VANESSA CRISTINA NICOLETE

**POLIMORFISMO NO GRUPO SANGUÍNEO DUFFY E ANTICORPOS IgG
NATURALMENTE ADQUIRIDOS CONTRA A PROTEÍNA DE LIGAÇÃO EM
DUFFY DE *Plasmodium vivax* (PvDBP) NA AMAZÔNIA RURAL BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação na Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

VANESSA CRISTINA NICOLETE

**POLIMORFISMO NO GRUPO SANGUÍNEO DUFFY E ANTICORPOS IgG
NATURALMENTE ADQUIRIDOS CONTRA A PROTEÍNA DE LIGAÇÃO EM
DUFFY DE *Plasmodium vivax* (PvDBP) NA AMAZÔNIA RURAL BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação na Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Area de concentração: Biologia da Relação Patógeno- Hospedeiro

Orientador: Profº Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão corrigida. A versão original digital encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB, quanto na biblioteca digital da USP.

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Nicolete, Vanessa Cristina.

Polimorfismo no grupo sanguíneo Duffy e anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a proteína de ligação em Duffy de *Plasmodium vivax* (PvDBP) na Amazônia rural brasileira / Vanessa Cristina Nicolete. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Resposta imunológica contra antígenos de *Plasmodium vivax*.

Versão do título para o inglês: Duffy blood group polymorphism and naturally acquired IgG antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) in rural Amazonians.

1. Imunologia 2. Doenças parasitárias 3. Malária 4. *Plasmodium* 5. ELISA 6. Genótipos I. Ferreira, Prof. Dr. Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0176/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Cristina Nicolete.

Título da Dissertação: Polimorfismo no grupo sanguíneo Duffy e anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a proteína de ligação em Duffy de *Plasmodium vivax* (PvDBP) na Amazônia rural Brasileira.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8406
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 05 de outubro de 2010.

PARECER 962/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 21.09.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Polimorfismo no grupo sanguíneo Duffy, anticorpos contra a proteína de ligação em Duffy de Plasmodium vivax (PvDBP) e risco de malária vivax na Amazônia brasileira*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **MARCELO URBANO FERREIRA** e aluna **VANESSA CRISTINA NICOLETE**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
21.09.2011

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M. A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*Ao meu pai, **Jair Nicolete** e minha mãe,
Marli Nicolete, por todo apoio, carinho,
amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos meus queridos pais **Jair e Marli Nicolete**, pelo apoio incondicional em todas as decisões que tomei até hoje. Sem vocês esse sonho não seria realizado! Nunca viverei o suficiente para agradecê-los. Peço desculpas às minhas constantes ausências como filha e agradeço imensamente a colaboração do casal da minha vida. Amo vocês!*

*Ao **Dr. Marcelo Urbano Ferreira**, pela orientação, discussões, a troca de artigos e pela oportunidade de conhecer a Amazônia Brasileira. Vivenciar a malária em campo e ter contato com um povo tão sofrido, vivido e hospitaleiro, foi uma experiência muito marcante. E incrível!*

À todos que forneceram as amostras do estudo: a população do Ramal do Remansinho, Ramal dos Goianos, Ramal da Castanheira, Ramal da Linha 1 e Ramal dos Seringueiros. Agradeço pelos momentos enriquecedores e pela confiança depositada.

*À **Luzia Helena Carvalho**, do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz, MG) pelo fornecimento de uma das variantes da proteína recombinante utilizada no estudo e a genotipagem Duffy. Às suas alunas **Flávia Alessandra Souza-Silva** e **Letícia Torres** pelo total apoio oferecido.*

*Ao **Christopher L. King**, do Center for Global Health and Disease, da Case Western Reserve University (Cleveland, Ohio, Estados Unidos) pelo fornecimento das variantes de proteínas utilizadas no estudo.*

*Ao laboratório do **Professor Dr. Gherard Wunderlich**, do Departamento de Parasitologia – ICB/USP, pelo fornecimento de proteínas recombinantes e pelo constante apoio a cada dúvida.*

*Às técnicas do laboratório **Maria José Menezes (Zezé)** e **Melissa Bastos**. À querida **Zezé**, pela preocupação constante com nosso bem-estar, pelo apoio em nossas pesquisas, pela ajuda em técnicas e na discussão de nossos resultados. À **Melissa**, pela companhia e amizade até altas horas da noite dentro do laboratório. Pelo apoio incondicional, ajuda com técnicas, manuais, aparelhos e cálculos de concentração. Agradeço muito sua amizade, que conquistei dia após dia, ou melhor, noite após noite. Obrigada!*

Às queridas companheiras de laboratório **Priscila Thihara, Amanda Begosso, Bianca Chechetto, Nathália Lima, Michelle Brandi, Raquel Müller, Camilla Batista, Miluska Vargas**: obrigada pela mão e ombro amigos nos momentos que mais precisei. Pelas discussões sobre malária, pelos almoços e por toda atenção dispensada. **Priscila Thihara**: sua amizade se tornou extremamente necessária para minha vida. Obrigada pelas doces palavras de incentivo e por me deixar fazer parte da sua história. **Amandinha**, obrigada pelos momentos de alegria e descoberta vividos no Acre. Sem você essa experiência não teria sido a mesma!

Agradeço aos meus irmãos **André e Alexandre Nicolete**, minha cunhada **Adriana Bueno** e meus sobrinhos **Bruna, Matheus, Júlia e Izabella Nicolete**. À vocês todo o meu imenso agradecimento, pela força, incentivo e apoio. Aos meus amados sobrinhos, agradeço pela constante alegria que me recebiam, mesmo sem ter um contato constante. Obrigado pelos lanches fora de hora, cinemas e alegria que vocês sempre me transmitiram!

À **Ana Paula Alcade**, por me hospedar e abrir as portas de sua casa por um ano e meio em São Paulo. Obrigada pelo incentivo e força!

À **Karla Rocha**, com quem divido minha casa, por toda a amizade e compreensão nos momentos mais delicados de todo esse meu projeto. Obrigada pelo silêncio nas minhas horas de estudo, pela aceitação da minha bagunça organizada, meio a tantos artigos deixados pelos cantos da casa.

Às minhas amadas amigas **Priscila Cola, Débora Vicentini, Patricia Vallini, Mariana Gatto e Vanessa Pontes**, pela amizade de longos anos e todo o apoio dispensado a mim. Obrigada por cada momento de incentivo, cada final de semana de sorriso, cada mensagem trocada a qualquer hora do dia ou da noite, pelos telefonemas de preocupação, pelo apoio e admiração sempre presentes. Muito obrigada por fazerem parte da minha história!

Obrigada à minha eterna orientadora de iniciação científica, **Dra. Silvana Torossian Coradi**, por acreditar em mim e abrir as portas para o caminho da pós-graduação. Sinto muito orgulho de ter me tornado sua amiga!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

NICOLETE, V. C. **Polimorfismo no grupo sanguíneo Duffy e anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a proteína de ligação em Duffy de *Plasmodium vivax* (PvDBP) na Amazônia rural brasileira.** 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

No Brasil 99, 9% dos casos de malária são oriundos da região Amazônica e 90% deles são causados por *Plasmodium vivax*. Para invadir células-alvo, que são eritrócitos jovens conhecidos como reticulócitos, os merozoítos de *P. vivax* reconhecem receptores específicos na superfície das células do hospedeiro. Um dos mais importantes ligantes do parasito é a proteína de ligação em Duffy (PvDBP), expressa nos micronemas, que se liga especificamente a glicoproteínas da membrana do eritrócito, chamadas de grupo sanguíneo Duffy, conhecidas como antígenos receptores de quimiocinas (DARC). A interação entre o domínio II rico em cisteína de PvDBP e DARC é crucial para a invasão de células vermelhas e indivíduos DARC negativos são normalmente resistentes a infecção estágio sanguínea por *P. vivax*; portanto, PvDBP é um forte antígeno candidato a vacina. Aqui, nós investigamos respostas de anticorpos IgG contra três proteínas recombinantes derivadas de PvDBP e MSP1₁₉ (Fragmento 19 da Proteína 1 da superfície do merozoíto), em 343 indivíduos expostos a malária em uma região hipoendêmica da Amazônia brasileira. As proteínas recombinantes Sal I_{II-IV}-GST e Sal I_{II}-His contêm parte (tanto o domínio II a IV ou o domínio II, sozinho) da variante Sal I de PvDBP fusionada com cauda de GST ou de histidina, enquanto que O_{II}-His contêm o domínio II da variante PNG-O fusionada com cauda de histidina. As proteínas recombinantes Sal I_{II}-His e O_{II}-His (mas não Sal I_{II-IV}-GST) foram redobradas para reproduzir a conformação nativa de PvDBP. Anticorpos IgG capazes de reconhecer Sal I_{II}-His, O_{II}-His, Sal I_{II-IV}-GST e MSP1₁₉-GST foram encontrados em 43,7 %, 39,0%, 14,3% e 38,8% dos indivíduos, com uma forte correlação positiva entre níveis de anticorpos de Sal I_{II}-His e O_{II}-His, mas uma pobre correlação positiva entre níveis de anticorpos dessas proteínas redobradas e a não redobrada Sal I_{II-IV}-GST (que compartilha da mesma sequência do domínio II que Sal I_{II}-His) e MSP1₁₉-GST. A presença de infecção por *P. vivax* (detectada por microscopia ou PCR) e a exposição cumulativa a malária (determinada pelos anos de residência em área endêmica) foram significativamente associados com aumento de respostas de anticorpos. O genótipo Duffy FY*AFY*B e FY*B^{ES}FY*B^{ES} [DARC negativos] foram o mais e o menos frequente na população, respectivamente. Como esperado, indivíduos FY*B^{ES}FY*B^{ES} foram os que menos apresentaram anticorpos para PvDBP, porém encontramos proporções similares de respondedores entre indivíduos com genótipos FY*A*FY*A, FY*AFY*B^{ES}, FY*B*FY*B and FY*BFY*B^{ES}. A análise de sequências revelou muitas variantes da região II de PvDBP em 41 isolados de *P. vivax*. A mais comum delas (encontrada em 28,8% dos isolados), difere de Sal I e PNG- O em seis codons de aminoácidos (incluindo a mudança N417K, que previamente mostrou fazer parte de um haplótipo que altera a sensibilidade do anticorpo inibitório). Nenhuma variante do tipo Sal I, cujo um protótipo de vacina baseada em PvDBP atualmente está em teste clínico, foi encontrada nos parasitas locais.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium vivax*. Antígeno Duffy receptor para quimiocinas (DARC). Proteína de ligação em Duffy. Respostas de anticorpos.

ABSTRACT

NICOLETE, V. C. **Duffy blood group polymorphism and naturally acquired IgG antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) in rural Amazonians.** 2012. 96 p. Masters thesis (Biology of the Relation Pathogen-Host) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In Brazil 99, 9% of the reported cases of malaria originate from Amazon region and 90% of them are due to *Plasmodium vivax*. To invade their target cells, young erythrocytes known as reticulocytes, *P. vivax* merozoites recognize specific receptors on the host cell surface. One of the major parasite's ligands is the Duffy binding protein (PvDBP), expressed in micronemes, which binds specifically to a erythrocyte membrane glycoprotein known as Duffy blood group antigen/receptor for chemokines (DARC). Interaction between cysteine-rich domain II of PvDBP and DARC is crucial for red blood cell invasion and DARC-negative individuals are usually resistant to blood-stage infection with *P. vivax*; therefore, PvDBP is a major vaccine candidate antigen. Here, we investigated IgG antibody responses to three recombinant proteins derived from PvDBP and MSP1₁₉ (19 kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1 of the *P. vivax*), in 343 subjects exposed to hypoendemic malaria in the Amazon Basin of Brazil. Both recombinant proteins Sal I_{II-IV}-GST and Sal I_{II}-His contain part (either domains II to IV or domain II alone) of the Sal I variant of PvDBP fused to either GST or a histidine tail, while O_{II}-His contain the domain II of the PNG-O variant fused to a histidine tail; recombinant proteins Sal I_{II}-His and O_{II}-His (but not Sal I_{II-IV}-GST) were refolded to reproduce the native conformation of PvDBP. IgG antibodies to Sal I_{II}-His, O_{II}-His, Sal I_{II-IV}-GST and MSP1₁₉-GST were found in 43,7 %, 39,0%, 14,3% and 38,8% of the subjects, with a strong positive correlation between antibody levels to the Sal I_{II}-His and O_{II}-His but a poor positive correlation between levels of antibodies to these refolded proteins and non-refolded Sal I_{II-IV}-GST (which shares the same domain II sequence with Sal I_{II}-His) and MSP1₁₉-GST. Current *P. vivax* infection (as detected by microscopy or PCR) and cumulative exposure to malaria (as determined by the length of residence in endemic areas) were significantly associated with increased antibody responses. The Duffy genotypes FY*AFY*B and FY*B^{ES}FY*B^{ES} [DARC negative] were the most and least common genotypes, respectively. As expected, FY*B^{ES}FY*B^{ES} individuals were less likely to have antibodies to PvDBP, but we found similar proportions of seropositive subjects with the FY*A*FY*A, FY*AFY*B^{ES}, FY*B*FY*B and FY*BFY*B^{ES} genotypes. Sequence analysis revealed several region II PvDBP variants in 41 local *P. vivax* isolates. The most common of them (found in 28,8% isolates) differs from Sal I and PNG-O alleles in six amino acid codons (including N417K change, which has previously been shown to be part of a linked haplotype that alters PvDBP sensitivity to inhibitory antibody). No Sal I-type variant, from which a PvDBP-based vaccine prototype currently under clinical testing has been derived, was found in local parasites.

Keywords: Malaria. *Plasmodium vivax*. Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC). Duffy binding protein. Antibody responses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição das áreas sob risco de transmissão de malária no mundo, em 2010.....	21
Figura 2 – Distribuição de casos de malária confirmados nos municípios brasileiros. Os dados demonstrados são do ano de 2010 e os municípios foram estratificados de acordo com a transmissão de malária.....	22
Figura 3 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium vivax</i>	24
Figura 4 – Representação esquemática do gene <i>FY</i> do grupo sanguíneo Duffy, incluindo a região promotora e os dois éxons.....	26
Figura 5 – As figuras de a –c, correspondem a frequência global dos alelos <i>FY</i> *A, <i>FY</i> *B e <i>FY</i> *B ^{ES} , respectivamente.....	28
Figura 6 – Representação esquemática da PvDBP.....	34
Figura 7 – Ordem das proteínas envolvidas no processo de invasão do reticulócito por espécies de <i>Plasmodium</i>	35
Figura 8 – Localização do assentamento agrícola conhecido como Remansinho, a principal área de estudo, em relação ao município de Acrelândia (sede do laboratório de campo) e à rodovia BR 364, que liga Rio Branco e Acrelândia, no Acre, a Rondônia e ao restante do país.....	40
Figura 9 – Distribuição da localização dos domicílios de acordo com as coordenadas geográficas obtidas nos inquéritos.....	41
Figura 10 – Lista de sequências de oligonucleotídeos utilizados no PCR em Tempo Real da tipagem Duffy, segundo protocolo de Souza et al. (2007)	43
Figura 11 – Representação esquemática do gene <i>FY</i>	44

Figura 12 – Representação esquemática da proteína recombinante Sal I _{II-IV} -GST.....	45
Figura 13 – Diferenças entre aminoácidos das proteínas Sal I _{II} - His e O _{II} - His, nas respectivas posições dos códons da região II de PvDBP.....	46
Figura 14 – Esquema da disposição das amostras para teste de aderência.....	49
Figura 15 – Mix da reação e programa utilizados nas PCR.....	50
Figura 16 – Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na amplificação e sequenciamento da região II de PvDBP.....	51
Figura 17 – Mix da reação e programa utilizados no sequenciamento.....	51
Figura 18 – Correlação entre os índices de reatividades obtidos com diferentes pares de antígenos recombinantes.....	62
Figura 19 – Valores das absorbâncias da primeira microplaca do teste de aderência.....	70
Figura 20 – Valores da segunda microplaca de ELISA após a leitura das absorbâncias.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes Sal I _{II-IV} -GST e Sal I _{II} -His.....	57
Tabela 2 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes proteína Sal I _{II-IV} -GST e O _{II} -His.....	58
Tabela 3 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes proteína Sal I _{II-IV} -GST e MSP1 ₁₉ -GST.....	58
Tabela 4 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes proteína MSP1 ₁₉ -GST e Sal I _{II} -His.....	59
Tabela 5 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes proteína MSP1 ₁₉ -GST e O _{II} -His.....	60
Tabela 6 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes Sal I _{II} -His e O _{II} -His.....	60
Tabela 7 – Porcentagens (número absoluto entre parênteses) de indivíduos que possuem anticorpos contra as proteínas listadas, de acordo com o diagnóstico ou não de malária vivax.....	64
Tabela 8 – Porcentagens (número absoluto entre parênteses) de indivíduos que produziram respostas de anticorpos contra cada proteína recombinante, relacionados com o tempo de moradia na Amazônia.....	65
Tabela 9 – Prevalência de anticorpos adquiridos para PvDBP em amostras pareadas em relação à episódios de malária entre os cortes.....	66
Tabela 10 – Genótipo Duffy e frequência correspondente na população estudada.....	67

Tabela 11 – Respondedores para as proteínas analisadas de acordo com genótipo Duffy do indivíduo. As porcentagens (número absoluto entre parênteses) indicam dentro de cada genótipo quantos responderam a proteína em questão.....68

Tabela 12 – Haplótipos da região II de PvDBP de *Plasmodium vivax*, com seus respectivos polimorfismos identificados entre 66 isolados da região amazônica. Resíduos conservados são representados por ponto (.).....72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Adenina
aa - Aminoácido
Ala – Alanina
AMA-1 – Antígeno de membrana apical
Asp – Ácido Aspártico
C- Citosina
CD – dicroísmo circular
CpqRR – Centro de Pesquisas René Rachou
Cys – Cisteína
DARC – *Duffy antigen receptor for chemokines*
DBL – *Duffy binding-like proteins/ ligand*
DBP – *Duffy binding protein*
DTT - Ditioneitol
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTP - desorribonucleotídeo trifosfatado
EBL – *Erythrocyte binding-like proteins/ ligand*
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbant assay*
ES – *Erythrocyte silent*
Fy+ - Indivíduos com genótipo Duffy positivo
Fy- - Indivíduo com genótipo Duffy negativo
G - Guanidina
g – gravidade
GdnHCl – Hidroclorato de Guanidina
Gly – Glicina
GST – Glutathione S –transferase de *Schistosoma japonicum*
h - horas
His – Histidina
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
IFA – Ensaio de imunofluorescência
Ig - Imunoglobulina
IPTG - *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*
IR – Índice de Reatividade

LB – Meio Luria-Bertani

MG – Minas Gerais

ml – Mililitros

M - Molaridade

MS – Ministério da Saúde

MSP – Proteína de superfície de merozoíto

ng - nanogramas

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPS- Organização Pan- Americana de Saúde

pb – pares de bases

PBS – Solução de salina tamponada

PBS-T – Solução de salina tamponada acrescida de *Tween*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PMSF – *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

