em relação aos genótipos de *DARC*. Baseado na prevalência, bem como na incidência de infecção pelo *P. vivax* na comunidade de Rio Pardo/AM, no presente estudo, não foi possível identificar associação entre os genótipos de *DARC* e a proteção contra a infecção por este parasito. Estes resultados diferem daqueles descritos por King e colaboradores (2011), onde indivíduos carreadores do alelo *FY\*B* apresentaram um maior risco de infecção pelo *P. vivax*,

enquanto naqueles carreadores do alelo *FY\*A* o risco estava diminuído. As razões para esta diferença não estão claras, entretanto, no estudo de King e colaboradores (2011) os indivíduos possuíam altas parasitemias (gota espessa positiva) (Ferreira MU, informação pessoal), enquanto no presente estudo foram incluídos uma proporção significativa de indivíduos com baixas parasitemias (PCR positiva e gota-espessa negativa). Portanto, os resultados aqui apresentados não descartam o efeito de que o receptor *DARC* possa proteger contra elevadas parasitemias. Vale ressaltar que este estudo concorda com os resultados recentes descritos por Carvalho e colaboradores (2012) que não encontraram diferença na prevalência de infecção malárica entre indivíduos *DARC* positivos e *DARC* negativos. Portanto, a influência de *DARC* na susceptibilidade a infecção pelo *P. vivax* não está completamente resolvida. Como a maior parte dos estudos avaliaram apenas a prevalência de malária, fazem-se necessários mais estudos de incidência a fim de esclarecer melhor esta questão.

No estudo de Carvalho e colaboradores (2012), dois indivíduos portadores do genótipo *FY\*B<sup>ES</sup>/FY\*B<sup>ES</sup>* foram diagnosticados positivos para infecção pelo *P. vivax*. De fato, a presença de indivíduos *DARC* negativos infectados com *P. vivax* já tinha sido descrito no Brasil (Cavasini et al., 2007). Contudo, no presente estudo nenhum indivíduo *DARC* negativo estava infectado pelo *P. vivax*.

A PvDBP é o ligante do parasito responsável pela interação com o receptor *DARC* dos eritrócitos. Devido à importância funcional desta proteína e o fato de que a associação entre a expressão de *DARC* e resposta imune ser pouco explorada (Herrera et al., 2005; Maestre et al., 2010), avaliou-se aqui a influência do genótipo de *DARC* na resposta de anticorpos anti-PvDBP. O trabalho foi possível graças a um estudo inicial do nosso grupo que caracterizou a população de Rio Pardo/AM quando a aspectos epidemiológicos e de infecção malárica (Kano et al., 2012). Diante disso, o presente estudo acompanhou esta população por doze meses. Na linha de base do indivíduo, como descrito por Kano e colaboradores (2012), cerca de 50% dos indivíduos apresentaram anticorpos anti-PvDBP e esta resposta estava fortemente relacionada ao

local de moradia dos indivíduos. No entanto, no presente estudo, avaliou-se também a resposta desses anticorpos durante os doze meses subsequentes e, como esperado, esta resposta flutuou ao longo do estudo. Isto pode ser explicado pela variação anual de incidência de chuva na região de estudo, que sabidamente influencia nos níveis de transmissão de malária, já que aumenta a formação de criadouros do mosquito vetor (Galardo et al., 2009).

Em relação aos anticorpos detectados no ELISA, a frequência e os níveis de anticorpos anti-PvDBP foram similares nos indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos de *DARC*. Até o momento, um único estudo sugeriu que indivíduos que apresentam apenas um alelo funcional de *DARC* teriam uma maior frequência de anticorpos anti-PvDBP (Maestre et al., 2010). Entretanto, este estudo foi conduzido em uma região onde a população é, em sua grande maioria, afro-descendentes, portanto, altamente resistentes ao *P. vivax* (*DARC* negativos). Além disso, naquele estudo, um número muito pequeno de indivíduos responderam à PvDBP (17 de 233 indivíduos); conseqüentemente, 17 indivíduos respondedores foram estratificados em 5 genótipos de *DARC*, o que resultou em um ou dois indivíduos distribuídos em cada grupo e, portanto, a análise estatística tornou-se pouco robusta e inconclusiva.

