



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

**GENOTIPAGEM DO SISTEMA SANGUÍNEO DUFFY
E AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS IgG QUE RECONHECEM
ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *PLASMODIUM VIVAX* (PvMSP1₁₉)**

CASSIANA FREITAS DE OLIVEIRA

Belém-Pará

2016

CASSIANA FREITAS DE OLIVEIRA

**GENOTIPAGEM DO SISTEMA SANGUÍNEO DUFFY
E AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS IgG QUE RECONHECEM
ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *PLASMODIUM VIVAX* (PvMSP1₁₉)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maristela Gomes da Cunha.

Belém-Pará

2016

CASSIANA FREITAS DE OLIVEIRA

**GENOTIPAGEM DO SISTEMA SANGUÍNEO DUFFY
E AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS IgG QUE RECONHECEM
ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *PLASMODIUM VIVAX* (PvMSP1₁₉)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maristela Gomes da Cunha
Laboratório de Microbiologia e Imunologia, ICB-UFPA

Banca Examinadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Revoredo Ventura
Seção de Parasitologia, IEC/UEPA

Prof^a. Dr^a. Marinete Marins Póvoa
Seção de Parasitologia, IEC

Prof. Dr. João Farias Guerreiro
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Suplente: Prof. Dr. Francisco Acácio Alves
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	7
1.2 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA CAUSADA POR <i>P. VIVAX</i>	8
1.3 CICLO DE VIDA DO <i>PLASMODIUM</i>	10
1.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS À INVASÃO DO ERITRÓCITO PELO <i>PLASMODIUM</i>	13
1.4.1 PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS (MSP1)	16
1.4.2 PROTEÍNA LIGANTE DE DUFFY (DBL)	18
1.4.3 PROTEÍNA LIGANTE DE RETICULÓCITOS (RBP)	20
1.5 INFECÇÕES POR <i>PLASMODIUM VIVAX</i> ASSOCIADAS AO GENÓTIPO DUFFY	21
1.6 AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MSP1 ₁₉ NA MALÁRIA CAUSADA POR <i>P. VIVAX</i>	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	28
3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	29
3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HIS ₆ -MSP1 ₁₉ DE <i>P. VIVAX</i>	29
3.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG	30
3.5 GENOTIPAGEM DO SISTEMA SANQUÍNEO DUFFY	30
3.6 ASPECTOS ÉTICOS	31
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8. ANEXOS	52

RESUMO

A malária é uma doença de epidemiologia complexa, cuja transmissão envolve aspectos do parasito e do hospedeiro, incluindo a participação de ligantes específicos no processo de invasão das hemácias pelo parasito. Neste estudo, realizamos a detecção de anticorpos IgG que reconhecem a porção C-terminal da MSP1 (PvMSP1₁₉), como um marcador sorológico de exposição à malária, no âmbito de uma estratégia complementar para analisar aspectos da infecção por *Plasmodium vivax*, em indivíduos do grupo sanguíneo Duffy negativo que residem em áreas endêmicas de malária. Para tanto, realizamos a genotipagem e a detecção de anticorpos IgG que reconhecem a PvMSP1₁₉, com a finalidade de identificar os genótipos do grupo sanguíneo Duffy e analisar a resposta de anticorpos adquiridos naturalmente por indivíduos expostos à malária. Foram analisadas 257 amostras de indivíduos que residiam em áreas de risco, no estado do Pará, sendo 180 de indivíduos de São Luiz do Tapajós (Itaituba) e 77 Aveiro. Os seis possíveis genótipos de Duffy foram identificados nas duas áreas, porém houve variação na distribuição dos genótipos. O genótipo Duffy negativo (FY*B^{ES}/FY*B^{ES}) em São Luiz do Tapajós e Aveiro foi encontrado em 20,0% e 7,8% das amostras, respectivamente. Entre os genótipos Duffy positivo, o mais frequente em São Luiz do Tapajós foi o FY*A/FY*A (23,9%) e em Aveiro o FY*B/FY*B^{ES} (35,1%), enquanto que o genótipo menos frequente em São Luiz do Tapajós foi FY*A/FY*B^{ES} (9,4%) e em Aveiro o FY*A/FY*A (6,5%). O mais frequente em São Luiz do Tapajós foi o menos frequente em Aveiro, mostrando variação no fenótipo Duffy positivo Fy(a+b-). Com o intuito de analisar a aquisição de marcador biológico de exposição à malária, avaliamos a resposta de anticorpos em indivíduos com perfil genético para resistência natural à infecção por *P. vivax*, observamos que nas duas áreas ocorreram casos de indivíduos Duffy negativo, os quais foram positivos para a pesquisa de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉. Em São Luiz do Tapajós foram identificados 4,4% (8/180) e em Aveiro 2,6% (2/77). Também analisamos o histórico de exposição prévia à malária e os níveis dos anticorpos, observamos variação individual nos níveis séricos dos anticorpos IgG. Com base nessas análises, podemos inferir que indivíduos Duffy negativo foram previamente expostos à malária, e a sorologia confirmou que os indivíduos do genótipo Duffy negativo podem ter sido infectados por *P. vivax*.

DEDICATÓRIA

A minha filhinha Clarice, que todos os dias me presenteia com o seu sublime amor... Não há nada mais valioso e especial em minha vida que as tuas doses terapêuticas de carinho. Meus dias se alegam com a tua existência... Obrigada por me escolher como mãe.

EPÍGRAFE

“ A gente só conhece bem as coisas que cativou – disse a raposa.- Os homens não têm mais tempo de conhecer coisa alguma. Compram tudo já pronto nas lojas. Mas como não existem lojas de amigos, os homens não têm mais amigos. Se tu queres um amigo, cativa-me! ”. (O pequeno príncipe)

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir o reencontro com o meu caminho de vida.