PNG – Papua Nova Guiné

PvDBP – *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*

PVDBPII – Região II da *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*

PvRBP – *Reticulocyte binding protein* de *Plasmodium vivax*

RBLs – *Reticulocyte binding-like*

Sal I – Salvador I

SIVEP – Sistema de vigilância epidemiológica

T - Timina

TM – Domínio transmembrana

TMB - Tetrametilbenzidina

WHO – World Health Organization

°C – Graus Celsius

P – Coeficiente de significância

μl – Microlitro

μg - Micrograma

ρ - Coeficiente de correlação de Spearman

χ^2 - Qui-quadrado

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Malária	20
1.2 Patogenia da doença	22
1.3 Ciclo do parasito	23
1.4 Polimorfismo no grupo sanguíneo Duffy	25
1.5 Processo de invasão eritrocitária pelos parasitos da malária	30
<i>1.5.1 Moléculas envolvidas no processo de invasão</i>	31
<i>1.5.1.1 PvRBP (Reticulocyte- Binding Proteins)</i>	31
<i>1.5.1.2 AMA-1 (Antígeno de Membrana Apical)</i>	32
<i>1.5.1.3 MSP1₁₉ (Fragmento 19 da Proteína 1 da superfície do merozoíto)</i>	32
<i>1.5.1.4 PvDBP (Duffy Binding Protein)</i>	33
1.6 Anticorpos anti-PvDBP	35
2 OBJETIVOS	38
3 METODOLOGIA	40
3.1 Área e população de estudo	40
3.2 Delineamento do estudo	42
3.3 Procedimentos laboratoriais	42
<i>3.3.1 Extração de DNA</i>	42
<i>3.3.2 Tipagem do grupo sanguíneo de Duffy</i>	43
<i>3.3.3 Construção da proteína Sal I_{II-IV}- GST</i>	44
<i>3.3.4 Construção das proteínas Sal I_{II}- His e O_{II}-His</i>	45
<i>3.3.5 Construção da proteína MSP1₁₉- GST</i>	46
<i>3.3.6 ELISA para detecção de anticorpos anti-PvDBP e anti-MSP1₁₉</i>	47
<i>3.3.7 Teste de aderência das proteínas nas micropilacas</i>	49
<i>3.3.8 Avaliação do polimorfismo da região II da PvDBP (DBPII) através de sequenciamento do DNA</i>	50
3.4 Análise estatística	52
3.5 Aspectos éticos	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Amostra analisada	55

4.2 Diagnóstico de malária.....	55
<i>4.2.1 Diagnóstico microscópico.....</i>	<i>55</i>
<i>4.2.2 Diagnóstico molecular.....</i>	<i>55</i>
4.3 Resposta de anticorpos contra PvDBP e MSP1₁₉- GST.....	56
<i>4.3.1 Concordância de respostas antígenos derivados de PvDBP e MSP1₁₉.....</i>	<i>56</i>
4.4 Respostas de anticorpos e malária atual.....	63
4.5 Resposta de anticorpos e exposição cumulativa à malária.....	64
4.6 Respostas de anticorpos em amostras consecutivas.....	65
4.7 Genótipos do grupo sanguíneo Duffy.....	66
4.8 Genótipos Duffy e resposta de anticorpos.....	67
4.9 Diagnóstico de infecção por <i>P. vivax</i> em indivíduo Duffy negativo.....	69
4.10 Teste de aderência das proteínas nas microplacas.....	70
4.11 Diversidade de sequências no domínio II de PvDBP.....	71
5 DISCUSSÃO.....	78
5.1 Diferenças conformacionais entre as proteínas utilizadas.....	78
5.2 Resposta populacional de anticorpos anti-PvDBP contra as variantes testadas.....	78
5.3 Respostas à PvDBP de acordo com o diagnóstico de malária vivax.....	79
5.4 Nível de respostas baseado no tempo de exposição em área endêmica.....	80
5.5 Resposta de anticorpos contra MSP-1₁₉.....	80
5.6 Frequência de genótipo Duffy.....	81
5.7 Respostas de anticorpos de acordo com genótipo Duffy.....	81
5.8 Polimorfismos na região II de PvDBP.....	83
6 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

Malária é uma doença parasitária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp.*, capazes de produzir quadros de doença febril aguda que podem ser caracterizados pelo acesso malárico clássico: calafrios, seguidos de picos febris de cerca de 40 °C e sudorese, podendo levar a fadiga e sono. Esses acessos maláricos podem perdurar por várias horas, ocorrendo com certa periodicidade, que coincide com a liberação de plasmódios no sangue pela ruptura de hemácias parasitadas (KARUNaweera et al., 1992).

Os acessos maláricos podem ocorrer a intervalos regulares de 48 h (febre terçã), ou em intervalos de 72 h (febre quartã) (BOYD, 1949) e essa periodicidade está relacionada com a espécie de plasmódio infectante e seu ciclo de vida.

As espécies de parasitos do gênero *Plasmodium*, capazes de infectar seres humanos são: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Dentre essas, destacam-se *P. falciparum* e *P. vivax*, a primeira com grande difusão no continente africano e a segunda amplamente distribuída pelo globo. A transmissão da doença está restrita às regiões de clima tropical e subtropical, sendo encontrada, portanto, na África subsaariana, no sudeste da Ásia e na América Latina. Estima-se que no ano de 2010, 81% dos casos registrados e 91% das mortes ocorreram em continente africano (WHO, 2011).

Em 2009, cerca de 2,85 bilhões de pessoas habitavam áreas de risco para malária vivax. Dessas, 91% ocupavam a área central e sudeste da Ásia, enquanto que 160 milhões, as Américas e 100 mil estavam distribuídas entre o continente Africano, Iêmen e Arábia Saudita (GUERRA et al., 2010). Nas Américas e no Caribe, 15,97% da população (cerca de 144 milhões de pessoas) de 21 países, residem em áreas onde existe algum risco ecológico da transmissão de malária (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2007). A Figura 1 mostra as áreas de risco de transmissão de malária, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2010.

Figura 1 – Distribuição das áreas sob risco de transmissão de malária no mundo, em 2010.

Fonte: WHO, 2011.

Na América Latina, a Região Amazônica é responsável por 90% das notificações anuais da doença. No Brasil, 99,8% dos casos registrados são oriundos da Amazônia Legal, que compreende os estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão. A redução de casos entre janeiro a outubro de 2011 foi de 23% em relação ao mesmo período no ano anterior. Segundo o Ministério da Saúde, o número de internações passou de 3859 em 2010 para 3215, no ano de 2011. Ainda de acordo com o órgão público, a diminuição ocorreu principalmente no Acre (39%), seguido de Roraima (33%), Rondônia (30%), Mato Grosso (28%), Amazonas (23%), Pará (18%) e Maranhão (17%). Somente o Amapá registrou acréscimo de 8% no número de infecções por *P. falciparum* (BRASIL, 2011). A Figura 2 mostra a distribuição de casos de malária em municípios brasileiros, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2010.

Figura 2 – Distribuição de casos de malária confirmados nos municípios brasileiros. Os dados demonstrados são do ano de 2010 e os municípios foram estratificados de acordo com a transmissão de malária.

Fonte: WHO, 2011.

Embora tenha ocorrido uma queda de números de casos no Brasil, o quadro epidemiológico dessa doença ainda é preocupante, uma vez que geralmente está relacionada às condições ambientais e socioculturais (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Entretanto, observa-se que é na região extra-amazônica que ocorre uma maior letalidade da doença, seja pelo diagnóstico tardio ou o tratamento inadequado de casos esporádicos importados de áreas endêmicas ou autóctones em poucos estados (BRASIL, 2008).

O interesse em se investigar a epidemiologia da malária no Brasil é resultado do elevado grau de morbidade que provoca em populações continuamente expostas. Hoje, as estratégias de erradicação da malária nesse país, estão focadas no acesso ao diagnóstico e tratamento rápido e adequado dos infectados e a borrifação intradomiciliar de inseticidas (COURA; SUAREZ-MUTIS; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

1.2 Patogenia da doença

Ao contrário da doença causada por *P. falciparum*, até pouco tempo atrás, a malária de *P. vivax* não atraía a devida atenção da comunidade científica, entidades governamentais ou agências de financiamento (PRICE et al., 2007). Isso em parte ocorreu como resultado da

idéia errônea de que a infecção causada por *P. vivax* era “terça benigna”, não levando em consideração sua morbidade (GALINSKI; BARNWELL, 1996; HAY et al., 2004).

Registros de malária grave e fatal, causados por essa espécie, foram documentados na Indonésia, Papua Nova Guiné, Tailândia, Índia e América do Sul. Anemia grave é uma manifestação clínica frequente em infecções, além da indução de uma maior inflamação nos pulmões do que observado em pacientes com infecção por *P. falciparum*. Se *P. vivax* é o agente causador de morte ou contribui para o desfecho fatal em pacientes com outras comorbidades, ainda é incerto. Parece haver uma substancial heterogeneidade no espectro da doença que é atribuído em partes, a diferentes virulências do parasito. Algumas cepas induzem infecções que se curam sem o uso de antimaláricos, enquanto outras estão associadas com infecções graves, cujas taxas de mortalidade são de 10 a 14% (MERCEREAU-PUJALON; MÉNARD, 2010).

1.3 Ciclo do parasito

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana compreende duas fases: uma delas, sexuada, que ocorre no interior de fêmeas do gênero *Anopheles* e, a outra assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado.

As fêmeas de mosquitos anofelinos inoculam durante seu repasto sanguíneo, no hospedeiro vertebrado, formas infectantes do parasito, conhecidas como esporozoítos. O mosquito transmite ao vertebrado os esporozoítos, que migram para corrente sanguínea, invadindo então, os hepatócitos. Alguns se desenvolvem rapidamente e se diferenciam em merozoítos hepáticos por esquizogonia, já outros, ficam em estado de latência (hipnozoítos), presentes especificamente nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação (KROTOSKI, 1985). Esses hipnozoítos podem ficar dormentes em períodos que variam de 1 mês a 2 anos. O individuo infectado com essas formas latentes, poderá apresentar manifestações clínicas da doença, posteriormente ao tratamento, mesmo que não tenham um novo contato com o agente transmissor. De acordo com Mueller et al. (2009), ainda não são conhecidos os fatores do parasito ou do hospedeiro que determinam o número e a duração dessas recaídas.

O processo de invasão dos eritrócitos é complexo e depende de várias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (GAUR; MAYER; MILLER, 2004). Esse estágio eritrocitário é o responsável pelas manifestações clínicas da malária. Os merozoítos, após invadirem os eritrócitos,

diferenciam-se em trofozoítos jovens, posteriormente em trofozoítos maduros, até a forma de esquizonte, que por um processo de esquizogonia, irão originar novos merozoítos capazes de infectar outros eritrócitos.

Após algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos se diferenciam em estágios sexuais, conhecidos como gametócitos femininos e masculinos, macro e microgametócito, respectivamente. Ao serem ingeridos durante um novo repasto sanguíneo por fêmeas do *Anopheles*, darão continuidade ao ciclo do parasito com a formação dos gametas. A fusão dos gametas no interior do intestino do mosquito origina um zigoto móvel, chamado oocineto. Após atravessar a parede intestinal do mosquito, aloja-se na membrana basal, onde se desenvolve em oocisto. No interior do oocisto ocorrem diferenciações e divisões nucleares que objetivam a produção dos esporozoítos. Parte desses esporozoítos produzidos migra para a glândula salivar do mosquito, que durante um novo repasto sanguíneo, reiniciará o ciclo dentro do hospedeiro vertebrado (BARRILAS-MURY; KUMAR, 2005). Figura 3 representa esquematicamente o ciclo de vida do *P. vivax*.

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium vivax*

Fonte: Adaptado de Mueller et al. (2009).

1.4 Polimorfismo no grupo sanguíneo Duffy

Primeiramente descrito há cerca de 60 anos atrás, em um paciente hemofílico politransfundido que deu nome ao sistema, o grupo sanguíneo Duffy, desde então, tem despertado interesse em diversos campos da antropologia, genética e malariologia (HOWES et al., 2011).

Os antígenos desse sistema são glicoproteínas transmembrana que funcionam como receptores para quimiocinas (*Duffy Antigen/Receptor for Chemokine* – DARC) e para *P. vivax* (HADLEY; PIEPER, 1997). A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não-eritróides como o rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cerebelo (HADLEY; PIEPER, 1997; HESSELGESSER; HOURUK, 1999). Sabe-se que a proteína Duffy não é essencial para a estrutura e função normal dos eritrócitos, uma vez que hemácias com ausência da glicoproteína não manifestam alterações em indivíduos com fenótipo Duffy negativo (CHAUDHURI et al., 1995).

O gene que codifica a proteína Duffy foi o primeiro *locus* autossômico a ter sua localização definida corretamente, no cromossomo número 1 (DONAHUE et al., 1968), na região 1q22-1q23 (CHAUDHURI et al., 1993). O produto do gene Duffy (*FY*) é uma glicoproteína (GP-FY) de 35 a 43 kDa (HADLEY; PIEPER, 1997). Essa proteína é constituída de sete hélices hidrofóbicas, com uma topologia na qual existe um domínio amino-terminal extracelular, três alças extracelulares, três alças citoplasmáticas e um domínio carboxi-terminal citoplasmática; ou seja, a glicoproteína Duffy apresenta sete passagens transmembrana (NEOTE et al., 1994).

O sistema Duffy apresenta quatro alelos principais: FY^*A , FY^*B , FY (FY^*B-33 , FYB nulo ou FY^*B^{ES}) e FY^*X (ou FY^*b^{fraco}), que expressam os respectivos antígenos: Fy^a , Fy^b , Fy e uma pequena quantidade de Fy^b (Fyb^{fraco}). Indivíduos podem apresentar: Fy^aFy^a , Fy^bFy^b (homozigotos), Fy^aFy , Fy^bFy (heterozigotos com um único alelo expresso), Fy^aFy^b (heterozigotos com dois alelos expressos), $FyFy$ (Duffy negativos) ou ainda diferentes combinações com Fyb^{fraco} .

O polimorfismo dos alelos FY^*A e FY^*B é gerado a partir de uma simples substituição de bases no nucleotídeo 125, gerando uma troca de aminoácidos, no códon 42, na região N-terminal da proteína. No alelo FY^*A , a base presente é guanidina (G), resultando em um códon para glicina; no alelo FY^*B , a base é adenina (A), resultando em um códon para ácido aspártico. O segundo polimorfismo mais comum é ocasionado a partir da transição de

nucleotídeos T→C, na região promotora do alelo FY*B, sendo essa mutação capaz de abolir a expressão de antígeno Duffy na superfície eritrocitária (também denominado ES = *erythrocyte silent*). Essa alteração leva a uma interrupção no fator de transcrição eritrocitário GATA-1, abolindo a expressão do antígeno Fy^b apenas no eritrócito, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos (JENS; PAGLIARINI; NOVARETTI, 2005).

Já a alteração na expressão do alelo FY*B, é devida a mutação específica no nucleotídeo 265 C→T desse alelo, ocasionando uma mudança do aminoácido arginina pela cisteína na posição 89 da proteína, responsável pela baixa expressão de fenótipo Fy^b, o que pode resultar em uma fenotipagem Duffy negativa (POGO; CHAUDHURI, 2000). Outra mutação presente 298 G→A resulta na troca do aminoácido alanina por treonina na posição 100 da proteína. Essa última substituição tem menor impacto sobre a estrutura da glicoproteína e sua relevância funcional ainda é desconhecida. A Figura 4 representa esquematicamente o gene *FY* do grupo sanguíneo Duffy, bem como os polimorfismos que podem estar presentes e substituições de aminoácidos.

Figura 4 – Representação esquemática do gene *FY* do grupo sanguíneo Duffy, incluindo a região promotora e os dois éxons.

Nota: Os círculos pretos representam as substituições dos nucleotídeos. As setas indicam em que posição do gene estas trocas ocorrem. O aminoácido correspondente a cada troca ou não de nucleotídeos, se encontra abaixo da posição de troca.

Fonte: Modificado de Cavasini et al. (2001).

Zimmerman et al. (1999) descreveram uma outra mutação, agora envolvendo o genótipo FY*A (FY*A nulo) que, à semelhança do FY*B nulo, resulta na não- expressão do antígeno

Fy^a, assim como em FY*B^{ES}. Essa mutação ocorre no nucleotídeo -33 da região promotora do gene *FY*, sendo então denominada FY*A^{null}.

Howes et al. (2011) compilaram dados de 131.187 indivíduos a fim de gerar um mapa global da distribuição dos alelos Duffy e o fenótipo Duffy negativo utilizando um modelo geostatístico bayesiano. De acordo com os autores, a frequência dos alelos revelou um claro padrão geográfico. O aspecto mais marcante é a presença do alelo silencioso FY*B^{ES} em toda África Subsaariana, enquanto que os alelos FY*A ou FY*B na mesma região têm frequência de 0 a 5%. Frequências indicam fixação desse alelo (FY*B^{ES}) em partes do oeste, leste e centro do continente africano, sugerindo que a população local seja refratária a infecções por *P. vivax*. Em Madagascar, sua frequência foi de 80% e acima de 50% na Península Arábica. Baixas frequências também foram encontradas espalhadas pelas Américas, notavelmente ao longo da costa Atlântica e no Caribe.

A heterogeneidade dos três alelos é maior nas Américas, como era previsto. Somente em algumas áreas existem predominância de alelos únicos. O alelo FY*A está perto de fixação em bolsões no leste da Ásia e permanece com frequência média acima de 80% no sul da Ásia, Austrália, em populações da Mongólia e em partes do leste da China e Rússia. Esse alelo também foi encontrado com alta frequência (> 90%) no Alasca e noroeste do Canadá. Fora dessas regiões de alta predominância, FY*A permanece relativamente comum fora do continente Africano. O alelo FY*B se mostrou o menos prevalente globalmente. Frequências acima de 50% são restritas a Europa e bolsões das Américas, notavelmente na costa leste dos Estados Unidos. FY*B é prevalente em algumas zonas ao redor de regiões onde FY*B^{ES} é predominante, como norte, nordeste e sul da África. O alelo silencioso FY*A^{ES} não pode ser retratado espacialmente devido a sua raridade (HOWES et al., 2011).

A lacuna na distribuição de *P. vivax* na África em comparação ao resto do mundo é vista como uma consequência da falta de expressão de antígeno Duffy nas hemácias da população africana, onde há predominância do alelo nulo em homozigose. Embora menos frequente do que *P. falciparum*, *P. vivax* é endêmica em algumas populações do Sudão, Somália e Etiópia, cuja população é predominantemente Duffy positiva (MERCEREAU-PUIJALON; MÉNARD, 2010). De acordo com Culleton et al. (2008), parece existir um número suficiente de indivíduos Duffy positivos em algumas áreas da África para manter a transmissão de *P. vivax* em regiões onde a maioria da população é Duffy-negativa. A Figura 5 mostra as frequências globais dos alelos FY*A, FY*B e FY*B^{ES}.

Figura 5 – As figuras de a –c, correspondem a frequência global dos alelos FY*A, FY*B e FY*B^{ES}, respectivamente.

Distribuição do alelo FY*A

Distribuição do alelo FY*B

Distribuição do alelo FY*B^{ES}

Fonte: Howes et al. (2011)

Diversos estudos têm sido conduzidos com o propósito de investigar a susceptibilidade de infecção por *P. vivax*, de acordo com o genótipo Duffy. Nessa linha, temos um estudo longitudinal realizado por Kasehagen et al. (2007), apenas com indivíduos FY*AFY*A ou FY*AF*A^{null}, em Papua Nova Guiné (PNG), onde infecções de malária são causadas por múltiplas espécies. Esse levantamento revelou que a redução na expressão de antígeno Duffy (a presença do alelo FY*A^{null}) pode diminuir a susceptibilidade à infecção por *P. vivax in vivo*, mas não afeta o risco de infecção por *P. falciparum*, conferindo alguma vantagem seletiva dentro dessa população.