De relevância, no presente estudo observou-se uma alta frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP em indivíduos com o genótipo  $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$ . De fato, o trabalho conduzido por Herrera e colaboradores (2005) também verificou elevada frequência de indivíduos *DARC* negativos respondedores à PvDBP. Até o momento, não existe uma explicação para o fato de indivíduos *DARC* negativos responderem à PvDBP. Entretanto, Herrera e colaboradores (2005) sugerem que independente do genótipo de *DARC* dos indivíduos, eles estão expostos à infecção por esporozoítos desenvolvendo, portanto, a fase pré-eritrocítica do ciclo da malária. Desta forma, alguns merozoítos poderiam alcançar a corrente sanguínea. Portanto, é possível especular que alguns indivíduos *DARC* negativos desenvolvem o ciclo eritrocítico da doença embora em baixas parasitemias (parasitemia subpatente). Nestes casos, o processo de invasão dos

eritrócitos pelo merozoíto permanece desconhecido e, esta segunda rota utilizada pelo *P. vivax* pode ser também dependente da PvDBP.

Apesar da importância da PvDBP como um antígeno candidato a vacina antimalárica, estudos de resposta imune funcional em populações humanas ainda são escassos. Parte da dificuldade se deve a complexidade da realização de ensaios inibitórios, e a necessidade de quantidade significativa de plasma dos indivíduos. Neste contexto, este estudo é o primeiro que avalia a influência do receptor *DARC* na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP. Aqui, foi possível demonstrar uma menor frequência desses anticorpos em indivíduos carreadores de dois alelos funcionais de *DARC*. Estes achados são importantes, já que este é o primeiro estudo que avalia o papel funcional do *DARC* na resposta imune bloqueadora. Entretanto, as razões para esta diferença de frequências de resposta ainda são desconhecidas. Já se sabe que indivíduos que expressam um alelo funcional de *DARC* possui uma menor expressão deste receptor na superfície dos eritrócitos (Woolley et al., 2000; Yazdanbakhsh et al., 2000; Zimmerman et al., 1999). Desta forma, é possível que nestes indivíduos o parasito tenha dificuldade de interagir com o receptor *DARC* tornando a PvDBP mais exposta. Portanto, isso poderia possibilitar a produção de uma maior quantidade de anticorpos. Este fenômeno poderá ser melhor estudado com o desenvolvimento do cultivo *in vitro* do *P. vivax*.

A maioria dos estudos relacionados a resposta imune anti-PvDBP são realizados em áreas altamente endêmicas e, desta forma, avaliar a persistência de anticorpos contra essa proteína na ausência de nova infecção torna-se difícil. Em um estudo realizado pelo nosso grupo em uma área não endêmica, em um pequeno foco de transmissão autóctone de *P. vivax*, demonstrou que os anticorpos contra a PvDBP são de vida curta (Cerávolo et al., 2009). No presente estudo não foi diferente, os níveis de anticorpos IgG anti-PvDBP (detectados no ELISA) acompanharam a variação da transmissão de malária na região. Por outro lado, verificou-se no presente trabalho que o perfil de resposta de anticorpos inibitórios foi estável ao longo dos 12 meses de acompanhamento, independentemente

de o indivíduo possuir um ou dois alelos funcionais de *DARC*. Assim, apesar de poucos indivíduos serem capazes de desenvolver anticorpos bloqueadores da interação PvDBP-*DARC*, essa resposta uma vez adquirida, permanece estável ao longo do tempo, independentemente do genótipo do receptor *DARC*. Estes achados são relevantes do ponto de vista do desenvolvimento de uma vacina, já que a estabilidade da resposta imune é altamente desejada em ensaios vacinais. O grande desafio será identificar o(s) fator(s) responsáveis pelo desenvolvimento desta imunidade específica.

## 7 CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível concluir que:

- 1) Não houve associação entre os genótipos de *DARC* e a infecção pelo *P. vivax*.
- 2) O genótipo *DARC* não influencia na resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP ou anti-MSP1<sub>19</sub>. Independente do genótipo de *DARC*, a resposta desses anticorpos variou influenciada pela sazonalidade da transmissão de malária na região,
- 3) O genótipo de *DARC* influencia na resposta de anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor. Independente do genótipo de *DARC* a resposta desses anticorpos se mantém estável por, pelo menos, doze meses.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, Miller LH. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*. 1990 Oct 5;63(1):141-53.

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 U S A*. 1992 Aug 1;89(15):7085-9.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):220-4.