A minha orientadora, Professora Dra. Maristela Gomes da Cunha, por sua dedicação, por dispor do seu tempo, compreensão e paciência para comigo e, com meus erros e acertos. Por me ensinar o que é verdadeiramente ciência.

A minha filha, Clarice, por ter me ensinado o verdadeiro e pleno amor. Por me ajudar a ser cada dia um ser humano melhor.

Ao meu marido, Fernando por toda sua compreensão nos meus momentos de ausência e força nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Vânia Freitas e Alcemir Oliveira

A Glenda Miranda por toda sua dedicação e amizade.

As amigas Déborah Tobelem e Neila Barros, pela ajuda inestimável de vocês que me deixa totalmente sem palavras.

Ao Laboratório Paulo C. Azevedo, em especial ao Dr. Murilo Azevedo, pela imensa oportunidade. Muito Obrigada.

Aos colegas de Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Pará Pedro Elias e Stephanie

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica, em especial ao Dr. João Guerreiro pela sua ajuda no trabalho.

As minhas tias Telma Grisolia e Marília Oliveira por sempre exemplos de pessoas, por acreditarem em mim.

A Universidade Federal do Pará, a Fundação Amazônia Paraense de Pesquisas (FAPESPA), o Instituto Evandro Chagas e a Vale, pelo apoio para realização desse estudo.

A todos que de maneira direta e indireta contribuíram com a realização deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma infecção parasitária, febril, aguda, que, em muitas partes do mundo, continua sendo um grave problema de saúde pública, principalmente, por afetar milhões de pessoas e com altas taxas de morbidade e mortalidade (WHO, 2015).

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares, pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiiida, família *Plasmodiidae*, e gênero *Plasmodium*. Existem cerca de 120 espécies de *Plasmodium* que podem infectar aves, répteis, roedores e primatas. Entre essas espécies, apenas cinco podem infectar humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (Escalante *et al.*, 1998). O *P. falciparum* é a espécie predominante no mundo, seguida pelo *P. vivax* (WHO, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a malária esteja presente em mais de 100 países e, aproximadamente, 3,2 bilhões de pessoas residem em áreas consideradas de risco. A maior prevalência de casos ocorre na África, América do Sul e Àsia. A OMS estima que aproximadamente 207 milhões de casos clínicos da doença ocorram ao ano. Entre os anos de 2000 e 2013, a mortalidade foi reduzida em cerca de 45%, considerando todos os grupos etários, e, 51%, considerando as crianças com menos de cinco anos de idade. Em parte, essa redução foi atribuída ao acesso da população de risco a medidas de prevenção, sendo a principal medida a disponibilidade dos exames de diagnóstico, que permitiu a identificação e tratamento desses pacientes (WHO, 2013).

A malária é uma doença multifatorial, de evolução clínica dependente de diversos fatores, tais como a genética do parasito e do hospedeiro, a exposição prévia, a idade, o estado nutricional, além de fatores geográficos e sócio-econômicos. Em indivíduos não imunes, os primeiros sinais e sintomas são febre, dor de cabeça, dores musculares, calafrios, vômitos e letargia, presentes no paroxismo malárico, sendo que os sintomas surgem entre 7 a 15 dias após a

infecção, e estão associados com os altos níveis de citocinas (Gazinelli *et al.*, 2014).

Atualmente, a OMS tem apresentado dados que mostram um efetivo controle da malária, indicando a possibilidade de eliminar a doença em algumas áreas (WHO, 2013). Porém, a dificuldade em progredir na erradicação da malária é decorrente da falta ou da má distribuição dos recursos financeiros, causando o difícil acesso ao tratamento em tempo hábil e falhas na adoção de medidas preventivas. Tais situações justificam maiores investimentos e esforços no desenvolvimento de medidas profiláticas, dentre as quais podemos incluir o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax*, principalmente, devido a ocorrência de notificações recentes de casos graves e letais causados por esta espécie e que estão associadas ao surgimento de cepas resistentes as drogas anti-maláricas (Greenwood *et al.*, 2008).

A mortalidade por *P. vivax* é considerada relativamente baixa quando comparada à infecção por *P. falciparum*, porém sua morbidade é significativa, uma vez que a situação epidemiológica tem mostrado que o controle da transmissão do *P. vivax* tem se mostrado mais difícil. Além disso, tem sido descrito aumento crescente no desenvolvimento de resistência do parasito à cloroquina, favorecendo a manutenção da transmissão e a morbidade por malária (Suh, *et al.*, 2004).

1.2. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA CAUSADA POR *P. VIVAX*

Em escala global, fora do continente africano, em média 80 a 90% das infecções são causadas por *P. vivax*, com índices de transmissão que variam de baixo a moderado. A doença causada por essa espécie tem ampla distribuição geográfica nas Américas, Oriente Médio, Ásia e Oceania. Deve ser ressaltado que, apesar de ser um dos principais problemas de saúde pública nessas regiões, os aspectos relacionados à biologia do parasito, a resposta imune do hospedeiro, bem como os aspectos de natureza epidemiológica ainda são pouco explorados (Mendis *et al.*, 2001).

Nas Américas, a malária está presente em 21 países e territórios, sendo que 20% do total dessa população reside em áreas consideradas de risco. Observou-se também uma redução do número de casos, de 1,18 milhões no ano de 2000 para 469 mil em 2012, sendo que os países que reportaram os maiores números de casos foram Brasil, Colômbia e Venezuela (WHO,2012).