Em população amazônica brasileira, Albuquerque et al. (2010) e Cavasini et al. (2007a) concluíram que o genótipo FY*AFY*B foi o mais frequente dentre aqueles que se encontravam infectados por *P. vivax*, enquanto que FY*BFY*X (Fy^bFyb^{fraco}) e FY*AFY*X (Fy^aFyb^{fraco}) foram associados a baixos níveis de parasitismo.

King et al. (2011), utilizando uma população da região amazônica, testaram a hipótese de que indivíduos com hemácias FY*A tem reduzida susceptibilidade à malária causada por *P. vivax*. Os autores encontraram uma diminuição de 40-50% de ligação entre o ligante do parasito e as hemácias com genótipo FY*AFY*A, comparadas com FY*BFY*B. Os indivíduos com genótipos FY*AFY*B^{ES} e FY*AFY*A mostraram menor incidência de malária clínica; quando comparados com indivíduos FY*AFY*B, esses indivíduos mostraram uma redução de 80 e 29% de risco de malária vivax, respectivamente. Em contrapartida, indivíduos FY*BFY*B^{ES} e FY*BFY*B mostraram risco 220-270% maior de malária causada por *P. vivax*, quando comparados com indivíduos FY*AFY*B. Esses resultados demonstram uma consistente diminuição de susceptibilidade para malária associada com Fy^a e um aumento, de acordo com uma maior da expressão de Fy^b.

Sabe-se que *P. vivax* utiliza o antígeno Duffy presente nas hemácias para realizar o processo de invasão eritrocitário. Porém, alguns trabalhos recentes têm demonstrado que *P. vivax* é capaz de invadir eritrócitos utilizando outros receptores. Essa afirmação foi comprovada por Mendes et al. (2011), que descreveram indivíduos Duffy negativos da Angola e Guiné Equatorial (onde a prevalência do fenótipo Duffy-negativo é de 95%) infectados com diferentes cepas de *P. vivax* (VK247 e VK210). Esses dados corroboram com o encontrado por Wurtz et al. (2011) na Maurítânia, em Madagascar por Ménard et al. (2010), no Quênia por Ryan et al. (2006) e no Brasil por Cavasini et al. (2007b). A respeito disso, Ménard et al. (2010), sugere que indivíduos Duffy positivos podem servir como um reservatório para *P. vivax*, fornecendo a oportunidade desse parasito infectar hepatócitos de

indivíduos Duffy negativos e selecionar uma nova cepa capaz de invadir eritrócitos de Duffy negativos.

1.5 Processo de invasão eritrocitária pelos parasitos da malária

Na circulação sanguínea humana normal, existem duas populações principais encontradas: os normócitos e os reticulócitos. Os reticulócitos são células vermelhas não maduras, em intensa síntese proteica, que representam menos de 1% da população normal de eritrócitos circulantes. Diferentes espécies de *Plasmodium* mostram distintas preferências pelo tipo de eritrócito a ser invadido. *Plasmodium vivax* interage somente com reticulócitos, utilizando a interação com o grupo sanguíneo Duffy para a invasão de eritrócitos humanos, enquanto *P. falciparum* e *P. malariae* são capazes de invadir todos os tipos de eritrócitos e de diferentes idades; *P. ovale* é também restrito à reticulócitos. Essas variações quanto à preferência do tipo celular de invasão, também é encontrada nos parasitos não humanos (IYER et al., 2007).

Resumidamente, após a interação inicial com a célula sanguínea, que pode ocorrer em qualquer lugar da sua superfície, o merozoíto se move ao modo que sua porção apical se reorienta em contato com a superfície eritrocitária. Após essa orientação uma junção irreversível se desenvolve entre a superfície apical do merozoíto e o eritrócito. Então, as organelas apicais como os micronemas e róprias liberam seus conteúdos para criar uma invaginação na superfície do eritrócito. O merozoíto então sofre processo de invaginação para dentro da hemácia, a junção apical se transforma em um anel que circunda o merozoíto, que é fechado assim que a invasão se completa (CHITNIS, 2001).

Para que todo esse processo ocorra são necessários ligantes específicos do parasito que estão envolvidos com os eventos de ligação à superfície dos eritrócitos e conduzem ao sucesso da invasão. As proteínas conhecidas pela ligação e reconhecimento de células sanguíneas são classificadas em duas famílias: as RBLs (*reticulocyte binding-like*) e EBLs (*erythrocyte binding-like proteins/ ligands*).

O primeiro membro da superfamília das RBLs envolvido no reconhecimento de receptores das células do hospedeiro pelo parasito foi descoberto em *P. yoelii* (chamado de Py235). Proteínas homólogas foram encontradas em outras espécies de *Plasmodium*, incluindo *P. vivax* e conhecidas como a família PvRBP (CARLTON et al., 2008; GALINSKI; BARNWELL, 1996). *Plasmodium falciparum* conta com uma grande família: algumas dessas proteínas estão localizadas nas róprias, sendo capazes de reconhecer normócitos e

outras, reticulócitos. Essas proteínas têm um papel crucial no reconhecimento e invasão eritrocitária (IYER et al., 2007).

As proteínas de ligação ao eritrócito são conhecidas de EBL ou DBL (*Duffy binding-like proteins/ ligand*) e estão envolvidas na adesão do parasito às células do hospedeiro. São cruciais no reconhecimento eritrocitário, formação da junção e invasão (IYER et al., 2007). Parasitos de *P. vivax* reconhecem o antígeno Duffy das hemácias do hospedeiro através da proteína PvDBP (*Duffy binding protein*) (WERTHEIMER ; BARNWELL, 1989). Já *P. falciparum* é capaz de invadir hemácias com ou a sem a presença de antígeno Duffy, devido à expansão dos genes EBL que possui. Todos os domínios DBL de *P. falciparum* são duplicados, indicando uma proteína mais complexa (ADAMS et al., 2001).

Numerosos estudos têm apontado que merozoítos de *P. falciparum* tem capacidade de invadir eritrócitos através de muitas vias de invasão (GAUR; MAYER; MILLER, 2004), enquanto que para *P. vivax*, uma via parece ser a mais importante (ADAMS et al., 1992). Essa interessante habilidade de *P. falciparum* em alterar seu processo de invasão eritrocitária, utilizando para isso vias alternativas, concede a essa espécie muitas vantagens. Esse parasito possui habilidade para invadir uma grande variedade de eritrócitos humanos e outra vantagem está relacionada à evasão do sistema imune, já que as vias alternativas que o parasito utiliza para invasão na célula do hospedeiro, envolvem diferentes moléculas do parasito. Logo, uma resposta dirigida a determinada proteína de invasão pode não afetar o parasito, pois o mesmo pode estar utilizando uma via alternativa (DOOLAN; DOBANO; BAIRD, 1990).

1.5.1 Moléculas envolvidas no processo de invasão

1.5.1.1 PvRBP (Reticulocyte- Binding Proteins)

A seleção de reticulócitos pelo *P. vivax* é o primeiro passo antes da formação da junção. As proteínas que realizam esse papel foram inicialmente descritas por Galinsk e Barnwell, no ano de 1992. Nesse trabalho os autores listam duas proteínas: PvRBP-1 e PvRBP-2, localizadas no polo apical dos merozoítos que são capazes de se ligar ao eritrócitos em ensaios de ligação.

Como proposto por Galinski e Barnwell (1996), as proteínas PvRBPs são as responsáveis pelos merozoítos de *P. vivax* objetivarem e selecionarem as células do hospedeiro a ser invadidas. Ao entrar na corrente sanguínea, esses merozoítos tem contato com inúmeros outros tipos celulares e somente invadem células jovens. Essa primeira junção

formada (reconhecimento) ocorre de forma “reversível” a ponto de selecionar aquele tipo celular de interesse.

PvRBP1 e PvRBP2 são proteínas de membrana integrais do tipo 1 de aproximadamente 330kDa, cada uma possuindo um amplo domínio extracelular, um único domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (GALINSKI; BARNWELL, 1996).

Com o sequenciamento da cepa Salvador I (conhecida como Sal I) realizado por Carlton et al. (2008), ficou claro que PvRBP é composta por várias representantes, formando uma família de proteínas ligadoras de reticulócitos. De acordo com os autores, inesperadamente foram identificados genes *rbp* adicionais no genoma de *P. vivax*, incluindo múltiplos genes de *rpb2*, que podem fornecer a *P. vivax* uma diversidade de mecanismos de invasão comparados a *P. falciparum*. Essa descoberta elimina a visão de que *P. vivax* tem um mecanismo de invasão simples, como até então era imaginado. Provavelmente, *P. vivax* possui vias de invasão alternativas.

1.5.1.2 AMA-1 (*Antígeno de Membrana Apical*)

O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) é uma proteína de 83 kDa, localizada no micronema, sintetizada por estágios maduros do parasito e também por esporozoítos (SILVIE et al., 2004). Antes da invasão dos merozoítos, a proteína AMA-1 é processada em um produto de 66 kDa, sendo liberada na superfície do merozoíto instantes antes da invasão ou durante o processo (NAIR et al., 2002; PIZARRO et al., 2005). Especula-se que uma das funções dessa proteína é facilitar a reorientação do merozoíto após a adesão inicial, ao modo que as roptrias e os complexos de micronemas ficam expostos na superfície eritrocitária, durante a invasão do parasito (CHITNIS; BLACKMAN, 2000; MITCHELL et al., 2004).

1.5.1.3 MSP1₁₉ (*Fragmento 19 da Proteína 1 da superfície do merozoíto*)

A MSP-1 é sintetizada pelo esquizonte intracelular e no final da esquizogonia sofre uma clivagem, se dividindo em polipeptídeos de diversos tamanhos. Quatro desses polipetídeos participam da formação de um complexo não covalente associado à superfície do parasito. Esse complexo possui peptídeos chamados: MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₁₈ e MSP1₄₂. (HOLDER et al., 1992).

Após a liberação dos merozoítos, o polipetídeo C-terminal de 42 kDa (MSP1₄₂) é novamente clivado, resultando em dois fragmentos: a MSP1₃₃ de 33 kDa e MSP1₁₉, de 19 kDa. O fragmento maior é liberado na circulação, juntamente com o complexo, enquanto que o menor fragmento continua ancorado à membrana do merozoíto, via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BLACKMAN et al., 1990).

Estudos transversais realizados na Amazônia brasileira, evidenciam que indivíduos com malária vivax ou que sofreram prévia exposição, são capazes de apresentar altos títulos de anticorpos contra MSP1₁₉ (MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax*) (BARBEDO et al., 2007; BASTOS et al., 2007; SOARES et al., 1999).

1.5.1.4 PvDBP (*Duffy Binding Protein*)

Nas espécies *P. vivax* e *P. knowlesi*, a formação da junção e consequente invasão pelo merozoíto é mediada via interação entre *Duffy binding protein* (DBP) e seu receptor nos eritrócitos o antígeno do grupo sanguíneo Duffy (ADAMS et al., 1992; MILLER et al., 1976).

A PvDBP (*Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*) é uma molécula de 140kDa, pertencente à superfamília de proteínas homólogas que se ligam a eritrócitos (EBL). Membros dessa família contêm um ou dois domínios *Duffy binding like* (DBL) ricos em cisteína (região II) e um segundo domínio extracelular também rico em cisteína (região IV), um domínio transmembrânico do tipo I e um pequeno domínio citoplasmático (ADAMS et al., 1992). Essas proteínas ligadoras (EBL) se localizam dentro de estruturas secretoras do parasito denominadas micronemas e estão presentes quando o *Plasmodium* se encontra na forma de merozoítos (ADAMS et al., 1990).

O ligante funcional da PvDBP localiza-se na região II, contendo cerca de 330 aminoácidos. O seu sítio de ligação ao eritrócito situa-se no trecho 170-aa, na área entre as cisteínas 5 e 8 do domínio DBL (SINGH et al., 2003). O interessante é que essa região é muito polimórfica e possui altos índices de polimorfismos sinônimos e não-sinônimos, sugerindo uma seleção positiva do parasito devido à pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro (COLE-TOBIAN; KING, 2003; TSUBOI et al., 1994).

Mesmo possuindo regiões altamente polimórficas, a molécula de PvDBP é um alvo atrativo de vacina, devido sua presença ser necessária para invasão de células do hospedeiro e ao fato de anticorpos que reconhecem essa molécula estarem relacionados com proteção contra infecção por *P. vivax* (KING et al., 2008). A Figura 6 representa esquematicamente a molécula de PvDBP, enfatizando a região II, a mais polimórfica da proteína.

Figura 6 – Representação esquemática da PvDBP.

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

Fonte: Adaptado de VanBuskirk et al. (2004a).

Merozoítos de *P. vivax* e *P. knowlesi* são pouco capazes de invadir eritrócitos humanos que não possuem antígenos do grupo sanguíneo Duffy, pois o processo de formação da junção entre merozoíto e eritrócito, geralmente não pode ser formado (ADAMS et al., 1990; HAYNES et al., 1988). Sendo assim, indivíduos com eritrócitos DARC negativos são descritos como naturalmente resistentes à infecção por *P. vivax*, evidenciando que o receptor DARC é necessário para invasão de *P. vivax* (MILLER et al., 1976). Contudo, estudos recentes demonstram que alguns indivíduos DARC negativos do Brasil (CAVASINI et al., 2007b), Madagascar (MÉNARD et al., 2010), Mauritânia (WURTZ et al., 2011), Angola e Guiné Equatorial (MENDES et al., 2011) se infectaram com essa espécie, sugerindo que o parasito pode utilizar uma via alternativa de invasão.

A Figura 7 representa resumidamente a interação entre parasito-eritrócito. Após o reconhecimento das hemácias por parte das proteínas da família PvRBP, ocorre a interação entre superfície da hemácia e proteínas MSP-1. A reorientação apical, visando a invasão, ocorre por intermédio de AMA-1. Após esse processo, ocorre a formação da junção irreversível, com a liberação da molécula PvDBP e posterior invaginação do parasito.

Figura 7 – Ordem das proteínas envolvidas no processo de invasão do reticulócito por espécies de *Plasmodium*.

Nota: Após o reconhecimento inicial de reticulócitos, comandado pela família das PvRBPs, a interação inicial ocorre com a interação entre merozoíto-eritrócito, baseada na proteína MSP1. A reorientação apical é comandada pela proteína AMA-1, de modo que as roptrias e micronemas possam expor suas moléculas de ordem invasiva. As EBPs, no caso de *P. vivax* a PvDBP, reconhece o antígeno Duffy da membrana eritrocitária e inicia o processo da invasão, formando a junção irreversível. Após esse processo, o merozoíto sofre invaginação para dentro da hemácia do hospedeiro definitivo, envolvido pelo vacúolo parasitóforo.

Fonte: Wang et al. (2009).

1.6 Anticorpos anti-PvDBP

A aquisição de imunidade contra malária ocorre de forma vagarosa e complexa, variando entre indivíduos e desenvolvida de acordo com a idade e o número de episódios de malária (DOOLAN; DOBANO; BAIRD, 2009). Em áreas de alta transmissão da doença, indivíduos naturalmente expostos, desenvolvem certo grau de imunidade clínica, que é mantido por repetidas exposições à infecções de malária (CERÁVOLO et al., 2005). Geralmente, as respostas sorológicas contra PvDBP e a inibição da atividade de ligação em eritrócitos aumentam com a idade do indivíduo, sugerindo que ocorre um efeito potencializador devido à infecções recorrentes (KING et al., 2008).

Estudos apontam que altos níveis de anticorpos contra PvDBP estão associados com alta exposição ao parasito causador da malária em região endêmica (CERÁVOLO et al., 2005; COLE-TOBIAN et al., 2009). No trabalho conduzido por Cerávolo et al. (2005), realizado com indivíduos expostos à diferentes níveis de transmissão, alta soroatividade contra PvDPB foi detectada entre mineradores de ouro, que viveram muitos anos expostos ao parasito. Em estudos com população miscigenada em termos de exposição ao parasito, a

resposta contra PvDBP se mostra dependente do tempo de exposição a malária, revelando que quanto maior o tempo de moradia de uma população em região endêmica, maior o índice de reatividade contra essa proteína (CERÁVOLO et al., 2005; SOUZA-SILVA et al., 2010; TRAN et al., 2005).

Com a intenção de avaliar se anticorpos contra PvDBP eram capazes de inibir ligações PvDBP – Duffy, *in vitro*, Grimberg et al. (2007) observaram que anticorpos anti-PvDBP presentes no soro de coelhos imunizados foram capazes de se ligar à porção apical final do merozoíto de *P. vivax*, onde é esperado ocorrer a expressão de PvDBP. De acordo com os autores, esses anticorpos também foram capazes de reconhecer merozoítos dentro do eritrócito infectado com esquizontes, não tendo sido observado reconhecimento de estruturas dentro de trofozoítos. Esse estudo demonstrou que anticorpos anti-PvDBP obtidos de humanos expostos ao *P. vivax* ou artificialmente induzidos em coelhos, tem efeito inibitório dose-dependente; quanto maior a concentração de anticorpos, menor o número de ligações PvDBP-II-Duffy.

Em relação a PvDBP ser considerada uma candidata a vacina, King et al. (2008) enfatizaram que atividade inibitória de ligação a PvDBP de amostras de crianças de Papua Nova Guiné com altos níveis de anticorpos foi cepa-transcendente, sugerindo que uma vacina baseada em PvDBP pode ser efetiva contra diversas cepas de *P. vivax*. Entretanto, Cole-Tobian et al. (2009) utilizando as mesmas amostras afirmam que as crianças recrutadas no mencionado estudo, primeiramente adquiriram uma imunidade cepa-específica para PvDBP, que pode oferecer melhor proteção contra cepas homólogas do que heterólogas. Com a repetida exposição a múltiplas variantes de PvDBP, indivíduos adquirem imunidade contra outras cepas, com alguns poucos indivíduos desenvolvendo altos níveis de anticorpos inibitórios e cepa-transcendentes. De acordo com os autores, o desafio será desenvolver uma vacina que possa atingir uma imunidade cepa-transcendente.

2 OBJETIVOS

Geral

- Caracterizar a resposta de anticorpos do hospedeiro contra variantes de PvDBP em uma população amazônica.

Específicos

- Comparar padrões de resposta de anticorpos contra as diferentes proteínas recombinantes derivadas de PvDBP;
- comparar as respostas de anticorpos contra PvDBP em relação a uma proteína de merozoíto altamente imunogênica, a MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax*;
- verificar se o padrão de resposta de anticorpos é influenciado pelo genótipo Duffy dos indivíduos expostos à malária;
- caracterizar a diversidade de sequências da região II de PvDBP entre os parasitos da área de estudo.

3 METODOLOGIA

3.1 Área e população de estudo

A área de estudo localiza-se no sul do estado do Amazonas, extremo oeste do estado de Rondônia, próximo à fronteira com o Acre, distanciando-se cerca de 120 km de Acrelândia, o município mais próximo (Figura 8).

Figura 8 – Localização do assentamento agrícola conhecido como Remansinho, a principal área de estudo, em relação ao município de Acrelândia (sede do laboratório de campo) e à rodovia BR 364, que liga Rio Branco e Acrelândia, no Acre, a Rondônia e ao restante do país.