Albuquerque SR, Cavalcante Fde O, Sanguino EC, Tezza L, Chacon F, Castilho L, dos Santos MC. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitol Res*. 2010 Apr;106(5):1049-53. Barnwell J and Wertheimer S. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog Clin Biol Res*. 1989;313:1-11. Review.

Barnwell JW, Galinski MR. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In: IW Sherman, *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington DC: ASM Press: 1998. Cap.7. P. 93-120.

Battle KE, Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Sinka ME, Howes RE, Guerra CA, Price RN, Baird KJ, Hay SI. The global public health significance of *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2012;80:1-111.

Baton LA, Ranford-Cartwright LC. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitology*. 2004 Dec;129(Pt 6):663-76.

Carvalho TA, Queiroz MG, Cardoso GL, Diniz IG, Silva AN, Pinto AY, Guerreiro JF. *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malar J*. 2012 Dec 22;11:430.

Cavasini CE, Tarelho Pereira FJ, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU. Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon.

Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J*. 2007 Dec 19;6:167.

Cerávolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, Krettli AU, Adams JH, Carvalho LH. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jun;72(6):675-81.

Ceravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJ, Braga EM, Madureira AP, Krettli AU, Souza JM, Brito CF, Adams JH, Carvalho LH. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol.* 2008 Mar;67(3):270-8.

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 Feb 1;85(3):615-21.

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 Aug 1;180(2):497-506.

Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med.* 1996 Oct 1;184(4):1531-6.

Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol.* 2008 Jan;24(1):29-34.

Chootong P, Ntumngia FB, VanBuskirk KM, Xainli J, Cole-Tobian JL, Campbell CO, Fraser TS, King CL, Adams JH. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infect Immun.* 2010 Mar;78(3):1089-95

Cotorruelo CM, Fiori SV, Borrás SE, Racca LL, Biondi CS, Racca AL. Distribution of the FYBES and RHCE\*ce(733C>G) alleles in an Argentinean population: implications for transfusion medicine. *BMC Med Genet.* 2008 May 6;9:40.

Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):755-66. Review.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):165-71.

Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT, Rayner JC, Wright GJ. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2011 Nov 9;480(7378):534-7.

de Castro MC, Monte-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2452-7.

Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Jan;44(1):125-32.

Fraser T, Michon P, Barnwell JW, Noe AR, Al-Yaman F, Kaslow DC, Adams JH. Expression and serologic activity of a soluble recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein. *Infect Immun*. 1997 Jul;65(7):2772-7.

Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW. A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites. *Cell*. 1992 Jun 26;69(7):1213-26.

Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites. *Int J Parasitol*. 2004 Dec;34(13-14):1413-29. Review.

Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Müller I. Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008 Jun 17;5(6):e127.

Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *Lancet*. 2005 Apr 23-29;365(9469):1487-98. Review.

Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol*. 2006 Aug;22(8):353-8. Epub 2006 Jun 23. Review.

Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3077-91. Review.

Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp*. 1999. Ser., 41, 95-98.

Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW. Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum malaria in 2007. *PLoS Med*. 2010 Jun 15;7(6):e1000290.

Herrera S, Gómez A, Vera O, Vergara J, Valderrama-Aguirre A, Maestre A, Méndez F, Wang R, Chitnis CE, Yazdani SS, Arévalo-Herrera M. Antibody response to Plasmodium vivax antigens in Fy-negative individuals from the Colombian Pacific coast. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Nov;73(5 Suppl):44-9.

Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, Zimmerman PA, Barnadas C, Beall CM, Gebremedhin A, Ménard D, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun*. 2011;2:266.

Huang X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*. 1992 Sep;14(1):18-25.

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 Feb 1;85(3):622-6.

Kano FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, Nogueira PA, Gonçalves AQ, Fontes CJ, Soares IS, Brito CF, Rocha RS, Carvalho LH. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. Trop Med Int Health. 2012 Aug;17(8):989-1000.

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 Mar 28;2(3):e336.

King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, Cole-Tobian JL, Mueller I, Chitnis CE. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 17;105(24):8363-8.

King CL, Adams JH, Xianli J, Grimberg BT, McHenry AM, Greenberg LJ, Siddiqui A, Howes RE, da Silva-Nunes M, Ferreira MU, Zimmerman PA. Fy(a)/Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to Plasmodium vivax malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 13;108(50):20113-8.

Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(1):1-11.

Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2009 Mar;80(3):452-9.

Maestre A, Muskus C, Duque V, Agudelo O, Liu P, Takagi A, Ntumngia FB, Adams JH, Sim KL, Hoffman SL, Corradin G, Velez ID, Wang R. Acquired antibody responses against Plasmodium vivax infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (*DARC*). PLoS One. 2010 Jul 15;5(7):e11437.

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 Aug;90(4):823-9.

Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, Peterson LR, Kaul KL. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. J Clin Microbiol. 2005 May;43(5):2435-40.

Marques AC. Migration and dissemination of malaria in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986 81(2): 17-30.

Martinez P, Lopez C, Saravia C, Vanegas M, Patarroyo MA. Evaluation of the antigenicity of universal epitopes from PvDBPII in individuals exposed to Plasmodium vivax malaria. Microbes Infect. 2010 Dec;12(14-15):1188-97.

McHenry AM, Adams JH. The crystal structure of *P. knowlesi* DBPalpha DBL domain and its implications for immune evasion. *Trends Biochem Sci.* 2006 Sep;31(9):487-91.

McMorrán BJ, Wiczorski L, Drysdale KE, Chan JA, Huang HM, Smith C, Mitiku C, Beeson JG, Burgio G, Foote SJ. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science.* 2012 Dec 7;338(6112):1348-51.

Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbaoa A, Thonier V, Carod JF, Domarle O, Colin Y, Bertrand O, Picot J, King CL, Grimberg BT, Mercereau-Puijalon O, Zimmerman PA. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 30;107(13):5967-71.

Michon PA, Arevalo-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 Oct;59(4):597-9.

Michon P, Fraser T, Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3164-71.

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 Apr 20;495(1-2):111-4.

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 Aug 5;295(6):302-4.

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 2001 Jan 5;291(5501):141-4.

Mota MM, Hafalla JC, Rodríguez A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1318-22. Epub 2002 Oct 15. Erratum in: *Nat Med.* 2003 Jan;9(1):146.

Mota MM, Rodríguez A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell Microbiol.* 2004 Dec;6(12):1113-8. Review.

Moore S, Woodrow CF, McClelland DB. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy. *Nature.* 1982 Feb 11;295(5849):529-31.

Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion.* 1998 Feb;38(2):168-73.

Ong CW, Lee SY, Koh WH, Ooi EE, Tambyah PA. Monkey malaria in humans: a diagnostic dilemma with conflicting laboratory data. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Jun;80(6):927-8.

Palha Tde J, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos A, Guerreiro JF, de Moura LS, Santos S. Male ancestry structure and interethnic admixture in African-descent communities from the Amazon as revealed by Y-chromosome Strs. *Am J Phys Anthropol.* 2011 Mar;144(3):471-8.

Staying the Course? Malaria Research and Development in a Time of Economic Uncertainty. 2011 PATH.

Palha Tde J, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos A, Guerreiro JF, de Moura LS, Santos S. Male ancestry structure and interethnic admixture in African-descent communities from the Amazon as revealed by Y-chromosome Strs. *Am J Phys Anthropol.* 2011 Mar;144(3):471-8.

Perna SJ, Cardoso GL, Guerreiro JF. Duffy blood group genotypes among African-Brazilian communities of the Amazon region. *Genet Mol Res.* 2007 Mar 29;6(1):166-72.

Persson KE. Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop.* 2010 Jun;114(3):138-43.

Pradel G, Frevert U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology.* 2001 May;33(5):1154-65.

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 U S A.* 1999 Nov 23;96(24):14067-72.

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 Oct;75(4):575-81.

Saravia C, Martinez P, Granados DS, Lopez C, Reyes C, Patarroyo MA. Identification and evaluation of universal epitopes in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 26;377(4):1279-83.

Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2007.

Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2008.

Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2012.

Smolarek D, Bertrand O, Czerwinski M, Colin Y, Etchebest C, de Brevern AG. Multiple interests in structural models of *DARC* transmembrane protein. *Transfus Clin Biol.* 2010 Sep;17(3):184-96.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Apr;58(2):283-92.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2005 Mar 10;434(7030):214-7.

Sousa TN, Sanchez BA, Cerávolo IP, Carvalho LH, Brito CF. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. *Vox Sang.* 2007 May;92(4):373-80.