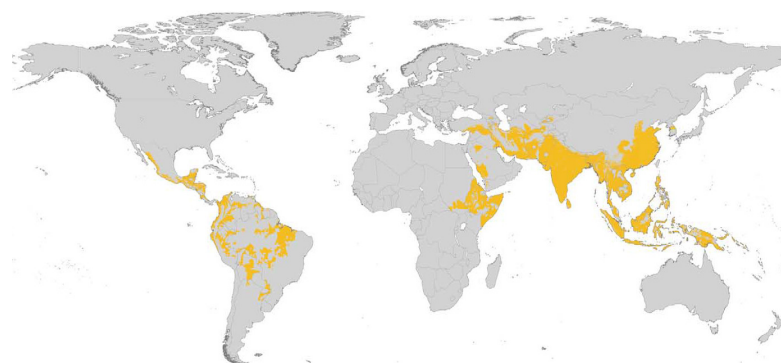


Figura 1: Distribuição geográfica do *Plasmodium vivax*. Informações sobre fatores relacionados à transmissão, como clima, densidade populacional, predominância de vetores, altitude, quimioprevenção e outros foram utilizados para estimar e delimitar áreas consideradas de risco. Fonte: Guerra *et al.*, 2006

No Brasil, o principal vetor de transmissão do *Plasmodium* é o mosquito *Anopheles darlingi*. De acordo com o Ministério da Saúde, aproximadamente 60% do território brasileiro apresenta condições consideradas propícias para a transmissão da doença, com habitat favorável para a multiplicação e o desenvolvimento do vetor. Observa-se que no Brasil a transmissão da malária está quase que totalmente restrita a Região Amazônica, onde são registrados 99,9% de casos de malária. Desse total de casos, aproximadamente 84% são infecções por *P. vivax*. A malária ocorre nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, com a maior parte dos casos notificados nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima (Brasil, Ministério da Saúde, 2015).

A Amazônia apresenta características climáticas, ambientais, ecológicas e socioeconômicas favoráveis à transmissão da malária, porém, essa distribuição não se dá de maneira homogênea, existindo áreas isentas de malária e áreas com risco alto, médio ou baixo (Oliveira-Filho *et al.*, 2010).

Durante o ano de 2007, foram registrados 456.991 casos de malária na Amazônia brasileira. Porém, os dados registrados em 2013, mostraram que houve redução significativa no número de casos, no entanto, neste mesmo ano, foram registrados ainda cerca de 300 mil casos de malária (Brasil, Ministério da Saúde, 2013).

No Brasil, observou-se uma redução do número de casos da doença nos anos de 2010, 2011 e 2012, sendo que estes números foram 278.165, 228.072 e 202.178, respectivamente. Nos anos de 2013 e 2014 os números continuaram diminuindo, e foram registrados 177.791 e 142.624 casos, respectivamente. Essa diminuição vem sendo mantida até o presente momento (Brasil, Ministério da Saúde, 2014).

Fatores associados à instabilidade de políticas públicas, mudanças climáticas de escala local, global e biológica, assim como o surgimento de cepas de parasitos e mosquitos refratários a drogas, contribuem para o aumento no número de casos de malária nos países atingidos. Nessa conjuntura, é indispensável maior empenho para praticar medidas novas de controle e também a adoção de estratégias adicionais como vacinas, novas drogas e inseticidas eficazes.

1.3 CICLO DE VIDA DO *PLASMODIUM*.

O ciclo de vida do *Plasmodium* é considerado bastante complexo, sendo caracterizado por uma fase sexuada (esporogonia), que irá se desenvolver nas fêmeas dos mosquitos *Anopheles* e duas etapas assexuadas no hospedeiro secundário (pré-eritrocítica e eritrocítica) (Figura 2). Após a picada da fêmea do mosquito, os esporozoítos são inoculados na pele durante o repasto sanguíneo. Alguns estudos demonstram que após a picada do mosquito, os esporozoítos permanecem na pele por um período que pode durar até seis horas. Durante esse

período, cerca de 70% dos parasitos deixam a pele em um intervalo de uma hora e atingem a corrente sanguínea, posteriormente, alcançam o fígado. Os demais invadem o sistema linfático (30%), chegando aos linfonodos, onde são reconhecidos por células dendríticas e uma pequena porção pode desenvolver-se para a forma extraeritrocítica (Doolan *et al.*, 2009).

Na corrente sanguínea, os esporozoítos seguem para os sinusóides hepáticos, podendo atravessar esse compartimento. Há evidências que os esporozoítos invadem as células de Kupffer para posteriormente invadir os hepatócitos, formando um vacúolo parasitóforo e, criando, assim, uma barreira entre o parasito e a célula do hospedeiro. No hepatócito, por esquizogonia, os esporozoítos se reproduzem.

Ao alcançar o fígado, inicia-se o estágio pré-eritrocítico do ciclo. No hepatócito, o esporozoíto perde seu complexo apical iniciando o processo de diferenciação, crescimento, e multiplicação do parasito por sucessivas divisões mitóticas (Perlmann *et al.*, 2002). Subsequentemente surge o esquizonte, cujo citoplasma, ao término da esquizogonia, contem vários núcleos que dão origem aos merozoítos.

No interior dos hepatócitos, foram identificadas estruturas denominadas de merossomos, que abrigam diversos merozoítos, e que garantem a circulação destes pela corrente sanguínea. Existem evidências que indicam que estes merossomos atuam de maneira a proteger a célula infectada da morte por apoptose, inibindo a exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática das células infectadas e também retendo os níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}) no plasma. A fosfatidilserina é um sinalizador para fagócitos, e por conta disso as células infectadas estarão protegidas do sistema imune. (Sturm *et al.*, 2006).