Fonte: Gozze (2012)

Abrangendo zonas de assentamento agrícola ao redor de uma estrada principal, este estudo se estendeu à população das margens da via principal e de mais quatro vias menores em seu entorno. Essas zonas são denominadas: Ramal dos Goianos, Ramal da Castanheira, Ramal da Linha 1, Ramal dos Seringueiros.

Parte da população inserida no estudo é composta por habitantes do assentamento agrícola denominado Ramal do Remansinho, (também conhecido como Seringal Nova Esperança, PDS Gedeão ou Gleba Iquiri) localizado no sudeste do Estado do Amazonas.

Considerando as coordenadas geográficas (latitude e longitude) da localização dos domicílios do estudo, foi elaborada a Figura 9, na qual cada círculo representa uma casa. E

assim foi possível observar a distribuição dos indivíduos por regiões de assentamento agrícola.

Figura 9 – Distribuição da localização dos domicílios de acordo com as coordenadas geográficas obtidas nos inquéritos.

Fonte: Gozze (2012)

A população é formada tipicamente por migrantes do centro-sul do país que se estabeleceram nesse assentamento em média há menos de cinco anos, provenientes de outros assentamentos em Rondônia e Mato Grosso. Eles habitam lotes agrícolas situados às margens de estradas de terra. Nenhum dos ocupantes tem escritura de suas terras.

Participaram do estudo 343 indivíduos destas áreas, com pelo menos uma amostra de plasma coletada. Desses 55,4% pertencem ao sexo masculino e 44,6% ao sexo feminino. A idade dos participantes do estudo variou de 2 meses a 71 anos, com média de 27,4 anos de idade.

3.2 Delineamento do estudo

A linha de base do estudo foi estabelecida com o primeiro inquérito transversal, ocorrido em março-abril do ano de 2010, durante o qual foi aplicado um amplo questionário sócio-demográfico.

Na linha de base do estudo, todos os indivíduos pertencentes à área de estudo, os maiores de 18 anos foram convidados, independentemente da presença de sintomas, a fornecer 14 ml de sangue para a realização de microscopia convencional e diagnóstico molecular de malária. As amostras coletadas de indivíduos abaixo dos 18 anos foram permitidas apenas após o consentimento dos pais e/ou responsável. O recrutamento foi feito através de visitas domiciliares a membros da comunidade, pela equipe de campo do projeto. Tal procedimento foi repetido em todos os demais inquéritos, ocorridos em junho-julho de 2010 e fevereiro- março de 2011.

Uma lâmina contendo amostra sanguínea de cada participante do estudo foi utilizada para realização de diagnóstico microscópico de malária por um microscopista de Acrelândia, sede do laboratório de campo. As alíquotas de papa de hemácias foram utilizadas para o diagnóstico molecular realizado no laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Durante os três cortes, após a realização de punção venosa, uma alíquota de plasma foi separada e armazenada no freezer -20 °C até a utilização no ELISA, no laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), da Universidade de São Paulo, São Paulo.

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Extração de DNA

O DNA das amostras foi isolado a partir de 200 µl de papa de hemácias, coletado em campo e armazenado à -20 °C até o uso, utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Alemanha) segundo instruções do fabricante.

3.3.2 Tipagem do grupo sanguíneo de Duffy

Alíquotas de DNA (20 µl) extraído da papa de hemácias coletadas nos cortes transversais foram encaminhadas ao Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz, MG) e processadas pela PCR em Tempo Real, com os iniciadores descritos na Figura 10, conforme Souza et al. (2007).

Figura 10 - Lista da sequência de oligonucleotídeos utilizados na PCR em Tempo Real da tipagem de Duffy, segundo Souza et al. (2007).

Primers	Oligonucleotídeos (5' → 3')
FGATA	CCCGGGCCCGCCG CCC TCA TTA GTC CTT GGC TCT <u>TTC</u>
FAB	CCC TCA TTA GTC CTT GGC TCT <u>TTT</u>
RABGATA	A GGG GCA TAG GGA TAA GGG ACT
FY	C TCA AGT CAG CTG GAC TTC GAA GAT
RYA	AG CTG CTT CCA GGT TGG <u>CTC</u>
RYB	CTG CTT CCA GGT TGG <u>CGT</u>

Nota: Em negrito os nucleotídeos polimórficos. Em sublinhado os *mismatches*. Em itálico a cauda C/G inserida.

A técnica foi baseada em um conjunto de seis primers para a genotipagem Duffy. A detecção do polimorfismo Fya e Fyb foi desenvolvida a partir dos oligonucleotídeos RYA e RYB e foram combinados com oligonucleotídeos anterior FY. Para detecção de mutação na região promotora foram utilizados os oligonucleotídeos FAB (*'wild type promoter'*) e FGATA (promotor mutado), utilizados com oligonucleotídeo reverso RABGATA.

Devido à elevada similaridade entre oligonucleotídeos alelo-específico foi introduzido um erro de pareamento (*'mismatch'*) exatamente antes do polimorfismo para impedir a amplificação de um alelo *'non-matching'*. Além disso, foi inserida no oligonucleotídeo FGATA uma cauda C/G para aumentar a diferença de temperatura de anelamento com relação ao oligonucleotídeo FAB. Para o uso de pares de oligonucleotídeos (FY/RYA e FAB/RABGATA em um tubo, e FY/RYB e FGATA/RABGATA no outro), realizou-se uma reação multiplex.

A Figura 11 representa o gene *FY*, mostrando os pares de oligonucleotídeos utilizados para detecção dos polimorfismos na região promotora e no éxon 2, determinando os alelos FY*B^{ES}, FY*A e FY*B.

Figura 11 – Representação esquemática do gene *FY*.

Nota: os pares de oligonucleotídeos FAB/RABGATA e FGATA/RABGATA foram utilizados para detectar o polimorfismo -33 T>C na região promotora do gene, amplificando o promotor *wild-type* e o mutado, respectivamente. Os pares de oligonucleotídeos FY/RYA e FY/RYB foram utilizados para detectar o polimorfismo 125 G>A, no éxon 2, que determina os alelos FY*A e FY*B, respectivamente.

Fonte: Souza et al. (2007).

3.3.3 Construção da proteína Sal I_{II-IV}- GST

Para a realização do ELISA, com a finalidade de detectar anticorpos contra variantes de PvDBP, uma alíquota da proteína Sal I_{II-IV}-GST foi gentilmente cedida pela pesquisadora Luzia Helena Carvalho, do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz, MG). Essa proteína foi expressa conforme descrito no protocolo Cerávolo et al. (2005) e Fraser et al. (1997). De forma resumida, o plasmídeo pGEX-2T contendo as sequências codificadoras da região II a IV (aa-177 a 815) do alelo Sal I foi utilizado para gerar uma proteína de fusão com a glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST), mediante a transformação de bactérias quimicamente competentes *Escherichia coli* cepa DH5α.

A expressão da proteína recombinante Sal I_{II-IV}-GST foi induzida a partir da adição de 0,1mM de IPTG (Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg, Alemanha) às culturas bacterianas. A proteína de fusão solúvel Sal I_{II-IV}- GST foi purificada das culturas bacterianas pelo método convencional de isolamento de proteínas de fusão com GST, utilizando para isso, cromatografia de afinidade com uma matriz de *glutathione sepharose*® 4B (GS4B) (GST Purification Modules, Amersham Pharmacia), conforme recomendação do fabricante. A Figura 12 mostra a região (II a IV de PvDBP) utilizada para síntese de Sal I_{II-IV}-GST.

Figura 12 – Representação esquemática da proteína recombinante Sal I_{II-IV}-GST.

Fonte: Modificado de VanBuskirk et al., 2004a.

3.3.4 Construção das proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His

Para uma comparação de respostas de anticorpos com mais variantes da mesma proteína, uma alíquota das proteínas rPvDBPII Sal I_{II}-His e O_{II}-His foi gentilmente cedida por Christopher L. King, do Center for Global Health and Diseases, da Case Western Reserve University (Cleveland, Ohio, Estados Unidos). Essas variantes foram sintetizadas conforme descrito por Singh et al. (2001). DNA que codifica DBPII foi amplificado por PCR de dois diferentes alelos da região II (aa 194 – 521) da *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* (DBPII-Sal I e DBPII-O, respectivamente) presentes em diferentes regiões endêmicas (América Central e Papua Nova Guiné, respectivamente).

Reumidamente, os produtos amplificados foram clonados inseridos em um vetor de expressão (pET28a+ (Novagen)) com uma cauda de histidina na extremidade N-terminal para originar o plasmídeo pVET1, que foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3) e utilizado na expressão das proteínas PvDBP recombinantes. As células cresceram em meio LB com canamicina *overnight* a 37 °C. A expressão foi induzida com 1 mM de IPTG. As bactérias foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão de lise e posteriormente, lisadas por sonicação. Os corpos de inclusão foram então coletados por centrifugação e as células lisadas a 4 °C, tratadas com hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) e DTT. Após a remoção do DTT, as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em níquel. O redobramento (*refolding*) ocorreu por rápida diluição em tampão contendo 50 mM de tampão de fosfato, Ph 7.2, 1 mM de glutatona reduzida, 0,1 mM de glutatona oxidada, 1 M de uréia

e 0,5 M de arginina e então, a concentração final da proteína foi de ~ 45 µg/ml. O processo de redobramento foi realizado a 10 °C, por 36 h, com agitação. No final das 36 h, a solução de redobramento foi dializada por 48 h contra tampão de diálise (50 mM de tampão de fosfato, pH 6.5, 1 M de uréia) a fim de remover a arginina envolvida no processo. Após essa etapa, as proteínas dialisadas passaram por processo de purificação com cromatografia de troca iônica. Frações contendo PvRII foram agrupadas e, então purificadas por cromatografia de gel-filtração. A análise do processo de redobramento foi feita por cromatografia de fase reversa. O sequenciamento da região N-terminal e análise da massa espectral da proteína recombinante, também foram realizados. A análise de tióis livres na proteína recombinante foi feito através do método de Ellman (1946) e a sensibilidade do ensaio foi testada utilizando-se quantidades conhecidas de cisteína. O dicróismo circular (CD) foi realizado e a deconvolução de espectro de CD foi obtido utilizando-se o método de Bohm et al. (1992). Vale ressaltar que as proteínas recombinantes Sal I_{II}-His e O_{II}-His diferem de Sal I_{II-IV}-GST não somente pela sequência de PvDBP incluída mas também pelo fato de terem sido processadas de modo a manterem a conformação esperada para a proteína nativa. A Figura 13 representa as diferenças entre aminoácidos das variantes Sal I_{II}- His e O_{II}-His, inseridas no estudo.

Figura 13 – Diferença entre aminoácidos das proteínas Sal I_{II}- His e O_{II}-His, nas respectivas posições dos códons da região II de PvDBP.

	308	333	371	375	384	385	386	390	417	424	437	503
Sal I _{II} - His	R	L	K	N	D	E	K	R	N	L	W	I
O _{II} -His	S	.	.	.	G	.	.	H	.	I	.	.

Nota: Os pontos (.) indicam que as proteínas estudadas compartilham do mesmo aminoácido nessa determinada posição.

3.3.5 Construção da proteína MSP1₁₉- GST

Com a finalidade de compararmos nossos resultados de resposta contra as variantes PvDBP, analisamos também através de ELISA, a resposta dos indivíduos do estudo para MSP1₁₉ de *P. vivax*. Para tanto, o plasmídeo pGEX-2T contendo as sequências codificadoras da MSP1₁₉- GST (contendo os nucleotídeos 1615 a 1726 da MSP1, cepa Belém) foi

gentilmente cedido pelo Dr. Gerhard Wunderlich (Departamento de Parasitologia – ICB/USP). Este plasmídeo (pGEX-2T + MSP1₁₉), que gera uma proteína de fusão com a glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) foi utilizado para transformar bactérias quimicamente competentes, *E. coli* cepa DH5 α . A expressão da proteína recombinante foi iniciada cultivando-se uma colônia transformada em 5 ml de meio LB com ampicilina (100 μ g/ml) a 37 °C, sob agitação por 8-12 h. Posteriormente, esse pré-inóculo foi adicionado a 100 ml de meio LB com ampicilina (100 μ g/ml) e mantidos a 37 °C sob agitação até A₆₀₀= 0,6 (aproximadamente 1,5 h). A essa cultura acrescentaram-se 0,03 mM de IPTG e manteve-se a 37 °C sob agitação por 3 h.

A cultura foi então centrifugada a 25 g por 10 minutos a 4 °C, para iniciar o processo de purificação da proteína recombinante. O sedimento foi dissolvido em 2 ml de Triton X100 a 0,5% em solução salina tamponada (PBS) 0,01 M de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) e manteve-se sob leve agitação por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram realizados cinco ciclos de congelamento e descongelamento utilizando N₂ líquido e banho-maria a 37 °C. A lise mecânica do genoma bacteriano foi realizada passando-se a suspensão 10 vezes por seringa com agulha de calibre 25 G. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 25 g por 15 minutos a 4 °C.

Ao sobrenadante foram adicionados 200 μ l de glutathione-sepharose (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) previamente lavada com PBS. Realizou-se incubação por 1 h à temperatura ambiente, sob leve agitação. A suspensão então, foi lavada com 2 ml de PBS por três vezes. Ao precipitado foram adicionados 750 μ l de solução de eluição (TrisHCl 0,1 M, NaCl 0,12 M, glutathione 10 mM) e manteve-se sob agitação por 1 h em temperatura ambiente. O sobrenadante novamente foi recolhido por centrifugação 80 g por 1 minuto. A proteína foi quantificada utilizando-se o método de Bradford (1976).

3.3.6 ELISA para detecção de anticorpos anti-PvDBP e anti-MSP1₁₉

A metodologia para o ELISA empregada neste trabalho, visou a detecção de anticorpos IgG contra as proteínas descritas acima. As concentrações de antígenos, bem com as diluições dos anticorpos foram previamente determinadas por titulação.

As etapas do ELISA realizado encontram-se a seguir.

Sensibilização - Microplacas de 96 cavidades (*High binding*, Corning, Costar, EUA) foram sensibilizadas por 14 a 18 h a 4 °C com 1,5 μ g/ml de Sal II-IV-GST, 1 μ g/ml das

proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His e 2,5 µg/ml de MSP1₁₉. As proteínas foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (Sigma, EUA).

Bloqueio - O excesso da solução contendo os antígenos foi retirado por inversão, sendo as microplacas lavadas por três vezes com uma solução contendo PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich) a 0,05% (PBS-T). A cada poço da placa foram adicionados 200 µl da solução de bloqueio constituída por PBS-T e 5% de leite em pó desnatado. Após 2 h de bloqueio a 37 °C, as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS-T.

Reação - Foram adicionados às microplacas 50 µl dos soros-testes, diluídos a 1:200 em tampão PBS-T contendo 4% de leite em pó desnatado, em duplicatas. Após período de incubação a 37 °C por 1h, as microplacas foram lavadas por dez vezes com a solução de PBS-T.

Conjugado – Após o processo de lavagem, as microplacas foram novamente incubadas a 37 °C por 1h, com 50 µl/poço do conjugado anti-IgG humana ligada a peroxidase (KPL, H+L, USA) em uma diluição de 1:4000 com PBS-T contendo 4% de leite em pó desnatado.

Revelação – Após a incubação, foram realizadas dez lavagens e, então as microplacas foram reveladas, acrescentando-se 50 µl/poço de uma solução contendo TMB (Tetrametilbenzidina – BD Pharmingen). A reação foi interrompida após 20 minutos pela adição de 25 µl de uma solução de ácido clorídrico 2 N.

Leitura - A absorbância foi medida com filtro de 450 nm a partir da leitura das microplacas em um leitor automático de ELISA (Epoch, Biotec). A absorbância obtida utilizando o antígeno controle (GST) foi subtraída da absorbância obtida com os antígenos-teste (Sal I_{II-IV}-GST e MSP1-₁₉) para que a absorbância específica contra a proteína expressa em fusão com GST fosse determinada.

Os soros de indivíduos utilizados como controles negativo eram oriundos de São Paulo (SP), gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a Irene da Silva Soares (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo). Esses indivíduos não foram expostos à malária e nunca estiveram em área endêmica. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos foi previamente estabelecida pela média das absorbâncias produzidas pelos soros desses 26 indivíduos, acrescida de dois ou três desvios-padrão. O limite de positividade ou *cut-off* de dois desvios-padrão, foi de 0,232 para a proteína recombinante Sal I_{II-IV}-GST e de 0,153 e 0,184 para ambas proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His, respectivamente e 0,356 para MSP1₁₉. Já o limite de positividade ou *cut-off* de três desvios-padrão, foi de 0,300 para a proteína recombinante Sal I_{II-IV}-GST e de 0,178 e 0,214 para ambas proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-

His, respectivamente e, 0,494 para MSP1₁₉. Para todas as análises estatísticas utilizadas no presente estudo, foram utilizados os índices de reatividade obtidos com dois desvios-padrão.

A partir disso, foi calculado o Índice de Reatividade (IR), em que o valor final da absorbância de cada amostra foi dividido pelo *cut-off*, estabelecendo assim que indivíduos com IR acima de 1 são respondedores, abaixo, não-respondedores para a proteína de interesse.

$$IR = \frac{\text{Valor de absorbância da amostra}}{\text{Cut-off}}$$

3.3.7 Teste de aderência das proteínas nas microplacas

Para descartar a hipótese de que os antígenos do presente estudos estavam aderindo corretamente às microplacas de ELISA, foi realizado um teste de aderência. As microplacas foram sensibilizadas como de costume, porém, após as 14 - 18 h de incubação, ao invés de descartadas as proteínas para a realização do ensaio, as mesmas foram novamente inseridas em uma nova microplaca e armazenada a 4 °C até o dia seguinte. Então, com essa segunda microplaca foi realizado um novo ELISA, assim como com a microplaca inicial. Foram utilizadas as mesmas amostras nos dois ensaios e então, comparados os resultados.

A figura a seguir, mostra a disposição das amostras na microplaca de ELISA. Cada proteína foi sensibilizada em linhas e cada amostra foi adicionada em duplicata. O ensaio foi realizado sob as mesmas condições que o utilizado durante todo trabalho. Nas colunas finais da microplaca (11 e 12) foram colocadas as amostras de controle negativos. A figura 14 mostra o esquema de microplaca utilizada para esse teste de aderência.

Figura 14 – Esquema da disposição das amostras para teste de aderência.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sal I _{II-IV} -GST										C-	C-
B	MSP1 ₁₉										C-	C-
C	Sal I _{II} -His										C-	C-
D	O _{II} -His										C-	C-

Nota: As proteínas foram adicionadas em duplicatas, nas posições das linhas da microplaca. Os controles negativos foram adicionados também em duplicata, nas colunas 11 e 12.

3.3.8 Avaliação do polimorfismo da região II da PvDBP (DBPII) através de sequenciamento do DNA

O DNA, extraído de indivíduos com malária durante todos os inquéritos, foi utilizado para avaliar o polimorfismo presente dentro do domínio II da proteína *Duffy binding protein* do *P. vivax* (PvDBP). Para isso, oligonucleotídeos específicos foram utilizados, visando-se amplificar um fragmento de 675 pb (nucleotídeos 870-1545) da proteína. Posteriormente, estes fragmentos foram seqüenciados. A primeira PCR foi realizada em volumes de 20 µl, utilizando-se (Figura 15):

Figura 15 – Mix de reação e programa utilizados nas PCR.