Sousa TN, Tarazona-Santos EM, Wilson DJ, Madureira AP, Falcão PR, Fontes CJ, Gil LH, Ferreira MU, Carvalho LH, Brito CF. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J.* 2010 Nov 22;9:334.

Nóbrega de Sousa T, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. *PLoS One.* 2011;6(8):e22944.

Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA, Ceravolo IP, Malafronte RS, Brito CF, Ferreira MU, Carvalho LH. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Feb;82(2):185-93.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.

Tatem AJ, Smith DL. International population movements and regional *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 6;107(27):12222-7.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 2008 Jun 17;5(6):e128.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

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 Jun;10(2):224-8.

Tournamille C, Filipe A, Wasniowska K, Gane P, Lisowska E, Cartron JP, Colin Y, Le Van Kim C. Structure-function analysis of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of antibody and chemokine binding sites. *Br J Haematol.* 2003 Sep;122(6):1014-23.

Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Blanchard D, Proudfoot AE, Cartron JP, Colin Y. Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27;272(26):16274-80.

Tournamille C, Filipe A, Badaut C, Riottot MM, Longacre S, Cartron JP, Le Van Kim C, Colin Y. Fine mapping of the Duffy antigen binding site for the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 Nov;144(1):100-3.

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.* 2004 Nov 1;190(9):1556-62..

Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol.* 2004 Jul;6(7):671-85.

Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev.* 2006 Aug;16(4):384-91.

Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol.* 1989 Nov;69(4):340-50.

White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):172-3.

WHO. World Malaria Report 2012, Geneva, World Health Organization.

Woolley IJ, Hotmire KA, Sramkoski RM, Zimmerman PA, Kazura JW. Differential expression of the duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion.* 2000 Aug;40(8):949-53.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* 2007 May;9(5):1215-22. Epub 2007 Jan 9. Erratum in: *Cell Microbiol.* 2007 Aug;9(8):2093.

Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens. *Transfusion.* 2000 Mar;40(3):310-20.

Zieler H, Dvorak JA. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11516-21.

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 U S A. 1999 Nov 23;96(24):13973-7.

## 9 ANEXO

Anexo 1 – Distribuição dos genótipos de *DARC* em diferentes regiões da América Latina

Autor (nº amostral)	Região	Genótipo <i>DARC</i> n(%)					
		FY*A / FY*B	FY*A / FY*A	FY*A / FY*B <sup>ES</sup>	FY*B / FY*B	FY*B / FY*B <sup>ES</sup>	FY*B <sup>ES</sup> / FY*B <sup>ES</sup>
Cavasini et al., 2001 n= 118	RO/Brasil	27 (21,3)	31 (24,4)	13 (10,2)	29 (22,8)	20 (15,7)	7 (5,6)
Cotorruelo et al., 2008 n=206	Rosário/ Argentina	80 (39)	60 (29,1)	9 (4,4)	51 (24,7)	6 (2,8)	0
Cavasini et al., 2007 n=622	AP, PA, RO e AC/ Brasil	199 (32,1)	94 (15,1)	96 (15,4)	117 (18,8)	96 (15,4)	20 (3,2)
Perna et al., 2007 n=95	AM/Brasil	6(6,3)	9(9,5)	25 (26,3)	1 (1,1)	12 (12,6)	42 (44,2)
Maestre et al., 2010 n=233	Turbo, Apartado/ Colômbia	52 (22,3)	21 (9,0)	30 (12,8)	34 (14,6)	36 (15,5)	60 (25,8)
Albuquerque et al., 2010 n=500	AM/Brasil	201(40,4)	139 (28,0)	36 (7,2)	80 (16,1)	32 (1,6)	-
King et al., 2011 n=390	AC/Brasil	140 (35,0)	52 (13,0)	35 (8,8)	87 (21,8)	76 (19,0)	-
Carvalho et. al., 2012 n=678	PA/Brasil	191 (28,2)	173 (25,5)	105 (15,5)	94 (13,9)	86 (12,7)	29 (4,3)
Torres, 2013 n=690	AM/Brasil	204 (29,6)	160 (23,2)	139 (20,1)	93 (13,5)	73 (10,6)	21 (3,0)

AM: Amazonas; RO: Rondônia; AP: Amapá; PA: Pará; AC: Acre, que correspondem aos estados brasileiros.