Após o rompimento das células hepáticas, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, dando início à fase eritrocítica do ciclo. O estágio eritrocitário é responsável pelas manifestações clínicas, que podem resultar em síndromes febris cíclicas (paroxismo malárico), variando entre 48 a 72 horas, acompanhadas de mal estar, cefaléia, cansaço e mialgia. O início dos sinais clínicos pode variar, dependendo da espécie, de 7 a 15 dias. No ciclo *do P. vivax*, algumas formas podem se manter latentes no fígado, sendo denominadas de

hipnozoítos, os quais poderão ser ativados posteriormente, voltando ao ciclo hepático, causando recidivas da doença (Cowman *et al.*, 2006).

Os merozoítos formados saem do vacúolo parasitóforo, e após a lise celular são liberados na corrente sanguínea, estes apresentam vida curta, estando susceptíveis à fagocitose, desta maneira, procuram evitar a contato com os macrófagos. Como dito anteriormente, ao serem liberados, estão envoltos pela membrana da célula hospedeira, denominando-se merossomos, dessa maneira são protegidos do reconhecimento por células dendríticas. Sendo assim, buscam invadir rapidamente os eritrócitos, ligando-se a eles por moléculas de adesão da membrana de superfície e do complexo apical (Cowman *et al.*, 2006)

No interior das hemácias, os parasitos passam por um novo ciclo de reprodução assexuada gerando esquizontes repletos de merozoítos. Após a ruptura das células estes merozoítos irão invadir novos eritrócitos mantendo, assim, o ciclo eritrocítico. No caso do *P. vivax*, os eritrócitos jovens (reticulócitos) são infectados, explicando a menor parasitemia observada na infecção por essa espécie (Mueller *et al.*, 2009).

Durante o ciclo eritrocítico, dentro das hemácias, alguns parasitos se desenvolvem em gametócitos masculino e feminino. Após a ingestão pela fêmea do mosquito *Anopheles*, estes irão se fundir e originar o zigoto, que por sua vez, se transformará em um oocineto móvel. O oocineto já maduro migra até o epitélio do intestino médio para então se diferenciar em oocisto. Por um período de aproximadamente dez dias irá amadurecer, quando estiver atingido a maturidade irá liberar os esporozoítos na circulação.

Os esporozoítos circulantes invadem as glândulas salivares do mosquito e a inoculação destes durante o repasto sanguíneo no mamífero irá completar o ciclo de vida do parasito (Cowman *et al.*, 2006, Mueller *et al.*, 2009).

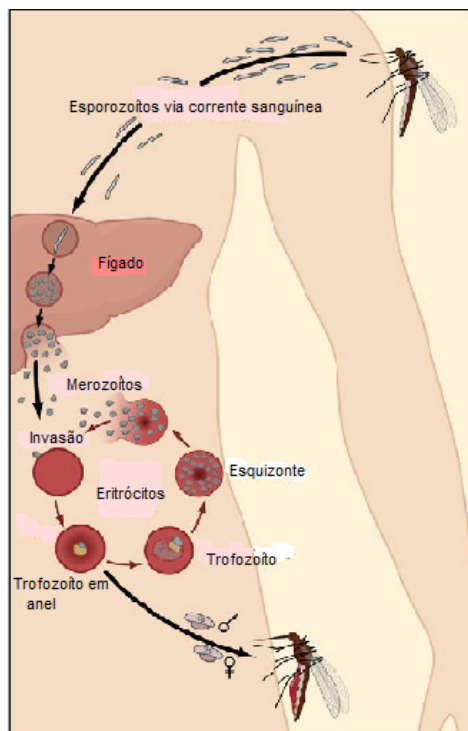


Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium*. Adaptado de Cowman & Craab, 2006

1.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS À INVASÃO DO ERITRÓCITO PELO *PLASMODIUM*

Na malária, a invasão do eritrócito pelos merozoítos extracelulares é um passo essencial, e a entrada rápida e eficiente para a célula hospedeira tem sido importante para o sucesso evolutivo do agente etiológico da malária. (Cowman e Crabb, 2006) (Figura 3)

A saída do interior dos hepatócitos na infecção por *P. falciparum* envolve um rápido aumento da pressão intracelular acompanhado de alterações celulares e bioquímicas que promovem o deslizamento do citoesqueleto na célula parasitada, para que dessa forma ocorra a liberação e dispersão eficaz dos merozoítos. A causa para a elevação da pressão intracelular e a destruição do citoesqueleto que precedem a ruptura da célula ainda não é totalmente esclarecida. Com relação a essa última etapa, acredita-se que a presença de proteases esteja envolvida e que esse processo ocorre em duas etapas, de tal modo que a destruição e a ruptura da membrana do vacúolo ocorram

distintamente. Entre as proteases candidatas a participarem desse processo, inclui membros como o antígeno repetido de serina (SERA), localizado no vacúolo parasitóforo. A família SERA é importante para os estágios de saída dos esporozoítos do oocisto (estágio do ciclo que ocorre no hospedeiro invertebrado), atuando como as proteases em geral. Em situação particular, essa família participa da lise das células do hospedeiro (Hodder *et al.*, 2003).

Depois da liberação dos merozoítos estes irão reconhecer, se ligar a superfície do eritrócito para que ocorra a etapa de invasão, fenômeno que ocorrerá de maneira rápida, provavelmente com duração de minutos. A rapidez e a eficácia de como essa etapa ocorre é explicada pela susceptibilidade dos antígenos de superfície do parasito ao sistema imune, evitando que o mesmo seja reconhecido. (Aly & Matuschewski, 2005).