Mix da reação
Tampão 10x High Fidelity PCR
10 mM dNTP (0,2 mM)
50 mM MgSO ₄ (2 mM)
Primer Mix (0,2 μM)
Taq High Fidelity Platinum (1 unidade)
Amostra de DNA: 3 μl

Programa	
94 °C – 2 minutos – 1x	
94 °C – 30 segundos	36x
55 °C – 30 segundos	
68 °C – 1 minuto	
15 °C - ∞	

Para obter uma concentração maior de fragmentos de DNA para o sequenciamento, foi realizada uma segunda reação de amplificação a partir do primeiro produto de PCR. Na segunda reação, foram utilizados os mesmos primers, porém para um volume final de 50 µl. As condições de PCR foram as mesmas utilizadas anteriormente.

Os iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento da região II da molécula de PvDBP, foram descritos por Souza et al. (2006), e se encontram na Figura 16:

Figura 16 – Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na amplificação e sequenciamento da região II de PvDBP.

Ensaio	Oligonucleotídeos (5' - 3')
Seq 1	F: ATGTATGAAGGAACTTACGAAT
	R: ACCTGCCGTCTGAACCTTTT

Após a segunda PCR, foi feito um gel de agarose a 1% e os fragmentos específicos visualizados em luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas específicas para PvDBP (140 kDa), foram tratadas através do sistema de purificação (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE, Reino Unido) conforme recomendações do fabricante e devidamente quantificadas (Epoch, Biotec).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o tampão Big Dye Termination v3.1 Cycle Sequence mixture (Applied Biosystems). Nessas reações, foram utilizados os produtos amplificados e devidamente tratados pela segunda PCR. A cada poço de uma placa de 96 poços, com volume final da reação de 10 µl/poço, foram adicionados (Figura 17):

Figura 17 – Mix de reação e programa utilizados no sequenciamento.

Mix da reação (10 µl)
DNA (~ 100 – 200 ng)
Primer (3,3 µM)
3,25 µl de Tampão Save Money
0,75 µl de <i>Big Dye Terminator</i>

Programa	
96 °C – 1 minuto – 1x	
96 °C – 15 segundos	30x
50 °C – 15 segundos	
60 °C – 4 minutos	
15 °C - ∞	

As reações foram realizadas em termociclador automático (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems). Após esse processo, o DNA foi precipitado adicionando-se 90 µl de Isopropanol a 66%. O homogeneizado foi incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente, sob proteção contra luz e centrifugado a 2464 g por 60 minutos. O sobrenadante

foi removido por inversão da placa e o sedimento lavado com 150 µl de isopropanol a 75%. A placa foi então centrifugada a 2464 g durante 30 min. O sobrenadante foi descartado e a placa colocada para um pulso de 45 g por 30 segundos, com a placa invertida sobre papel absorvente. O restante do álcool foi deixado evaporar por cerca de 10 minutos à temperatura ambiente, longe da luz e, então as placas foram armazenadas a - 20 °C. Após essas etapas, o produto foi levado ao sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

A identificação dos polimorfismos de base única (SNPs) foi feita a partir do alinhamento das sequências utilizando o programa ClustalX 2.1 (LARKIN et al., 2007). No programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL et al., 1999) foi realizada a edição manual do sequenciamento. As análises do gene *dbpII* foram conduzidas utilizando 25 sequências deste gene, encontradas por Souza et al. (2010), para *P. vivax* na região do Acre, depositadas no *GenBank* (EU812839 à EU812960) e foi utilizada como cepa de referência Sal I (El Salvador, número de acesso M61095). As sequências nucleotídicas foram analisadas pelo MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

3.4 Análise estatística

Um banco de dados foi criado no SPSS 16.0. Todas as análises estatísticas e dos dados descritivos foram realizados nesse mesmo programa. Os testes de associação e correlação entre os dados sorológicos e as características dos indivíduos (diagnóstico de malária, tempo moradia em região Amazônica e genótipo Duffy) utilizados foram o teste do qui-quadrado, o teste de qui-quadrado para tendências de Mantel e o teste de correlação não-paramétrica de Spearman. A análise de concordância entre os índices de reatividade (IR) das proteínas analisadas pelo teste de concordância de Kappa. As comparações entre dois grupos independentes de índices de reatividade de anticorpos foram feitas pelo teste não-paramétrico de Mann-Witney. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as proporções de respostas positivas observadas em amostras pareadas de indivíduos com e sem malária vivax entre as duas coletas.

3.5 Aspectos éticos

Os únicos riscos a que os sujeitos de pesquisa foram expostos são aqueles decorrentes de punção venosa para coleta de sangue (dor local, com mínima possibilidade de sangramento local). O uso de material descartável para coleta de sangue, associado à assepsia local, reduziram ao mínimo o risco de infecção local decorrente da punção venosa ou de polpa digital. O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

4 RESULTADOS

4.1 Amostra analisada

Participaram do estudo 343 indivíduos, que possuíam pelo menos uma amostra coletada em um dos inquéritos transversais realizados (março-abril/2010, junho-julho/2010 e fevereiro-março/2011). Desses, 55,4% pertenciam ao sexo masculino (190) e 44,6% (153) ao sexo feminino. Dos indivíduos participantes, 39,4% (135) possuem uma segunda amostra de plasma coletada e 12,2% (42) uma terceira, totalizando 520 amostras para a análise da resposta de anticorpos contra as proteínas de interesse. Então, 51,6% dos indivíduos analisados possuem mais de uma amostra de plasma coletada e analisada por ELISA.

A maioria dos indivíduos inseridos no estudo reside no Ramal do Remansinho, que conta com a participação de 229 indivíduos. Em seguida, temos 57 indivíduos do Ramal da Castanheira, 26 do Ramal Linha 1, 15 dos Goianos e 16 dos Seringueiros. A idade varia de 2 meses a 71 anos, com média de 27,4 anos e desvio padrão de 18,4. Do total de indivíduos analisados, 40,5% (139) tiveram sua primeira amostra coletada no primeiro inquérito transversal, 31,8% (109) no segundo e 27,7% (95) no terceiro inquérito. O tempo de moradia na Amazônia, principal indicador de exposição cumulativa à malária, foi registrado para 337 indivíduos, variando de 2 meses a 65 anos, com média de 17,9 anos e desvio padrão de 14,9.

4.2 Diagnóstico de malária

4.2.1 Diagnóstico microscópico

Conforme descrito nos materiais e métodos, durante a punção venosa, foram coletadas lâminas para leitura de gota espessa para diagnóstico de infecções maláricas em campo. De todos os inseridos, 98,2% (337) possuem esse dado para análise. Desses, 8,2% (28) foram positivos para *P. vivax*, enquanto que nenhum indivíduo foi detectado com *P. falciparum*.

4.2.2 Diagnóstico molecular

Do total de amostras analisadas, 97,4% (334) possuem diagnóstico molecular de malária por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real. Nessa análise, 15,4% (53) apresentaram infecções por *P. vivax*, 4,4% (15) infecções por *P. falciparum* e somente 0,6% (2) apresentaram infecções mistas com ambas as espécies.

4.3 Resposta de anticorpos contra PvDBP e MSP1₁₉

O padrão de respostas de anticorpos contra as variantes de PvDBP e MSP1₁₉- GST foi analisado por ELISA. Dos 343 indivíduos que possuíam pelo menos uma amostra inserida no estudo, 14,3% (49), foram positivas para a presença de anticorpos contra Sal I_{II-IV}-GST. A porcentagem de respondedores para as proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His, foram de 43,7% (150) e 39% (134), respectivamente. Desse total de amostras, 38,8% (133) foram capazes de responder contra MSP1₁₉-GST. Todas essas análises, assim como todas as que envolviam o presente estudo, foram realizadas utilizando para cálculo do IR a média dos controles negativos, acrescida de dois desvios-padrão (2DP).

Para verificarmos se a porcentagens de indivíduos que respondiam as proteínas estudadas sofriam alguma variação, quando acrescido à média dos negativos mais três desvios-padrão (3DP), foi possível identificar que a resposta contra cada anticorpo se manteve de forma semelhante. Agora com 3DP, do total de indivíduos participantes, 9,6% (33) das amostras foram positivas para Sal I_{II-IV}-GST; 39,6% (136) mostraram-se responsivos para Sal I_{II}-His; 35,6% (122) responderam à O_{II}-His e finalmente 30,9% (106) responderam contra MSP1₁₉- GST.

4.3.1 Concordância de respostas contra diferentes antígenos derivados de PvDBP e MSP1₁₉

Para avaliar os níveis de concordância entre a porcentagem de respondedores contra cada par de proteínas foi utilizada a análise de concordância Kappa (K). Esse teste estatístico é baseado no número de respostas concordantes entre duas variáveis, corrigindo para a concordância esperada ao acaso. Seu valor máximo é de 1 (concordância perfeita). Para essa análise, utilizamos o total de amostras inseridas no estudo (520).

Entre Sal I_{II-IV}-GST e variante Sal I_{II}-His, foram encontrados 10,3% (54) respondedores para ambas ao mesmo tempo, dentre todos os indivíduos (520). Não responderam a nenhuma das duas proteínas inseridas nessa análise 48,8% (254) indivíduos do estudo. Do total de amostras, apenas 4% (21) responderam somente a Sal I_{II-IV}-GST. Por outro lado, 191 (36,7%) das amostras responderam apenas ao antígeno Sal I_{II}-His. O teste Kappa mostrou baixa concordância entre essas duas proteínas ($\kappa = 0,150$). A Tabela 1 mostra a relação entre as respostas contra essas duas proteínas.

Tabela 1 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes Sal I_{II-IV}-GST e Sal I_{II}-His.

		Sal I _{II-IV} -GST	
		+	-
Sal I _{II} -His	+	10,3% (54)	36,7% (191)
	-	4% (21)	48,8% (254)
Total		520	

Nota: Os sinais de positivo (+) correspondem ao número de indivíduos respondedores contra cada proteína e negativo (-) não respondedores.

O mesmo teste foi aplicado com as proteínas Sal I_{II-IV}-GST e O_{II}-His. De todos os inseridos no estudo, 9,4% (49) foram respondedores para ambas as proteínas analisadas. Não responderam a nenhuma das duas 55,4% (288) dos inseridos. Foram capazes de responder apenas a variante O_{II}-His 30,2% (157) das amostras, enquanto que apenas 5% (26) foram capazes de responder apenas a proteína recombinante Sal I_{II-IV}-GST. Novamente, o teste de Kappa apresentou baixa concordância na resposta contra as duas proteínas ($\kappa = 0,174$). A Tabela 2 mostra a relação entre as respostas contra essas duas proteínas.

Tabela 2 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes Sal I_{II-IV}-GST e O_{II}-His.

		Sal I _{II-IV} -GST	
		+	-
O _{II} -His	+	9,4% (49)	30,2% (157)
	-	5% (26)	55,4% (288)
Total		520	

Nota: Os sinais de positivo (+) correspondem ao número de indivíduos respondedores contra cada proteína e negativo (-) não respondedores.

A comparação das respostas para Sal I_{II-IV}-GST e MSP1₁₉-GST, também foi realizada. Os dados mostram que 8,5% (44) do total de amostras, responderam as duas proteínas ao mesmo tempo. Desse total, 52,5% (273) não foi capaz de responder a nenhuma proteína da associação em questão. Somente 6% (31) foram respondedores somente para Sal I_{II-IV}-GST, enquanto que 33% (172) foram respondedores somente para MSP1₁₉-GST. O teste Kappa revelou baixa concordância ($\kappa = 0,112$) entre essas duas proteínas. A tabela 3 mostra a relação entre as respostas contra essas proteínas.

Tabela 3 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra a variante Sal I_{II-IV}-GST e a proteína MSP1₁₉-GST.

		Sal I _{II-IV} -GST	
		+	-
MSP1 ₁₉ -GST	+	8,5% (44)	33% (172)
	-	6% (31)	52,5% (273)
Total		520	

Nota: Os sinais de positivo (+) correspondem ao número de indivíduos respondedores contra cada proteína e negativo (-) não respondedores.

Quando comparamos MSP1₁₉-GST com Sal I_{II}-His, encontramos que 28,8% (150) dos inseridos no estudo foram capazes de responder a essas duas proteínas. Do total analisado,

40,2% (209) não produziu anticorpos contra os dois antígenos em questão. Foram capazes de responder apenas a Sal I_{II}-His 18,3% (95) e 12,7% (66) apenas a recombinante MSP1₁₉-GST. A concordância entre as duas proteínas é razoável ($\kappa = 0,375$). A Tabela 4 mostra a relação entre as respostas contra essas duas proteínas.

Tabela 4 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra a proteína MSP1₁₉-GST e a variante Sal I_{II}-His.

		Sal I _{II} -His	
		+	-
MSP1 ₁₉ -GST	+	28,8% (150)	12,7% (66)
	-	18,3% (95)	40,2% (209)
Total		520	

Nota: Os sinais de positivo (+) correspondem ao número de indivíduos respondedores contra cada proteína e negativo (-) não respondedores.

Ainda analisando a concordância ente antígenos, quando comparamos as proteínas MSP1₁₉-GST e O_{II}-His, encontramos que 26%(135) dos indivíduos foram capazes de responder a essas suas proteínas ao mesmo tempo, enquanto que 44,8% (233) não foram capazes de responder a nenhuma delas. Entre as amostras analisadas, 15,6% (81) se mostraram respondedores somente para MSP1₁₉-GST, enquanto 13,6% (71) se mostraram respondedores apenas para o antígeno recombinante O_{II}-His. O nível de concordância entre as duas é considerado razoável ($\kappa = 0,375$). A Tabela 5 mostra a relação entre as respostas contra essas duas proteínas.

Tabela 5 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra a proteína MSP1₁₉-GST e a variante O_{II}-His.

		O _{II} -His	
		+	-
MSP1 ₁₉ -GST	+	26% (135)	15,6% (81)
	-	13,6% (71)	44,8% (233)
Total		520	

Nota: Os sinais de positivo (+) correspondem ao número de indivíduos respondedores contra cada proteína e negativo (-) não respondedores.

Finalmente, a comparação da resposta contra as duas variantes PvDBP, Sal I_{II}-His e O_{II}-His foi realizada. O maior índice de concordância foi encontrado entre essas duas proteínas. Do total de amostras analisados, 34% (177) foram positivos para a presença de anticorpos contra essas duas variantes. Não foram capazes de responder a nenhuma das duas 47,3% (246) dos inseridos. De todas as amostras, 5,6% (29) responderam apenas a O_{II}-His, enquanto que 13% (68) apenas para Sal I_{II}-His. O teste Kappa mostrou ótima concordância na resposta contra essas duas proteínas ($\kappa = 0,622$). A Tabela 6 mostra a relação entre as respostas contra essas duas proteínas.

Tabela 6 – Relação de concordância entre respostas de anticorpos dos indivíduos do estudo contra as variantes Sal I_{II}-His e O_{II}-His.

		O _{II} -His	
		+	-
Sal I _{II} -His	+	34% (177)	13% (68)
	-	5,6% (29)	47,3% (246)
Total		520	

Nota: Os sinais de positivo (+) correspondem ao número de indivíduos respondedores contra cada proteína e negativo (-) não respondedores.

A Figura 18 mostra a correlação entre os índices de reatividades obtidos com diferentes pares de antígenos recombinantes. Foi calculado o coeficiente de correlação entre os Índices

de Reatividade das três proteínas pelo teste de correlação de Spearman, levando-se em conta todas as amostras do estudo (520). Mais uma vez, as proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His mostraram estar fortemente relacionadas ($\rho = 0,725$, $P = 0,0001$). A correlação entre os IR de Sal I_{II-IV}-GST com as demais proteínas mostrou-se fraca, ainda que significativa, tanto para Sal I_{II}-His ($\rho = 0,419$, $P = 0,0001$), O_{II}-His ($\rho = 0,302$, $P = 0,0001$) e para MSP1₁₉-GST ($\rho = 0,240$, $P = 0,0001$). Os IR de MSP1₁₉-GST mostraram-se também significativo, correlacionados com as proteínas recombinantes com cauda histina, Sal I_{II}-His ($\rho = 0,485$, $P = 0,0001$) e O_{II}-His ($\rho = 0,438$, $P = 0,0001$).

Figura 18 – Correlação entre os índices de reatividades obtidos com diferentes pares de antígenos recombinantes.

Nota: Cada círculo representa o Índice de Reatividade de cada amostra para as proteínas.

4.4 Respostas de anticorpos e malária atual

A presença de anticorpos contra as proteínas nos indivíduos com ou sem malária vivax, foram analisadas através do teste de qui-quadrado (teste χ^2). Das 520 amostras de indivíduos utilizadas nessa análise, 15% (78) deles, apresentaram confirmação de malária (através de lâmina espessa e/ou PCR em Tempo Real) causada por *P. vivax*. A proteína Sal I_{II-IV}-GST foi reconhecida por 17,9% (14) do total de indivíduos com malária (78). Daqueles que não apresentavam malária no momento da coleta de sangue, representando 85% (442) do total de indivíduos, 13,8% (61) foram capazes de responder contra essa proteína. O reconhecimento de Sal I_{II-IV}-GST por anticorpos e a presença de malária vivax não foram associados estatisticamente ($\chi^2 = 0,381$, $P = 0,212$).

Em relação à proteína Sal I_{II}-His, dos 78 indivíduos que apresentaram diagnóstico confirmado de malária, 70,5% (55) apresentaram anticorpos contra essa variante de PvDBP. Daqueles que não apresentaram malária vivax (442 indivíduos), 43% (190) possuem anticorpos específicos contra esse antígeno. Esses dados mostraram uma associação significativa entre a resposta contra a proteína Sal I_{II}-His para a presença de malária vivax ($\chi^2 = 0,0001$; $P = 0,0001$).

Do total de indivíduos infectados com *P. vivax*, 53,8% (42) possuem anticorpos contra a proteína O_{II}-His. Daqueles não infectados, 37,1% (164) respondem a essa proteína, mesmo sem diagnóstico de malária no momento da coleta. Esses dados mostraram associação significativa entre a resposta contra a proteína O_{II}-His e a presença de malária vivax ($\chi^2 = 0,008$; $P = 0,004$).

O antígeno recombinante MSP1₁₉-GST foi reconhecido por 57,7% (45) dos indivíduos infectados com *P. vivax*. Entre aqueles não infectados, foi possível observar a presença de 38,7% (171) de respondedores. Tais dados mostram associação significativa entre respostas contra o antígeno MSP1₁₉-GST e a presença de malária vivax no momento da coleta ($\chi^2 = 0,003$; $P = 0,001$). As informações listadas acima encontram-se na Tabela 7:

Tabela 7 – Porcentagens (número absoluto entre parênteses) de indivíduos que possuem anticorpos contra as proteínas listadas, de acordo com o diagnóstico ou não de malária vivax.

	Malária vivax	Sem infecção diagnosticada	<i>P</i>
Sal I_{II-IV}- GST	17,9% (14)	13,8% (61)	0,212
Sal I_{II}-His	70,5% (55)	43% (190)	0,0001
O_{II}-His	53,8% (42)	37,1% (164)	0,004
MSP1₁₉-GST	57,7% (45)	38,7% (171)	0,001
Total	78	442	

Ainda para comparar os Índices de Reatividade (IR) entre aqueles que apresentaram diagnóstico positivo para malária ou não, foi realizado o teste de Mann-Whitney. Esse teste revelou que maiores valores de IR são encontrados entre os indivíduos com diagnóstico de malária vivax, comparados aos não infectados, tanto para Sal I_{II-IV}-GST ($P=0,003$), MSP1₁₉-GST ($P=0,001$) como para as demais proteínas (Sal I_{II}-His e O_{II}-His; $P=0,0001$, para ambas).