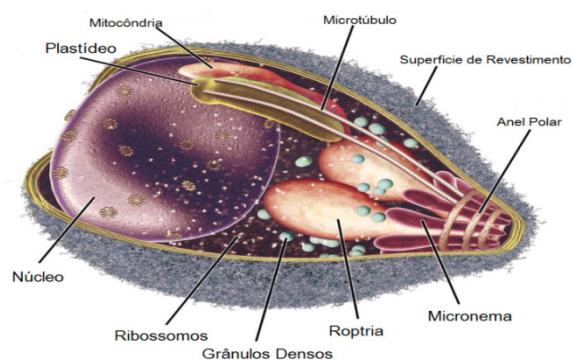
O contato inicial entre o merozoíto e o eritrócito é uma etapa crucial, na qual o parasito deve reconhecer de maneira efetiva os eritrócitos mais viáveis para serem parasitados. A etapa inicial deste reconhecimento e a posterior adesão primária ocorrem relativamente com uma grande distância, aparentemente com baixa afinidade e de forma reversível, sendo que nesta fase, a ligação do merozoíto ocorre em qualquer ponto da superfície do parasito. Após a adesão, ocorrerá a reorientação, com objetivo de promover a justaposição da extremidade apical dos merozoítos com a membrana do eritrócito, permitindo uma maior interação entre ambos, sendo que para entrar na célula, há formação de uma junção entre a membrana do eritrócito e do parasito, com a diminuição do espaço entre as membranas dos mesmos. A junção formada tem alta adesão e movimentos de orientação do lado apical para a extremidade posterior do merozoíto, com uma série de eventos que envolvem o complexo de movimentos actina-miosina (Keeleyand e Soldati, 2004).

Um dos principais eventos que ocorrem, envolve a remoção do revestimento que recobre a superfície dos merozoítos por ação de enzimas proteolíticas, como exemplo da serina protease, localizada nas organelas do micronema apical do parasito. Grande parte da superfície de revestimento dos merozoítos é composta de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que se encontra ancorada a proteínas de membrana.

Atualmente são nove âncoras de GPI associadas a proteínas conhecidas, localizadas na superfície do merozoíto de *P. falciparum*, todas com

potencial para ligantes de eritrócitos. Tais proteínas ancoradas por GPI não estão necessariamente dispostas de maneira uniforme sobre a superfície do merozoíto, e algumas tem localização mais apical, com diferentes funções no processo de invasão eritrocitária. Além da âncora de GPI, algumas proteínas apresentam similaridades incluindo domínios ricos em cisteína, com um potencial significativo para a aderência (Sanders *et al.*, 2005).

A



B

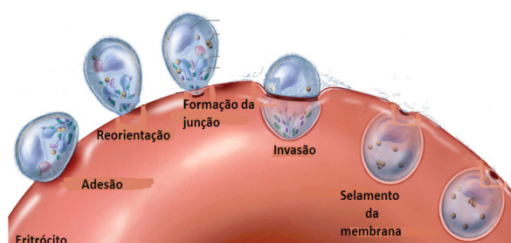


Figura 3: A. Diagrama de um merozoíto, apresentando em destaque as organelas e estruturas celulares. **B.** Esquema do processo de invasão do merozoíto no eritrócito (figura adaptada de Srinivasan *et al.*, 2011).

Como citado anteriormente, o contato inicial do merozoíto com a superfície das hemácias é reversível, de baixa afinidade e as Proteínas de Superfícies do Merozoíto (MSPs) serão mediadoras desse primeiro contato. Algumas dessas MSPs (MSP 1, 2, 4, 5, 8 e 10) se manterão ancoradas a membrana pela cauda de GPI (glicosilfosfatidilinositol), no entanto outras proteínas (MSP 3, 6, 7, e 9) são solúveis e estão associadas apenas a superfície do merozoíto. (Gaur *et al.*, 2004). Essas proteínas possuem além da âncora de

GPI domínios que são ricos em cisteína, do tipo EGF (Fator de Crescimento Epidermal), que são de grande importância para reações protéicas de interação necessárias para que a adesão ocorra. (Cowman e Crabb, 2006)

Na etapa seguinte, a invasão do merozoíto à hemácia consiste no direcionamento do complexo apical para a membrana da célula do hospedeiro. Há indícios que o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) seja a proteína principal presente nesta fase do ciclo, pois anticorpos anti-AMA-1 são capazes de bloquear essa reorientação do complexo apical, mas sem interferir na adesão inicial. Porém os mecanismos moleculares que promovem essa reorientação ainda não estão totalmente esclarecidos. (Mitchell *et al.*, 2004).

Com a reorientação é estabelecido a formação de um complexo de junção localizado entre as membranas do parasito e da superfície da hemácia. Essa ligação é irreversível, com ligações protéicas de alta finidade, e logo após a sua formação irá se iniciar o processo de invasão, onde as moléculas responsáveis por esse processo estão localizadas nas róprias e nos micronemas dos merozoítos (Figura 3 A).

Muitas famílias de proteínas estão presentes nesse processo de invasão do eritrócito, dentre elas pode-se citar: proteínas de superfície dos merozoítos (MSP), as proteínas ligantes do tipo “Duffy” e as proteínas ligantes de reticulócitos. (Gaur *et al.*, 2004; revisto por Cowman e Crabb, 2006). A primeira família está composta pela Proteína Ligante de Duffy (DPB) e proteínas homólogas a esta, representadas pela MAEBL e pelos antígenos ligantes de eritrócitos (EBA-175, EBA 140, e EBA -81), que irão se ligar aos resíduos de ácido siálico de glicoforinas (revisto por Gaur *et al.*, 2004). A segunda família está incluída a Proteína Ligante de Reticulócito (RBP) de *P.vivax* e suas homólogas nas demais espécies. Alguns trabalhos apontam que AMA-1 juntamente com as proteínas RONS 2, 4, 5, localizados na junção também seriam importantes para a invasão dos eritrócitos (revisto por Gaur *et al.*, 2004; Galinski *et al.*, 1992).

1.4.1 PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS (MSP1)

Diversos estágios do ciclo do parasito vêm sendo estudados como possíveis alvos em potencial para o desenvolvimento de vacinas. Uma das candidatas mais importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra as

formas eritrocitárias de *P. falciparum* e *P. vivax* é a Proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1), presente em todas as espécies de *Plasmodium*, pois seus determinantes conservados são importantes na aquisição de imunidade (Good, 2005).

Durante o processo de esquizogonia a MSP1 é sintetizada, como um precursor de 195 kDa, e se associa às proteínas MSP6 e MSP7, em um complexo que será ancorado à membrana pela âncora de GPI. Quando os merozoítos são liberados, as proteínas desse complexo passarão por um processamento primário pela ação da protease Sub 1, a inibição dessa enzima impedirá que ocorra a invasão dos merozoítos nas hemácias. A primeira clivagem quebra a MSP1 em quatro fragmentos, um N-terminal de 83 kDa (MSP1₈₃, dois fragmentos internos de 30 e 38 kDa MSP1₃₀ e MSP1₃₈) e um fragmento C terminal de 42 kDa. No momento da invasão do eritrócito, ocorre um segundo processamento, que é por meio da protease Sub 2, quando a MSP1₄₂ é clivada, gerando um fragmento de 33 kDa solúvel (MSP1₃₃) e outro de 19kDa (MSP1₁₉).

O fragmento C-terminal de 19 kDa apresenta dois domínios do tipo EGF, que permanece ancorado à membrana no momento da invasão, sinalizando que esta deve exercer um papel importante nessa fase. Existem evidências que apenas o fragmento de 19 kDa permanece ancorado á membrana pela fração glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo carregado para dentro dos eritrócitos (Blackman *et al.*,1991).

A comparação estrutural da MSP-1 entre diferentes espécies de *Plasmodium* revela que esta proteína apresenta regiões conservadas, semi-conservadas e variáveis. As regiões conservadas apresentam poucas mutações pontuais e, portanto, poucas modificações de aminoácidos, sugerindo que esta parte da molécula tem importantes propriedades funcionais ou estruturais (Del Portillo *et al.* , 1991).A partir da determinação da estrutura primária do gene que codifica a *PvMSP1*, diversas proteínas recombinantes, baseadas nas sequências que codificam as regiões N ou C terminais da molécula, foram expressas em diferentes vetores de expressão (Cunha *et al.*, 2001).

A função exata da MSP1 ainda não é totalmente conhecida, mas evidencias apontam para o seu envolvimento no processo de invasão dos eritrócitos, uma vez que anticorpos anti-MSP1₁₉ presentes no soro humano são capazes de inibir a invasão. Os anticorpos que bloqueiam o processamento

secundário da MSP1 também são capazes de impedir que ocorra a invasão, e uma vez que a MSP1₁₉ permanece intacta e persiste por todo o ciclo intracelular, sugere-se que esta proteína exerça alguma função nesta fase de desenvolvimento do parasito (Dluzewski *et al.*, 2008).

1.4.2 PROTEÍNA LIGANTE DE DUFFY (DBL)

As proteínas ligantes de Duffy presentes no *P. vivax* estão localizadas nos micronemas e são de extrema importância para que ocorra invasão dos eritrócitos por essa espécie de *Plasmodium*. Na década de 70, a importância dessas proteínas foi observada, quando ocorreu a identificação de indivíduos refratários à infecção não possuíam o receptor sanguíneo Duffy. (Miller *et al.*, 1975; Miller *et al.*, 1976). Por conta desse fator, justificava-se a baixa incidência de malária no Oeste da África, devido a elevada presença do fenótipo Duffy negativo na população desta região.

As proteínas do micronema, incluindo a proteína ligante de Duffy (DBP) tem uma importante função na invasão dos reticulócitos durante o estágio assexuado do ciclo sanguíneo na infecção pelo *P. vivax*. Miller e colaboradores em experimentos realizados “*in-vitro*”, conseguiram confirmar que, merozoítos de *P. vivax* e *P. knowlesi* não invadiam eritrócitos em indivíduos Duffy negativos, posteriormente, Barnwell e colaboradores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados por Miller (Miller *et al.*, 1979; Barnwell *et al.*, 1989)

A proteína ligante de Duffy (DBP) é um membro da família das proteínas ligantes do grupo sanguíneo Duffy (DBL) presente na superfície dos eritrócitos, expressa nos micronemas e na superfície dos merozoítos de *P. vivax*, e está associada diretamente a fase de formação da junção durante o processo de invasão eritrocítica. (Horuk *et al.*, 1993) Por conta dessa importância na interação com receptores cognatos, a DBP pode ser considerada um importante candidato a compor uma preparação de vacina antimalárica.

A proteína ligante de Duffy é caracterizada por uma região rica em cisteína, próxima ao domínio N-terminal, uma região intermediária de baixa complexidade, seguida de outra região rica em cisteína, uma porção transmembrana e uma porção C-terminal intracitoplasmática. A porção central

quando comparada a outros domínios da DBP apresenta uma região hipervariável, e de polimorfismos que ocorrem com frequência em um determinado padrão (Horuk *et al.*, 1993).

O ligante funcional da PvDBP está localizado na região II, que contém cerca de 330 aminoácidos. O sítio de ligação ao eritrócito está situado na posição do aminoácido 170, na área entre as cisteínas 5 e 8 do domínio da DBL. Essa região é altamente polimórfica, e pode sugerir uma seleção positiva do parasito, decorrente da pressão exercida pelo sistema imune do hospedeiro (Cole-Tobian *et al.*, 2003).