4.5 Resposta de anticorpos e exposição cumulativa à malária

Para verificar se o tempo de moradia na Amazônia (variável que mede a exposição cumulativa à malária) estava associado à presença de anticorpos, foram selecionados 337 amostras colhidas no momento da entrada dos indivíduos no estudo. Esses indivíduos foram divididos, segundo o tempo de exposição, em quatro grupos de tamanho semelhante (quartis): o primeiro inclui aqueles de dois meses a cinco anos de exposição ($n=89$); o segundo, de seis anos a treze anos e meio ($n=81$); o terceiro, de catorze a vinte e nove anos ($n=91$); o quarto, de trinta a sessenta anos ($n=76$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagens (número absoluto entre parenteses) de indivíduos que produziram respostas de anticorpos contra cada proteína recombinante, relacionados com o tempo de moradia na Amazônia.

	2 meses a 5 anos	6 a 13,5 anos	14 a 29 anos	30 a 65 anos
Sal I_{II-IV}- GST	10,1% (9)	12,3% (10)	13,2% (12)	22,4% (17)
Sal I_{II}-His	29,2% (26)	40,7% (33)	50,5% (46)	56,6% (43)
O_{II}-His	31,5% (28)	35,8% (29)	39,6% (36)	50% (38)
MSP1₁₉-GST	29,2% (26)	38,3% (31)	46,1% (42)	42,1% (32)
Total	89	81	91	76

De uma maneira geral, foi possível observar que o quarto grupo apresenta a maior proporção de respondedores. A menor proporção se encontra no primeiro grupo. Entre o segundo e o terceiro grupo, não foram observados mudanças significativas.

Para analisar as correlações entre os índices de reatividade (IR) obtidos de cada proteína e o tempo de moradia na Amazônia, foi aplicado o teste de correlação de Spearman. Os índices de reatividade se mostraram significativamente correlacionados com o tempo de exposição à malária para todas as proteínas Sal I_{II-IV}-GST ($\rho = 0,134$; $P = 0,014$), O_{II}-His ($\rho = 0,141$; $P = 0,01$), Sal I_{II}-His ($\rho = 0,261$; $P = 0,0001$) e MSP1₁₉-GST ($\rho = 0,154$; $P = 0,005$).

Quando aplicamos o teste qui-quadrado para tendências, confirmamos que a proporção de respondedores para as proteínas Sal I_{II-IV}-GST ($\chi^2 = 4,479$; $P = 0,03$), Sal I_{II}-His ($\chi^2 = 14,407$; $P = 0,0001$), O_{II}-His ($\chi^2 = 5,910$; $P = 0,01$) e MSP1₁₉-GST ($\chi^2 = 4,113$; $P = 0,04$), tende a aumentar a medida que aumenta os anos de moradia (exposição) dos mesmos em área endêmica.

4.6 Respostas de anticorpos em amostras consecutivas

Na análise seguinte, comparamos a prevalência de anticorpos contra cada proteína detectada por ELISA em amostras pareadas, obtidas de indivíduos que realizaram exame microscópico de gota espessa entre os inquéritos transversais. Participaram dessa análise quarenta e seis indivíduos que possuíam pelo menos duas amostras coletadas e realizaram exame de gota espessa em campo até três meses antes da última amostra coletada. Os dados relativos à resposta de anticorpos contra cada proteína encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Prevalência de anticorpos adquiridos para PvDBP em amostras pareadas em relação à episódios de malária entre os cortes.

Diagnóstico de malária entre as amostras pareadas								
	Sal I_{II-IV}- GST		Sal I_{II}-His		O_{II}-His		MSP1₁₉ - GST	
	Malária -	Malária +	Malária -	Malária +	Malária -	Malária +	Malária -	Malária +
-/-	1	30	0	7	0	15	0	7
-/+	0	7	0	11	0	7	0	12
+/-	0	5	0	7	0	4	0	7
+/+	0	3	1	20	1	19	1	19

Nota: (+) e (-) significam, respectivamente, a presença de anticorpos contra cada antígeno no momento da coleta da amostra. O primeiro símbolo (+ ou -) refere-se à primeira amostra de cada par e o segundo símbolo refere-se à segunda amostra. Malária + e Malária – significam a ocorrência ou não de episódio de malária vivax, confirmado por microscopia, até três meses antes da coleta da segunda amostra.

Através do teste exato de Fisher, verificamos se o fato do indivíduo possuir anticorpos contra alguma variante de PvDBP e MSP1₁₉- GST, na primeira amostra, poderia diminuir o risco de malária subsequente. De acordo com nossas análises, não existe associação entre ter anticorpos específicos na primeira amostra coletada e não sofrer episódio de malária posterior ($P=1$, para todas as proteínas).

Ainda nesse contexto, avaliamos se o fato do indivíduo ter malária vivax diagnosticada entre as coletas aumenta a probabilidade de ter anticorpos contra PvDBP e MSP1₁₉- GST em sua amostra seguinte. O teste exato de Fisher ($P=1$, para todas as proteínas) revelou que o fato do indivíduo ter ou não diagnóstico de malária entre os cortes não aumentou as chances de sua segunda amostra ser positiva para a presença de anticorpos anti-PvDBP ou anti-MSP1₁₉- GST.

4.7 Genótipos do grupo sanguíneo Duffy

A genotipagem de Duffy foi realizada em 339 indivíduos; as frequências de cada genótipo encontrado estão listadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Genótipo Duffy e frequência correspondente na população estudada.

Genótipo	Frequência
FY*AFY*A	13,0% (44)
FY*BFY*B	17,1% (58)
FY*AFY*B	28,9% (98)
FY*AF*B ^{ES}	20,0% (68)
FY*BF*B ^{ES}	14,4% (49)
FY*B ^{ES} FY*B ^{ES}	6,5% (22)

4.8 Genótipos Duffy e resposta de anticorpos

A associação entre o genótipo Duffy com a presença ou ausência de anticorpos contra cada proteína estudada encontra-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Respondedores para as proteínas analisadas de acordo com genótipo Duffy do indivíduo. As porcentagens (número absoluto entre parênteses) indicam dentro de cada genótipo quantos responderam a proteína em questão.

	FY*A	FY*A	FY*A	FY*B	FY*B	FY*B ^{ES}
	FY*A	FY*B	FY*B ^{ES}	FY*B	FY*B ^{ES}	FY*B ^{ES}
Sal I_{II-IV}-GST	15,9%	18,4%	11,8%	17,2%	6,1%	13,6%
	(7)	(18)	(8)	(10)	(3)	(3)
Sal I_{II}-His	52,3%	43%	58,9%	44,8%	36,7%	0%
	(23)	(42)	(40)	(26)	(18)	(0)
O_{II}-His	50%	41,8%	45,6%	39,7%	30,6%	9,1%
	(22)	(41)	(31)	(23)	(15)	(2)
MSP1₁₉- GST	36,4%	41,8%	42,6%	32,7%	30,6%	50%
	(16)	(41)	(29)	(19)	(15)	(11)
Total	44	98	68	58	49	22

O padrão de resposta de anticorpos foi comparado segundo o genótipo do grupo sanguíneo Duffy dos indivíduos. Conforme o esperado, aqueles que possuem o genótipo $FY*B^{ES}FY*B^{ES}$, representaram o grupo os menor número de respondedores para as proteínas Sal I_{II-IV} -GST (13,6% [3]), O_{II} -His (9,1% [2]) e nenhum contra Sal I_{II} -His. Em contrapartida, esse padrão não foi estendido em relação a resposta contra proteína MSP1₁₉-GST, que revelou que indivíduos pertencentes a esse grupo possuem o maior número de respondedores (50% [11]). Daqueles com genótipo $FY*AFY*A$; 15,9% (7) foram capazes de responder contra Sal I_{II-IV} -GST; 52,3% (23) contra Sal I_{II} -His; 50% (22) contra O_{II} -His e 36,4% (16) contra MSP1₁₉-GST. Do número total de pertencentes ao genótipo $FY*AFY*B$, 18,4% (18) foram responsivos contra Sal I_{II-IV} -GST; 43% (42) contra Sal I_{II} -His; 41,8% (41) contra O_{II} -His e 41,8% (41) à MSP1₁₉-GST. Do total de indivíduos com genótipo $FY*AFY*B^{ES}$; 11,8% (8) deles foram capazes de responder à Sal I_{II-IV} -GST; 58,9% (40) para Sal I_{II} -His; 45,6% (31) à O_{II} -His e 42,6% (29) contra MSP1₁₉-GST. Dos inseridos no grupo $FY*BFY*B$; 17,2% (10) responderam à Sal I_{II-IV} -GST; 44,8% (26) à Sal I_{II} -His; 39,7% (23) à O_{II} -His e 32,7% (19) à MSP1₁₉-GST. E por fim, aqueles com genótipo $FY*BFY*B^{ES}$; 6,1% (3) responderam contra Sal I_{II-IV} -GST, 36,7% (18) para Sal I_{II} -His; 30,6% (15) para O_{II} -His e 30,6% (15) à MSP1₁₉-GST.

Como o resultado para a resposta contra MSP1₁₉-GST do grupo de genótipo Duffy negativo ($FY*B^{ES}FY*B^{ES}$) mostrou valores inesperados, uma nova placa de ELISA foi sensibilizada com esse antígeno, a fim de avaliar novamente a resposta desses indivíduos contra essa variante. Por fim, foi mantido o mesmo padrão de resposta inicialmente descrito dentre os inseridos nesse grupo.

O teste χ^2 revelou que as prevalência de respondedores contra os antígenos Sal I_{II} -His e O_{II} -His é estatisticamente significativa de acordo com o genótipo Duffy da população ($P = 0,0001$ e $P = 0,02$; respectivamente), o que não ocorre na resposta contra Sal I_{II-IV} -GST ($P = 0,376$) e MSP1₁₉-GST ($P = 0,259$).

4.9 Diagnóstico de infecção por *P. vivax* em indivíduo Duffy negativo

Dentre os 22 indivíduos genotipados como Duffy negativos, um deles, apresentou-se positivo para o diagnóstico por PCR em tempo real para a presença de parasitos de *P. vivax*. Nesse indivíduo especificamente, foi realizado um PCR-ASP (PCR alelo-específico), para confirmação de genotipagem, no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, da Fiocruz de Belo Horizonte (MG), onde as outras genotipagens foram realizadas.

A reação de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária revelou baixa parasitemia (5,97 parasitos/ul).

4.10 Teste de aderência das proteínas nas microplacas

O teste de aderência foi realizado a fim de verificar se houve uma boa aderência de antígenos na microplaca. Conforme descrito em matérias e métodos, as proteínas foram adicionadas à primeira microplaca e após 14- 18h retiradas e inseridas a uma segunda microplaca. Após a lavagem das mesmas foi realizado o ELISA, conforme descrito anteriormente. A Figura 19 mostra a absorbância das amostras após a realização do primeiro ELISA.

Figura 19 – Valores das absorbâncias da primeira microplaca do teste de aderência.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,448		0,410		0,361		0,378		0,387		0,019	
B	0,353		0,540		0,736		1,031		0,478		0,006	
C	0,741		0,726		0,892		0,734		0,895		0,063	
D	0,814		0,798		0,900		0,718		0,898		0,056	

Nota: Cada linha foi sensibilizada com uma proteína, em duplicata. Na primeira linha (A) está presente a proteína Sal I_{II-IV}-GST, seguida de MSP1₁₉ (B), Sal I_{II}-His (C) e finalmente O_{II}-His (D). Nas duas ultimas colunas da placa estão presentes os controles negativos (11 e 12). As absorbâncias já estão informadas na forma de média das duplicatas e descontados os devidos valores de GST (para Sal I_{II-IV}-GST e MSP1₁₉).

Foram selecionadas amostras que possuíam valores altos de IR para todas as proteínas estudadas. Conforme o esperado, todas se apresentaram com valores altos de absorbância, em relação aos negativos.

No dia seguinte foi então realizado o segundo ELISA, sob a mesmas condições e amostras do primeiro. A Figura 20 mostra a absorbância das amostras após a leitura da segunda microplaca.

Figura 20 – Valores da segunda microplaca de ELISA após a leitura das absorvâncias.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,006		0,007		0,005		0,017		0,007		0,012	
B	0,173		0,100		0,300		0,257		0,189		0,001	
C	0,079		0,067		0,064		0,117		0,059		0,062	
D	0,075		0,067		0,074		0,097		0,060		0,063	

Nota: Cada linha foi sensibilizada com uma proteína, em duplicata. Na primeira linha (A) está presente a proteína Sal I_{II-IV}-GST, seguida de MSP1₁₉ (B), Sal I_{II}-His (C) e finalmente O_{II}-His (D). As duas últimas colunas da placa estão presentes os controles negativos (11 e 12). As absorvâncias já estão informadas na forma de média das duplicatas e descontados os devidos valores de GST (para Sal I_{II-IV}-GST e MSP1₁₉).

De forma geral foi possível observar que houve uma boa aderência de antígenos após a sensibilização das microplacas, exceto para MSP1₁₉, que ainda apresentou altos valores de absorvância após o teste de aderência, o que era esperado, uma vez que esta proteína possui a característica de não possuir boa aderência em microplacas.

4.11 Diversidade de sequências no domínio II de PvDBP

Os resíduos polimórficos no domínio de ligação da região II de PvDBP, potencialmente importantes no reconhecimento da proteína pelo sistema imune, foram identificados a partir do DNA de 41 indivíduos infectados por *P. vivax*, confirmados por diagnóstico molecular. Em seguida, esses haplótipos do parasito foram alinhados com 25 sequências disponíveis no *GenBank* (EU812839 a EU812960), oriundas da região do Acre e descritas por Souza et al. (2010). Todas essas sequências foram alinhadas com a cepa de referência Salvador-I (M61095), objetivando identificar os principais polimorfismos presentes dentro dessa região da proteína, em amostras advindas de área amazônica brasileira. Foram analisadas 14 substituições nucleotídicas, correspondendo a 14 códons sabidamente polimórficos. A maioria dos polimorfismos não-sinônimos resultou na troca de aminoácidos com diferentes características físico-químicas (substituições não-radicais), exceto do resíduo R387R. A Tabela 12 mostra os resíduos polimórficos analisados, as amostras do estudo sequenciadas (preto), as amostras utilizadas para comparação (vermelho) e a frequência de cada haplótipo encontrado. Os resíduos conservados em relação a Sal I são representados por ponto (.); caso contrário, apresenta-se o aminoácido encontrado na referida posição.

Tabela 12 – Haplótipos da região II de PvDBP de *Plasmodium vivax*, com seus respectivos polimorfismos identificados entre 65 isolados da região amazônica.

(continua)

	R308S	L333F	K371E	N375D	R378R	G384D	E385K	K386N	H390R	N417K	I419M	L424I	W437R	I503K	F
Sal I	R	L	K	N	CGC	D	E	K	R	N	I	L	W	I	
O	S	.	.	.	.	G	.	.	H	.	.	I	.	.	
AC248, AC291	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3%
AC418	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	1,5%
AC277	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	K	1,5%
92 A, 176A, 307C, 175A, 133B, 149A, AC405, AC417, AC356, AC271, AC141	.	.	.	.	.	G	.	.	H	.	.	.	.	K	16,6%
AC373	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	R	K	1,5%
AC347, AC413	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	R	.	3%
AC267, AC380, AC463	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	R	K	4,5%
35A	.	.	.	.	.	G	.	.	H	.	.	.	.	.	1,5%

Tabela 12 – Haplótipos da região II de PvDBP de *Plasmodium vivax*, com seus respectivos polimorfismos identificados entre 65 isolados da região amazônica.

(continuação)

	R308S	L333F	K371E	N375D	R378R	G384D	E385K	K386N	H390R	N417K	I419M	L424I	W437R	I503K	F
Sal I	R	L	K	N	CGC	D	E	K	R	N	I	L	W	I	
O	S	.	.	.	.	G	.	.	H	.	.	I	.	.	
237C	.	.	.	.	CGT	G	K	N	.	.	.	.	R	.	1,5%
7A, 4A, 110A, 171A, 99A, 19A, 21C, 57A, 118A, 66A, 120A, 40B, 162C, 20A, 170C, 20C, 22A, 119A	.	.	E	.	.	G	.	.	.	K	M	I	R	.	28,8%
AC425															
AC312	.	.	E	.	.	G	K	N	.	K	.	I	R	.	1,5%
28A	.	.	.	.	CGT	G	K	.	H	.	.	.	R	K	1,5%
95A, 131B, 161B, 150C, 159A, AC419, AC265 AC326	.	.	.	.	CGT	G	K	N	H	.	.	.	R	K	12,1%

Tabela 12 – Haplótipos da região II de PvDBP de *Plasmodium vivax*, com seus respectivos polimorfismos identificados entre 65 isolados da região amazônica.

(conclusão)

	R308S	L333F	K371E	N375D	R378R	G384D	E385K	K386N	H390R	N417K	I419M	L424I	W437R	I503K	F
Sal I	R	L	K	N	CGC	D	E	K	R	N	I	L	W	I	
O	S	.	.	.	.	G	.	.	H	.	.	I	.	.	
195A	.	.	E	.	.	G	.	.	.	K	M	I	R	K	1,5%
179A, 310C	S	.	.	.	CGT	G	K	N	H	.	.	I	.	K	3%
160A	S	.	E	.	.	G	.	.	.	K	.	I	R	K	1,5%
96A	.	.	E	.	.	G	K	N	.	K	.	I	R	K	1,5%
AC250, AC440, AC42	.	F	.	D	CGT	G	K	N	.	K	.	I	R	.	4,5%
183A, 98A, 59A, 290C	S	.	E	.	.	G	K	N	.	K	.	I	R	K	6%
AC264	.	F	.	D	CGT	G	K	N	H	K	.	I	R	.	1,5%
AC372	.	F	.	D	CGT	G	K	N	.	K	.	I	R	K	1,5%

Nota: Resíduos conservados são representados por ponto (.). As amostras em vermelho pertencem a Souza et al (2010) (acesso à *GenBank* [EU812839 a EU812960]). As pretas são as sequenciadas encontradas e analisadas no presente estudo e F (frequência) se refere à frequência em que cada haplótipo se mostrou presente dentre as amostras analisadas.

A maior parte dos códons analisados no estudo foi também analisada em estudos semelhantes. Os respectivos códons da cepa Sal I e O foram descritos Tabela 15, para que se verificasse quanto desses haplótipos encontrados eram idênticos a tais cepas na sequência de aminoácidos de interesse. Foi possível verificar que nenhum dos haplótipos encontrados compartilhava, nas posições analisadas, os mesmos aminoácidos que as cepas Sal I e O. Portanto, nenhum isolado do presente estudo tem sequência do domínio II da PvDBP idêntico ao dessas duas cepas.

Dentre os códons analisados, Sal I e O compartilham de 10 posições de aminoácidos iguais. Sendo assim, dentro da região de interesse, ambos compartilham de 71,4% dos mesmos aminoácidos.