Os anticorpos adquiridos naturalmente anti-DBP são predominantes em moradores de áreas onde a malária é endêmica, porém estes indivíduos expostos mostram diferenças significantes qualitativa e quantitativamente para a resposta imune sorológica anti-DBP. Geralmente a resposta sorológica para DBP e para a atividade da DBP ligante de eritrócito aumenta de acordo com a idade, sugerindo que existe um efeito de reforço que potencializa a resposta devido à exposição repetida através de infecção recorrente. Os anticorpos na resposta a primeira infecção por *P. vivax* reconhecem epitopos conformacionais e não é amplamente protetora, enquanto que uma imunidade mais efetiva só é obtida após episódios repetidos de exposição (Cerávolo *et al.*, 2005, Grimberg *et al.*, 2007).

Exposições repetidas em indivíduos residentes na Papua Nova Guiné, onde a malária causada por *P. vivax* é endêmica, parece favorecer a resposta de anticorpos, sendo observado correlação entre a produção de anticorpos que são reativos a epitopos lineares na região ligante da DBP e as exposições repetidas à malária. Esta proteína se liga ao antígeno Duffy, receptor para quimiocinas (DARC) que está presente na superfície dos eritrócitos, através da região II da DBP (DBP-RII), que corresponde a região N-terminal conservada, rica em cisteína. (King *et al.* ,2008).

O receptor DARC é uma proteína transmembrana com 7 α –hélices, que funciona como receptor de várias quimiocinas e a ligação entre a região II da DBP ocorre na região extracelular N-terminal de 35 aminoácidos deste receptor. A ligação da proteína DBP ao antígeno Duffy é de extrema importância para o estabelecimento da infecção pelo *P.vivax*, a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos do *P.vivax* é um evento essencial para que ocorra o ciclo completo

do parasito, e é um processo com múltiplos estágios que depende de uma cascata de interações moleculares específicas (Gaur *et al.*, 2004).

Durante o processo de invasão a PvDBP é secretada a partir dos micronemas e se liga ao seu receptor cognato na superfície dos reticulócitos, no caso o receptor DARC, a partir daí ocorrerá uma ação coordenada de eventos múltiplos para a fixação do parasito na célula do hospedeiro, reorientação para que a extremidade apical seja colocada adjacente à superfície da membrana no eritrócito, ocorrendo a penetração ativa na célula do hospedeiro. Para que este processo ocorra um evento central é o estabelecimento de uma estrutura denominada anteriormente de junção, responsável por formar uma ligação forte entre as membranas no parasito e do hospedeiro, sendo que para *P. vivax*, a formação desta junção irreversível é mediada pela Pv DBP(Aikawa *et al.*, 1978).

1.4.3 PROTEÍNA LIGANTE DE RETICULÓCITOS (RBP)

O *P. vivax* infecta preferencialmente os reticulócitos e não eritrócitos maduros, uma vez que o receptor para Duffy está presente tanto em hemácias maduras quanto jovens, foi sugerido que deve ocorrer um processo de seleção nas células do hospedeiro em uma etapa anterior a da formação da junção merozoíto-eritrócito, por conta desse fato, o parasito não invade células consideradas não alvo (Galinski *et al.*, 1992).

Duas proteínas de alto peso molecular foram identificadas em *P. vivax*, a PvRBP-1 e a PvRBP-2, e associadas somente aos reticulócitos, indicando que estas proteínas são responsáveis pela seleção e invasão apenas desse tipo celular. (Galinski *et al.*, 1992). Ao entrar na corrente sanguínea, esses merozoítos têm contato com inúmeros outros tipos celulares, invadindo somente as jovens, isso é possível pelo fato dessa primeira junção formada ser reversível, permitindo, assim, selecionar a célula de interesse, no caso os reticulócitos.

A PvRBP-1 e PvRBP-2 são proteínas de membrana de aproximadamente 330 kDa, cada uma possui um amplo domínio extracelular, um único domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. (Galinski *et al.*, 1996).

Após o sequenciamento da cepa Salvador I, ficou evidente que Pv RBP é composta por diversos representantes, e constitui uma família com outras proteínas ligadoras de reticulócitos. De acordo com Carlton e colaboradores (2008), foram identificados genes *rbp* adicionais no genoma do *P. vivax*, incluindo múltiplos genes *rbp2*, que podem fornecer ao *P. vivax* grande diversidade de mecanismos para invasão celular. Esses resultados mostram que o *P. vivax* não possui um mecanismo simples de invasão celular, e, possivelmente, também possui vias alternativas.

1.5 INFECÇÕES POR *PLASMODIUM VIVAX* ASSOCIADAS AO GENÓTIPO DUFFY

O sistema sanguíneo Duffy apresenta quatro alelos principais: FY*A, FY*B, FYB^{ES} e FY*X, identificados pela nomenclatura atual (Olsson et al., 1998). Também tem sido identificado o alelo nulo por FY(FY*B-33) e o FY*X por FY*b^{fraco}. Esses alelos expressam, respectivamente, os antígenos Fy^a, Fy^b, e Fy e uma menor quantidade de Fy^b(Fyb^{fraco}). A apresentação desses antígenos pode ser em homozigose (Fy^aFy^a, Fy^bFy^b,) ou heterozigose (Fy^aFy^b, Fy^bFy^a, Fy^aFy^b, FyFy ou diferentes combinações de Fyb^{fraco}). Os antígenos desse sistema são constituídos por glicoproteínas transmembranas que atuam como receptores para quimiocinas. Portanto, trata-se de uma proteína expressa também em diversos tecidos não eritróides tais como: células de Purkinje do cerebelo, placenta, pâncreas, intestino, baço, coração, pulmão, rim e tecidos musculares (Peiper et al., 1995).

Os antígenos Fy^a e Fy^b são codificados por duas formas alélicas do gene FY. Os alelos FYA e FYB diferem entre si por uma substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo FYA, a base é guanina (G) e no alelo FYB a base é adenina (A). Assim, o resultado é a produção de um códon para glicina no aminoácido 42 no alelo FYA, e um códon para ácido aspártico no alelo FYB. Essa substituição de um aminoácido da proteína é suficiente para definir os dois antígenos. O resultado dessa variação leva à identificação dos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+) (Figura 4) (Iwamoto et al, 1995, Tournamille et al., 1995).