As amostras 7A, 4A, 110A, 171A, 99A, 19A, 21C, 57A, 118A, 66A, 120A, 40B, 162C, 119A, 20A, 170C, 20C, 22B e AC425 possuem sequência idêntica de aminoácidos dentro da região analisada e formam o haplótipo mais frequente, totalizando 28,8% do total. Quando comparadas com a sequência de Sal I, esses haplótipos apresentam os códons K371E, G384D, N417K, I419M, L424I e W437R, com polimorfismos não sinônimos, ou seja, os aminoácidos encontrados nessas regiões são diferentes daqueles encontrados nas mesmas regiões da cepa de referência Sal I. Sendo assim, dentre os 14 códons analisados, o haplótipo mais frequente e Sal I, compartilham de 57,1% de mesma sequência de aminoácidos. Quando comparado com a sequência do isolado mais frequente e a variante O, é possível notar que ambas apresentam os códons R308S, K371E, H390R, N417K, I419M, W437R, com polimorfismos não sinônimos. Então, dentre os 14 códons analisados, o haplótipo mais comum e O, compartilham também de 57,1% de mesma sequência de aminoácidos. Vale ressaltar que apenas um haplótipo do Acre (AC425) está inserido nesse grupo (em vermelho).

As amostras 149A, 92A, 176A, 307C, 175A, 133B AC405, AC417, AC356, AC271 e AC141, apresentaram 16,6% de frequência dentre os haplótipos encontrados. Três códons estão presentes nesse haplótipo: G384D, H390R e I503K, possuem polimorfismos não sinônimos nessas regiões em relação à cepa de referência Sal I, sendo assim, esse haplótipo compartilha de 78,5% de mesma sequência de aminoácidos. Em relação a variante O, os códons R308S, L424I e I503K, possuem polimorfismos não sinônimos. Então, esse haplótipo compartilha de 78,5% da mesma sequência de aminoácidos que O.

Em seguida, o haplótipo mais encontrado estava presente nas amostras 95A, 131B, 161B, 150C, 159A, AC419, AC265 e AC326, com frequência de 12,2% do total analisado. Esse haplótipo possui os códons R387R, G384D, E385K, K386N, H390R, W437 e I503K, com polimorfismos não sinônimos em relação à Sal I, compartilhando de 50% de mesma sequência

que a cepa adotada como referência. Em relação a cepa O, esse haplótipo possui os códons R308S, R378R, E385K, K386N, L424I, W437R e I503K, com polimorfismos não sinônimos em relação a essa variante, compartilhando também de 50% de mesma sequência que a cepa de comparação O.

As amostras 183A, 98A e 59A e 290C também formaram um haplótipo do qual não foi descrito dentre os comparados (SOUZA et al., 2010) e cuja frequência foi de 6% em relação ao total analisado. Esse haplótipo possui os códons R308S, K371E, G384D, E385K, K386N, N417K, L424I, W437R e I503K com polimorfismos não sinônimos em relação à referência Sal I. Sendo assim, esse haplótipo é o que menos compartilha da mesma sequência de aminoácidos de Sal I, com 35,7% de mesma sequência de aminoácidos entre esse haplótipo e Sal I. Em relação a O, os códons K371E, E385K, K386N, H390R, N417K, W437R e I503K são regiões com polimorfismos não sinônimos. Então, esse haplótipo possui 50% de semelhança em relação à região estudada com a variante O.

As amostras 179A e 310C, também formaram um haplótipo único, não presente entre as utilizadas para comparação, cuja frequência foi de 3%. Esse haplótipo possui os códons R308S, R378R, G384D, E385K, K386N, H390R, L424I e I503K com polimorfismos não sinônimos em relação à Salvador I. Então, pode-se afirmar que esse haplótipo compartilha de 42,8% dos mesmos aminoácidos dentro dessa região analisada que Sal I. Em relação a sequência de O, esse haplótipo especificamente difere nas seguintes posições dos códons: R387R, E385K, K386N. Sendo assim, o isolado possui 78,5% dos mesmos aminoácidos em relação aos aminoácidos dentre as regiões analisadas com a variante O.

Os demais isolados do estudo (amostras 35A, 28A, 195A, 160A e 96A) se mostraram como haplótipos únicos, ou seja, nenhuma outra amostra dentre os analisados apresentou a mesma sequência de aminoácidos. Esses haplótipos apresentaram frequência de 1,5%. Alguns haplótipos que foram utilizados como comparação (acesso à *GenBank* [EU812839 à EU812960]) também não apresentaram nenhuma amostra do presente estudo associada à eles. São os isolados: AC418, AC277, AC373, AC312, AC264 e AC372.

5 DISCUSSÃO

5.1 Diferenças conformacionais entre as proteínas utilizadas

Como foi possível observar, as proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His foram mais reconhecidas por anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos, em comparação com a variante Sal_{II-IV}-GST. Isso provavelmente ocorreu devido à estrutura conformacional das proteínas recombinantes Sal I_{II}-His e O_{II}-His se assemelhar àquela existente na PvDBP nativa, conforme descrito por Singh et al. (2001). Essas proteínas mais imunogênicas passaram por um processo adicional de processamento durante sua síntese, um redobramento extra, seguido de diversos processos de purificação, com propósito de que a exposição de seus epítomos fosse otimizada. Através de análises bioquímicas, biofísicas e funcionais, Singh et al. (2001) confirmaram que as proteínas em questão (Sal I_{II}-His e O_{II}-His) são altamente imunogênicas, como foi possível observar em nosso trabalho.

5.2 Resposta populacional de anticorpos anti-PvDBP contra as variantes testadas

A resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes Sal_{II}-His, O_{II}-His e Sal_{II-IV}-GST, derivadas de PvDBP, foi avaliada em amostras coletadas nos três inquéritos transversais realizados. Encontramos diferentes números de respondedores para cada proteína, sendo que aquelas sintetizadas de acordo com Singh et al. (2001), apresentaram um maior número de respondedores do que as produzidas de acordo com Cerávolo et al. (2005).

Os dados de resposta contra Sal_{II-IV}-GST, em nosso estudo, são comparáveis com os obtidos por Souza-Silva et al. (2010) em um assentamento agrícola do Acre. No trabalho anterior, observou-se percentual de positividade inferior a 20% contra essa mesma proteína. Um recente trabalho, realizado pelo mesmo grupo em um assentamento agrícola do Amazonas, mostrou resposta de anticorpos contra Sal_{II-IV}-GST em 49,5% dos indivíduos (KANO et al., 2012). Os autores discutem as possíveis razões para o encontro de alta porcentagem de positividade, sugerindo a hipótese de baixa diversidade das populações locais de parasitos. O mesmo grupo, em estudos com indivíduos de diferentes níveis de exposição ao parasito, revelou que 14% dos indivíduos que possuíam uma única exposição foram capazes de responder a essa proteína, contra 65% daqueles que eram mineradores, possuindo um longo tempo de exposição ao parasito. Em áreas endêmicas da Colômbia, a porcentagem de respondedores contra essa proteína é muito alta, chegando a 40,2% em uma área de transmissão instável (MICHON et al., 1998).

A resposta contra a variante Sal_{II}-His no Remansinho é comparável com aquela observada entre indivíduos da comunidade de Buritis (43%), Rondônia. Essa comunidade, assim como o Remansinho, é formada por migrantes que residem em região endêmica há menos de 10 anos. Em outras localidades de Rondônia, Colina (70%) e Ribeirinha (70%), os mesmos autores relataram um maior número de respondedores. Trata-se de comunidades mais antigas; a primeira formada há mais de dez anos e a segunda há pelo menos 25 anos (TRAN et al., 2005). Em Papua Nova Guiné, região endêmica para malária e com população nativa, as respostas contra essa mesma variante alcançaram 72% do total analisado, mesmo sendo essa cepa a menos frequente encontrada no estudo (0,7%) (COLE-TOBIAN et al., 2009). Em estudo na Colômbia, apenas 9% dos indivíduos analisados tiveram anticorpos anti- Sal_{II}-His (MAESTRE et al., 2010).

A variante O_{II}-His utilizada neste trabalho foi originalmente descrita em Papua Nova Guiné e não há relatos de seu uso em estudos sorológicos prévios na região Amazônica. Em estudo realizado por Cole-Tobian et al. (2009), em Papua Nova Guiné, a frequência das cepas de PvDBP AH, O e P foi de 26%, 20% e 10%, respectivamente. Em relação às repostas contra as variantes analisadas por ELISA, 90%, 90% e 98%, dos indivíduos com malária vivax tiveram anticorpos detectáveis para as variantes O, P e AH, respectivamente, antes do tratamento.

5.3 Respostas à PvDBP de acordo com o diagnóstico de malária vivax

Em nosso estudo, o diagnóstico de malária vivax foi associado com a presença de anticorpos contra as variantes PvDBP testadas (exceto para Sal_{II-IV}- GST), assim como em relatos prévios em região amazônica (SILVA-SOUZA et al., 2010). Nesse contexto, estudos com populações de Rondônia (TRAN et al., 2005), evidenciaram que aqueles que não foram diagnosticados com malária recentemente possuem uma menor probabilidade de responder contra a PvDBP do que aqueles com diagnóstico recente de malária vivax. Sob mesmas condições na região do Pará, Barbedo et al. (2007) revelaram que 44,5% dos indivíduos positivos para *P. vivax* responderam a proteína semelhante a Sal I_{II}-His, porém liofilizada. A resposta desse último estudo foi considerada baixa e os autores afirmam que uma possível causa seria a necessidade de repetidas exposições ao parasito para promover a soroconversão. A proteína utilizada em nosso estudo foi encaminhada pronta para o uso, já previamente diluída. De alguma forma, a proteína utilizada no estudo de Barbedo et al. (2007) talvez não

estivesse na mesma conformação estrutural que a utilizada por nós, possivelmente não evidenciando a maior parte dos epítomos capazes de gerar resposta de anticorpos.

5.4 Nível de respostas baseado no tempo de exposição em área endêmica

Ao avaliarmos as associações entre presença de anticorpos contra cada uma das proteínas testadas e o tempo de exposição ao parasito em área endêmica, verificamos uma associação positiva, ou seja, a exposição cumulativa, medida pelo tempo de residência em área endêmica, interfere na positividade para as proteínas estudadas. Esta associação entre os níveis de IgG contra PvDBP e tempo de exposição já havia sido documentada em diferentes regiões endêmicas da Amazônia (CERÁVOLO et al., 2005; SOUZA-SILVA et al., 2010; TRAN et al., 2005) e de Papua Nova Guiné (FRASER et al., 1997; MICHON et al., 1998).

5.5 Resposta de anticorpos contra MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax*

Como a MSP-1 é sabidamente bem reconhecida por populações amazônicas expostas à malária vivax, decidiu-se incluir uma proteína recombinante dela derivada nas análises sorológicas. Diversos estudos realizados na Amazônia brasileira revelaram que indivíduos com malária vivax, ou com prévia exposição, são capazes de apresentar altos títulos de anticorpos contra MSP1₁₉ (BARBEDO et al., 2007; BASTOS et al., 2007; CERÁVOLO et al., 2005; KANO et al., 2012; LADEIA-ANDRADE et al., 2007; SOARES et al., 1999). Surpreendentemente nossa população não se mostrou igualmente imunogênica a essa proteína.

Quando os indivíduos foram agrupados de acordo com diagnóstico de malária vivax, o número de respondedores contra a MSP1₁₉ foi maior entre aqueles diagnosticados com malária vivax, o que era esperado com base em estudos que relacionam a alta frequência de respostas contra essa proteína em associação a infecções patentes (MORAIS et al., 2005; SOARES et al., 1999).

Em concordância com o estudo de Cerávollo et al. (2005) com diferentes padrões de exposição, observamos correlação positiva entre a exposição cumulativa à malária e o percentual de respondedores contra MSP1₁₉. Em indivíduos com infecção patente em Cuiabá (MT) e Manaus (AM), a frequência e magnitude de repostas IgG para este antígeno tende a ser menor entre aqueles que vivenciaram o primeiro episódio de malária, sugerindo que a exposição cumulativa pode ser um bom preditor da magnitude da resposta anti-MSP1₁₉.

(MOURÃO et al., 2012). Esses dados de exposição cumulativa confirmam os descritos por Fraser et al. (1997) em Papua Nova Guiné e em indivíduos amazônicos com distintos níveis de exposição à malária (MORAIS et al., 2005). Tais estudos confirmam um efeito positivo, ainda que relativamente pequeno, da exposição nas respostas contra MSP1₁₉.

5.6 Frequência de genótipo Duffy

O genótipo Duffy mais frequente na população estudada foi FY*AFY*B, confirmando os dados de estudos prévios (CAVASINI et al. 2007a). Os homozigotos para FY*A e FY*B apresentaram proporções semelhantes aos de Cavasini et al. (2007a), uma vez que ambos foram conduzidos em região amazônica e diferem-se apenas do fato do levantamento de Cavasini et al. (2007a) ter sido realizado com doadores de banco de sangue e infectados com malária. Estudos na região associam o genótipo FY*AFY*B como o mais susceptível a malária, uma vez que foi o mais observado em pacientes nos levantamentos em que se relacionou genótipo Duffy com indivíduos com malária e doadores de sangue, na região norte do país (ALBUQUERQUE et al., 2010; CAVASINI et al., 2007a). Na cidade de São Paulo, esse genótipo foi o segundo mais prevalente entre caucasóides, mulatos e negros (NOVARETTI et al., 2000).

A frequência de indivíduos Duffy negativos (FY*B^{ES} FY*B^{ES}), não apresentou tão baixa frequência como nos estudos de Cavasini et al. (2007), Souza et al. (2007) e Silva-Nunes (2008). Em Rondônia a frequência desse genótipo foi de 12% dos controles não-vivax (CAVASINI et al., 2001) e comunidades afro-descendentes da Amazônia brasileira registraram frequência de 32,2% e 58,8% do total de indivíduos analisados das regiões de Mazagão Velho e Curiaú, ambos no estado do Amapá (PERNA; CARDOSO; GUERREIRO, 2007).

5.7 Respostas de anticorpos de acordo com genótipo Duffy

Pouco foi descrito sobre a associação entre grupo sanguíneo Duffy e respostas de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*. Quando avaliamos a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as variantes de PvDBP segundo seu genótipo Duffy, verificamos que não houve associação significativa entre respostas de anticorpos e genótipo, exceto para indivíduos FY*B^{ES} FY*B^{ES}. Estes, como esperado, em

geral tiveram respostas mais baixas. Nesse contexto, um estudo recente realizado na Colômbia (MAESTRE et al., 2010) encontrou uma diferença significativa entre a prevalência de anticorpos contra PvDBP e MSP1 em indivíduos Fy+ (16% para MSP1 e 12% para PvDBP), quando comparado com Fy- (8% para MSP1 e nenhum respondedor para PvDBP). Nesse estudo, uma associação entre a alta expressão de antígeno Duffy e baixas respostas a proteínas de estágio sanguíneo, foi encontrada, fato que não pode ser observado em nossas análises. Em nosso estudo, como em outros semelhantes, há uma frequência maior de respondedores para PvDBP entre aqueles Fy+ em relação a indivíduos Fy- (HERRERA et al., 2005; MAESTRE et al., 2010; MOLINA, et al., 2012).

Um dado interessante de nossa análise foi a identificação de indivíduos Duffy negativos, respondedores para MSP1₁₉. Trabalhos recentes apontam que é possível observar indivíduos Fy- capazes de modular resposta contra o antígeno MSP1 (CUMBANE, 2011; HERRERA et al., 2005; MAESTRE et al., 2010). O fato desses indivíduos responderem a essa proteína de estágio sanguíneo pode decorrer da expressão de MSP1 durante a esquizogonia de *P. vivax* no fígado, como também acontece com *P. falciparum*. Essa proteína pode ser suficientemente expressa a ponto de estimular o sistema imune ao final da esquizogonia, em indivíduos Fy-. Os merozoítos provenientes do fígado, entretanto, circulam de modo breve nesses indivíduos, já que não são capazes de invadir eritrócitos Fy- (HERRERA et al., 2005; MAESTRE et al., 2010).

Daqueles indivíduos infectados com malária causada por *P. vivax*, um deles foi genotipado como Duffy negativo. Trabalhos na região amazônica e no mundo, narram tal fato (CAVASINI et al. 2007b; MÉNARD et al., 2010; MENDES et al. 2011; WURTZ et al., 2011). Primeiramente, uma explicação alternativa para o aumento repentino desses casos, seriam os novos métodos de diagnóstico molecular fornecendo aos pesquisadores ferramentas mais sensíveis do que até então eram utilizadas. Em Madagascar (MENARD et al., 2010), onde o número de Duffy negativos infectados é grande, acredita-se que a circulação de parasitos entre indivíduos Duffy-positivos pode ter permitido a seleção de cepas com capacidade de invasão de eritrócitos Fy-. Nesse contexto, Zimmerman et al. (2012) sugerem ser possível a interação de PvDBP com receptores alternativos ao Duffy, embora variantes de PvDBP com capacidade de aderir a eritrócitos na ausência de antígeno Duffy ainda não tenha sido encontrada. Outra via alternativa de invasão de hemácias Fy- seria dependente de proteínas ligadoras de reticulócitos, localizadas nos micronemas, que se constituiriam em um ligante alternativo para o parasito. Dessa forma, é possível que parasitos de *P. vivax* sejam

capazes de utilizar um percurso alternativo de invasão que somente permanece oculto na presença de antígeno Duffy e operacional na falta dele (ZIMMERMAN et al., 2012).

5.8 Polimorfismos na região II de PvDBP

Em relação ao número de haplótipos da região II de Sal I encontrados em nosso estudo, outro levantamento, também em região amazônica, obteve de 25 amostras, quatro haplótipos diferentes, sendo que 12% do total de amostras pertenciam aos haplótipos de Sal I (SOUZA-SILVA et al., 2010). Esse haplótipo em um recente estudo em Rondônia apontou frequência de 52,17%, aliado a presença oito isolados diferentes (KANO et al., 2012), enquanto que sua frequência em Papua Nova Guiné é de apenas 0,7% (KING et al., 2008). A variante O, apareceu com frequência de 20% em Papua Nova Guiné (COLE-TOBIAN et al., 2009). Em nosso levantamento, nenhum haplótipo idêntico a Sal I ou O foi encontrado.

Estudos apontam que a presença de polimorfismos nas regiões 417, 437 e 503 da região II de DBP são capazes de causar significativa perda de inibição na relação antígeno – anticorpo (VANBUSKIRK et al., 2004b). Baseado nesse estudo, a variação antigênica provocada pelo resíduo 417 foi testada e concluiu-se que a mudança natural e simples dos aminoácidos N → K resulta em uma grande alteração na característica antigênica da proteína (MCHENRY et al., 2011). Esse polimorfismo natural também foi encontrado em nosso isolado mais frequente, assim como também o polimorfismo na região 437. Com base nos dados obtidos, podemos concluir que as substituições de aminoácidos encontradas em nosso estudo, em relação a Sal I e O, não foram capazes de abolir a capacidade dos anticorpos de reconhecer essas proteínas.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

As proteínas Sal I_{II}-His e O_{II}-His foram as mais reconhecidas por anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos, em comparação com a variante Sal_{II-IV}-GST. Isso provavelmente ocorreu devido à estrutura conformacional de Sal I_{II}-His e O_{II}-His se assemelhar àquela existente na PvDBP nativa, conforme descrito por Singh et al. (2001).

O diagnóstico de malária vivax no momento da coleta foi associado com a maior presença de anticorpos contra as variantes testadas.

O tempo de exposição dos indivíduos está associado, de modo significativo, à frequência e intensidade de resposta contra todas as proteínas.

Não foi observada, entre os indivíduos Duffy-positivos, associação entre a resposta de anticorpos contra as variantes de PvDBP ou MSP1₁₉ e o polimorfismo Fyb/Fya; entretanto, indivíduos Duffy-negativos tiveram menor resposta contra Sal I_{II}-His e O_{II}-His.

No presente estudo, a variante mais comum encontrada difere de Sal I e O, dentro da região II analisada, em seis aminoácidos. Com base nos dados obtidos, podemos concluir que essas substituições de aminoácidos não foram capazes de abolir a capacidade dos anticorpos de reconhecer essas proteínas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, J. H.; HUDSON, D. E.; TORII, M.; WARD, G. E.; WELLEMS, T. E.; AIKAWA, M.; MILLER, L. H. The duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v. 63, p. 141-153, 1990.
- ADAMS, J. H.; SIM, B. K.; DOOLAN, S. A.; FANG, X.; KASLOW, D. C.; MILLER, R. L. H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 7085-7089, 1992.
- ADAMS, J. H.; BLAIR, P. L.; KANEKO, O.; PETERSON, D. S. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 297-299, 2001.
- ALBUQUERQUE S. R. L.; CAVALCANTE, F. O.; SANGUINO E. C.; TEZZA, L.; CHACON, F.; CASTILHO, L.; SANTOS, M. C. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 1049-1053, 2010.
- BARILLAS-MURY, C.; KUMAR, S. Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 1539-1545, 2005.
- BARBEDO, M. B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M. C. S.; CUNHA, M. G.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v. 102, p. 335-339, 2007.
- BASTOS, M. S.; SILVA-NUNES, M.; MALAFRONTA, R. S.; HOFFMAN, E. H. E.; WUNDERLICH, G.; MORAES, S. L.; FERREIRA, M. U. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural amazonians. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v. 14, p. 1249-1259, 2007.
- BLACKMAN, M. J.; HEIDRICH, H.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J. S.; HOLDER, A. A. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion- inhibiting antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 379-382, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ações do SUS ajudam a reduzir casos de malária**. 2011. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/acoes-do-sus-ajudam-a-reduzir-casos-de-malaria/>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da malária no Brasil**. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf>. Acesso em: 21 jan 2012.

BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE R. Quantitative analysis of protein UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein. Eng.**, v. 5, p. 191-195, 1992.

BOYD, M. F. Historical review. In: BOYD M. F. (Ed.) **Malariology**, Philadelphia: WB Saunders, 1949. p. 3-25.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; CHENG, Q.; COULSON, R. M.; CRABB, B. S.; DEL PORTILLO, H. A.; ESSIEN, K.; FELDBLYUM, T. V.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; GILSON, P. R.; GUEYE, A. H.; GUO, X.; KANG'A, S.; KOOLIJ, T. W.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, S. A.; REN, Q.; SARGEANT, T. J.; SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, S. A.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGETT, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature**, v. 455, p. 757-763, 2008.

CAVASINI, C. E.; PEREIRA, J. T.; RIBEIRO, W. L.; WUNDERLICH, G.; FERREIRA, M. U. Duffy group genotypes among malaria patients in Rondonia, Western Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 591-594, 2001.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, L. A. R. D.; COUTO, V. S. C. A.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L. J.; DOMINGOS, C. R. B.; ROSSIT, A. R. B.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. D. Duffy blood gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malar. J.**, v. 6, p. 167, 2007a.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; VALENCIA, S. H.; NEIRAS, W. C.; ALVES, R.T.; ROSSIT, A. R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, p. 1042-1044, 2007b.

CERÁVOLO, I. P.; ROMERO, O. B.; BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F.; BRITO, C. F. A.; SOUZA, J. M.; KRETTLI, A. U.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Anti-*Plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Hyg.**, v. 72, p. 675-681, 2005.

CHAUDHURI, A.; POLYKOVA, J.; ZBRZENA, V.; WILLIAMS, K.; GULATI, S.; POGO, A. O. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 10793-10797, 1993.

CHAUDHURI, A.; POYAKOVA, J.; ZBZESNA, V.; POGO, A. O. The coding sequence of Duffy blood group gene in human and Simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy negative individual. **Blood**, v. 85, p. 615- 621, 1995.

CHITNIS, C. E. Molecular Insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 124, p. 755-756, 2001.

CHITNIS, C. E.; BLACKMAN, M. J. Host cell invasion by malaria parasites. **Parasitol. Today.**, v.16, p. 411-415, 2000.

COLE-TOBIAN, J.; KING, C. L. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, p. 121-132, 2003.

COLE- TOBIAN, J. L.; MICHON, P.; BIASOR, M.; RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G.; MUELLER, I.; KING, C. L. Strain-specific Duffy Binding Protein correlates with protection against infection with homologous and heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinea Children. **Infect. and Immun.**, v. 77, p. 4009-4017, 2009.

COURA, J. R.; SUAREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection-a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, p. 229-237, 2006.

CULLETON, R. L.; MITA, T.; NDOUNGA, M.; UNGER, H.; CRAVO P. V. L.; PAGANOTTI, G. M.; TAKAHASHI, N.; KANEKO, A.; ETO, H.; TINTO, H.; KAREMA, C.; KOBAYAKAWA, T.; NTOUMI, F.; CARTER, R.; TANABE, K. .Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. **Malar. J.**, v. 7, p. 174-182, 2008.

CUMBANE, V. S. **Respostas de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de Plasmodium vivax em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia Brasileira.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Análises clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DOOLAN, D. L.; DOBANO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. **Clin Microbiol. Rev.**, v. 22, p. 13-36, 2009.

DONAHUE, R. P.; BIAS, W. B.; RENWICK, J. H.; MCKUSICK, V. A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 61, p. 949-955, 1968.

FRASER, T.; MICHON, P.; BARNWELL, J. W.; NOE, A. R.; AL-YAMAN, F.; KASLOW, D. C.; ADAMS, J.H. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2772-2777, 1997.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitol. Today.**, v. 12, p. 20-29, 1996.

GALINSKI, M. R.; MEDINA, C. C.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell**, v. 69, p. 1213-1226, 1992.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other haemosporidia**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1966.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 1.413-1.429, 2004.

GUERRA C. A.; HOWES E. R.; PATIL A. P.; GUETING P. W.; VAN BOECKEL T. P.; TEMPERLY W. H.; KABARIA C. W.; TATEM A. J.; MANH B. I.; ELYAZAR I. R.; BAIRD J. K.; SNOW R. W.; HAY S.I. The International Limits and Population at Risk of *Plasmodium vivax* Transmission in 2009. **Plos Med.**, v. 4, p. 8e774, 2010.

GRIMBERG, B. T.; UDOMSANGPETCH, R.; XAINLI, J.; MCHENRY, A.; CUI, L.; BOCKARIE, M.; SATTABONGKOT, J.; CHITNIS, C.; ADAMS, J.; ZIMMERMAN, P. A.; KING, C. L. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocyte inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **Plos Med.**, v. 4, p. e337, 2007.

GOZZE, A. B. **Epidemiologia da malária de fronteira agrícola: fatores associados à infecção e doença em estudo de base populacional na Amazônia rural brasileira**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

HAYNES, J. D.; DALTON J. P.; KLOTZ, F. W.; MCGINNISS, M. H.; HADLEY, T. J.; HUDSON, D. E.; MILLER, L. H. Receptor-like specificity of a *Plasmodium knowlesi* malarial protein that bind Duffy antigen ligands on erythrocytes. **JEM**, v. 6, p. 1863, 1988.

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W.. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 4, p. 327-336, 2004.

HADLEY, T. J.; PEIPER, C. From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v. 89, p. 3077-3091, 1997.

HERRERA, S.; GÓMEZ, A.; OMAIRA, V.; VERGARA, J.; VALDERRAMA-AGUIRRE, A.; MAESTRE, A.; MÉNDEZ, F.; WANG, R.; CHITNIS, C. E.; YAZDANI, S. S.; ARÉVALO-HERRERA, M. Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in FY-negative individuals from the Colombian Pacific Coast. **Am. J. Med. Hyg.**, v. 5, p. 44-49, 2005.

HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **J. Neurovirol.**, v. 5, p. 13-26, 1999.

HOLDER, A. A.; BLACKMAN, M. J.; BURGHHAUS, P. A.; CHAPPEL, J. A.; LING, I. T.; MCCALLUM- DEIGHTON, N.; SHAI, S. A malaria merozoite surface protein (MSP1) structure, processing and function. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87, p. 37-42, 1992.

HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; PIEL, F. B.; NYANGIRI, O. A.; KABARIA, C. W.; GETHING, P. W.; ZIMMERMAN, P. A.; BARNADAS, C.; BEALL, C. M.; GEBREMEDHIN, A.; MÉNARD, D.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; HAY, S. I. The global distribution of the Duffy blood group. **Nature**, v. 2, p. 266, 2011.

IYER, J.; GRÜNER, A. C.; RÉNIA, L.; SNOUNOU, G.; PREISER, P. R. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. **Mol. Microbiol.**, v. 65, p. 231- 349, 2007.

JENS, E.; PAGLIARINI, T.; NOVARETTI, M. C. Z. Sistema grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática transfusional. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, p. 110-119, 2005.

KANO, F. S.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUZA, T. N.; TANG, M. L.; SALIBA, J.; OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, P. A.; GONÇALVES A. Q.; FONTES C. J. F.; SOARES I.S.; BRITO, C. F. A.; ROCHA R. S.; CARVALHO, L. H. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well- consolidated settlement of the Amazon Region. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 17, p. 989-1000, 2012.

KARUNAWEEERA, N. D.; GRAU, G. E.; GAMAGE, P.; CARTER, R.; MENDIS, K. N. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 3200-3203, 1992.

KASEHAGEN, L. J.; MUELLER KINIBORO, B.; BOCKARIE, M. J.; REEDER, J. C.; KAZURA, J. W.; KASTENS, W.; MCNAMARA, D. T.; KING, C. H.; WHALEN, C. C.; ZIMMERMAN, P. A. Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygotes. **Plos One**, v. 2, p. e336, 2007.

KING, C. L.; MICHON, P.; SHAKRI, A. R.; MARCOTTY, A.; STANISC, D.; ZIMMERMAN, P. A.; COLE-TOBIAN, J. L.; MUELLER, I.; CHITNIS, C. E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105, p. 8363-8368, 2008.

KING, C. L.; ADAMS, J. H.; XIANLI, J.; GRIMBERG, B. T.; MCHENRY, A. M.; GREENBERG, L. J.; SIDDIQUI, A.; HOWES, R. E.; DA SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M. U.; ZIMMERMAN, P. A. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. **PNAS**, v. 108, p. 20113-20118, 2011.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. **Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 1-11, 1985.

LADEIA-ANDRADE, S.; FERREIRA, M. U.; SCOPEL, K. K. G.; BRAGA, E. M.; BASTOS, M. S.; WUNDERLICH, G.; COURA, J. R. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)- 1₁₉ and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 102, p.943-951, 2007.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

MAESTRE, A.; MUSKUS, C.; DUQUE, V.; AGUELO, O.; LIU, P.; TAKAGI, A.; NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H.; SIM, K. L.; HOFFMAN, S. L.; CORRADIN, G.; VELEZ, I. D.; WANG, R. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for Duffy Antigen receptor for Chemokines (DARC). **Plos One**, v. 5, p. e11437, 2010.

McHENRY, A. M.; BARNES, S. J.; NTUMNGIA, F. B.; KING, C. L.; ADAMS, J.H. Determination of the molecular basis for a limited dimorphism, N417K, in the *Plasmodium vivax* Duffy- binding protein. **Plos One**, v. 6, p. e20192, 2011.

MÉNARD, D.; BOUCHIER, C.; HENRY-HALLDIN, C.; GRAY, L. R.; RATSIMBASOA, A.; THONIER, V.; CAROD, J. F.; DOMARLE, O.; COLIN Y. V. E. S.; BERTRAND, O.; PICOT, J.; KING, C. L.; GRIMBERG, B. T.; PUIJALON, O. M.; ZIMMERMAN, P. A. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **PNAS**, v. 78, p. 345-348, 2010.

MENDES, C.; DIAS, F.; FIGUEIREDO, J.; MORA, V. G.; CANO, J.; SOUZA, B. D. E.; ROSÁRIO, V. E.; BENITO, A.; BERZOSA, P.; AREZ, A.P. Duffy Negative Antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax* – molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). **Plos One**, v. 5, p. 6e1192, 2011.

MERCEREAU-PUIJALON, O.; MÉNARD, D. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: A paradigm revisited. **Transfus. Clin. Biol.**, v. 17, p. 176-183, 2010.

MICHON, P. A.; AREVALO-HERRERA, M.; FRASER, T.; HERRERA, S.; ADAMS, J. H. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 597-599, 1998.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks - The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, p. 302-304, 1976.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 154-158, 2004.

MOLINA, D. M.; FINNEY, O. C.; AREAVOLO- HERRERA, M.; HERRERA, S.; FELGNER, P. L.; GARDNER, M. J.; LIANG, X.; WANG, R. *Plasmodium vivax* pre-erythrocytic-stage antigen Discovery: exploiting naturally acquired humoral responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 460- 469, 2012.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J. F.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. IgG isotype to C-terminal 10 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 95, p. 420-426, 2005.

MOURÃO, L. C.; MORAIS C. G.; BUENO, L. L.; JIMENEZ, M. C.; SOARES, I. S.; FONTES, C. J.; LACERDA, M. V. G.; XAVIER, M. S.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; BRAGA, E. M. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1₁₉ and PvMSP-3 α ₃₅₉₋₇₉₈) and their relationship with hematological features in malaria patients from Brazilian Amazon. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 730-739, 2012.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 9, p. 555-566, 2009.

NAIR, M.; HINDS, M. G.; COLEY, A. M.; HODDER, A. N.; FOLEY, M.; ANDERS, R. F.; NORTON, R.S. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). **J. Mol. Biol.**, v. 322, p. 741-753, 2002.

NEOTE, K.; MAK, J. Y.; KOLAKOWSKI, L. F.; SCHALL, T. J. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, v. 84, p. 44-52, 1994.

NOVARETTI, M. C. Z.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE A.F. Estudos de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucásios e negróides na cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, p. 23-32, 2000.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Malaria in the Américas: time series epidemiological data from 2000 to 2007.** Disponível em:< <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/mal-americas-2007.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2012

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: overview. **Mal. J.**, v. 9, p. 115, 2010.

PERNA, S. J. Q.; CARDOSO, G. L.; GUERREIRO, J. F. Duffy blood group genotypes among African- Brazilian communities of the Amazon region. **Genet. Mol. Res.**, v. 6, p. 166-172, 2007.

PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; CHESNE-SECK, M. L.; COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science**, v. 308, p. 408-411, 2005.

PRICE, R. N.; TJITRA E.; GUERRA C. A.; YEUNG S.; WHITE N. J.; ANSTEY N. M. Vivax malaria neglected and not begin. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 79-87, 2007.

POGO, A. O.; CHAUDHURI, A. The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. **Semin. Hemat.**, v. 37, p. 122-129, 2000.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, R. A.; BARNWELL, J. W.; ROSENBERG, R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. **Am. J. Med. Hyg.**, v. 75, p. 575-581, 2006.

SILVA-NUNES, M. **Fatores de risco, distribuição espacial,e perspectivas de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia (Granada, Acre).** 2008. 243 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M. S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; VAN GEMERT, G. J.; SAUERWEIN, R. W.; BLACKMAN, M. J.; ANDERS, R. F.; PLUSCHKE, G.; MAZIER, D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 9490-9496, 2004.

SINGH, S.; PANDEY, K.; CHATTOPADHAYAY, R.; YAZDANI, S. S.; LYNN, A.; BHARADWAJ, A.; RANJAN, A.; CHITNIS, C. Biochemical, biophysical and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding Protein. **J. Bio. Chem.**, v. 20, p. 17111-17116, 2001.

SINGH, S. K.; SINGH, A. P.; PANDEY, S.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; SHARMA, A. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **Biochem. J.**, v. 374, p. 193- 198, 2003.

SOARES, I. S.; OLIVEIRA S. G.; SOUZA, J. M.; RODRIGUES, M. M. Antibody responses to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 13-24, 1999.

SOUZA, T. N.; CERÁVOLO, I. P.; FONTES, F. C. J.; COUTO, A.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 146, p. 251-254, 2006.

SOUZA, T. N.; SANCHEZ, B. A. M.; CERÁVOLO, I. P.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. **Vox Sanguinis**, v. 92, p. 373-380, 2007.

SOUZA, T. N.; TARAZONA-SANTOS, E. M.; WILSON, D. J.; MADUREIRA, A. P.; FALCAO, P. R. K.; FONTES, C. J. F.; GIL, L. H. S.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. A. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in brazilian *Plasmodium vivax* populations. **Malar. J.**, v. 9, p. 334, 2010.

SOUZA-SILVA, F. A.; DA SILVA-NUNES, M.; SANCHEZ, A. M.; CERÁVOLO, I. P.; MALAFRONTA, R. S.; BRITO, C. F. A.; FERREIRA, U. M.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (DBP) in Rural Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 2, p. 185-193, 2009.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TRAN, M. T.; OLIVEIRA –FERREIRA, J.; MORENO A.; SANTOS, F.; YAZDANI S. S.; CHITNIS, C. E.; ALTMAN J. D.; MEYER, E. V. S.; BARNWELL, J.W.; GALINSKI, M. R. Comparason of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian amazon populacion. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, p. 244- 255, 2005.

TSUBOI, T.; KAPPE, S. H.; AL-YAMAN, F.; PRICKETT, M. D.; ALPERS, M.; ADAMS, J. H. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 5581-5586, 1994.

VANBUSKIRK, K. M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J. H. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition, **PNAS**, v. 101, p. 15754-15759, 2004a.

VANBUSKIRK, K. M.; COLE-TOBIAN, J. L.; BAISOR, M.; SEVOVA, E. S.; BOCKARIE, M.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 1556-1562, 2004b.

WANG R., SMITH, J. D.; KAPPE S. H. I. Advances and challenges in malaria vaccine development. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 16, p. 11-e39, 2009.

WERTHEIMER, S. P.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. **Exp. Parasitol.**, v. 69, p. 340-350, 1989.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **Ten facts on malaria**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>>. Acesso em: 10 Jan 2012.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report, 2010**. Genebra, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html>. Acesso em: 12 Feb 2012.

WURTZ, N.; LEKWEIRY, K. M.; BOGREAU, H.; PRADINES, B.; ROGIER, C.; BOUKHARY, A. O. M. S.; HAFID, J. E.; SALEM, M. S. O. A.; TRAPE, J. F.; BASCO, L. K.; BRIOLANT, S. Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. **Mal. J.**, v. 10, p. 336, 2011.

ZIMMERMAN, P. A.; WOOLEY, I.; MANSINDE, G. L.; MILLER, S. M.; MCNAMARA, D. T.; HAZLETT, F.; MGONE, A. S.; ALPERS, M. P.; GENTON, B.; BOATIN, B. A.; KAZURA, J. W. Emergence of FY*A null in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. **PNAS**, v. 24, p. 13973-13977, 1999.

ZIMMERMAN, P. A.; FERREIRA, M. U.; HOWES, R. E.; MERCEREAU- PUIJALON, O. Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax. **Adv. Parasitol.**, 2012. In press.