O segundo polimorfismo, ocasionado a partir da transição de nucleotídeos T→C, decorrente de uma mutação pontual na região promotora do gene FYB, o GATA-box, comumente observado em populações de origem negra e que, em decorrência dessa mutação, apresentou a interrupção no fator de transcrição eritróide GATA-1, causando a ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas na superfície do eritrócito, sem alterar sua expressão nos demais tecidos e, conseqüentemente, esses indivíduos podem vir a desenvolver anti-Fy^a, mas não Fy^b (Figura 5) (Iwamoto *et al*, 1995).

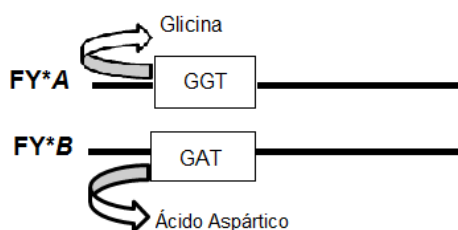


Figura 4: Esquema com a indicação do polimorfismo do gene FY entre os alelos F^{*YA} e F^{*B}, com a substituição de base F^{*YA}- Guanina(G) para F^{*B} Adenina (A). A substituição resulta no códon para glicina no aminoácido 42 no alelo F^{*YA} e um códon para ácido aspártico no alelo F^{*B} (Adaptado de Iwamoto *et al*, 1995).

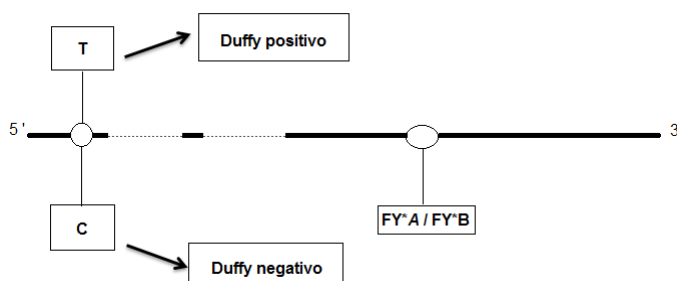


Figura 5: Esquema com a representação do polimorfismo da região promotora 5' e da região do éxon 1, 3': A presença de timina na região promotora ocorre nos indivíduos Duffy positivo, com a expressão do alelo F^{*A} ou F^{*B}. Quando o nucleotídeo apresenta citosina, o genótipo é Duffy negativo, quando não há a expressão dos alelos F^{*A} e F^{*B} (Adaptado de Iwamoto *et al*, 1995).

A proteína do grupo sanguíneo Duffy não é essencial para estrutura e função normal das hemácias, pois mesmo em indivíduos com fenótipo Duffy negativo as hemácias apresentam viabilidade e funções compatíveis com a normalidade (Tournamille *et al*.,1995).

O fenótipo Fy (a-b-) é muito comum em populações africanas, no entanto, em um estudo com indivíduos residentes no Brasil observou uma alta frequência da mutação (12,5%) - 33T > C em indivíduos com ancestrais caucasianos, demonstrando que, na população brasileira não é observado distinção clara entre raças (Castilho *et al.*, 2004, Cavasini *et al.*, 2007 b).

Em estudos realizados objetivando criar um modelo com padrões globais de distribuição dos alelos Duffy, juntamente com seus respectivos genótipos Duffy negativo, observou-se que o aspecto principal é a presença do alelo silencioso FY*B^{Es} em toda a África Subsaariana, enquanto que os alelos FY*A ou FY*B na mesma região apresentam frequência que varia entre 0 a 5%. Frequências desses alelos encontradas principalmente em regiões do oeste, leste, e centro do continente africano, mostram que a população local é resistente à malária causada por *P. vivax*.

Recentemente, houve avanços significativos no entendimento, na análise estrutural e funcional dos antígenos de grupos sanguíneos, expressos tanto nas hemácias quanto nos tecidos não eritróides. A descoberta do soro anti-Fy^a ocorreu em 1950, com a detecção de uma aglutinina no soro de um paciente hemofílico e politransfundido ainda não reconhecida como antígeno de grupo sanguíneo. Esse anticorpo foi chamado anti-Fy^a em homenagem ao paciente em questão, Sr. Duffy, e reagia com 64,9% das 205 amostras de sangue testadas de indivíduos não aparentados na população inglesa.

No ano seguinte, foi identificado o anti-Fy^b, anticorpo que reconhece o antígeno Fy^b. (Ikin *et al.*, 1951). Em 1955, Sanger e colaboradores observaram que o fenótipo Fy(a-b-) era o mais comum em afro-americanos e que, provavelmente, representava um produto de um alelo silencioso, FY.

Nas Américas, observa-se uma maior heterogeneidade na distribuição dos três alelos, sendo que somente em algumas regiões é possível observar uma frequência de distribuição maior desse alelo, fora dessas regiões de alta predominância. O FY*A permanece com uma baixa incidência fora do continente Africano. O alelo FY*B é prevalente em algumas regiões como norte, nordeste, e sul da África, enquanto o alelo silencioso FY*A foi pouco encontrado, confirmando a baixa frequência de distribuição devido a sua raridade (Howes *et al.*, 2011).

A baixa frequência de casos de malária associada ao *P. vivax* na África, quando comparada ao resto do mundo é consequência da falta de expressão do antígeno Duffy nos eritrócitos da população africana, sendo predominante o alelo nulo em homozigose. Embora no continente africano o *P. vivax* seja significativamente menos frequente que o *P. falciparum*, há regiões consideradas endêmicas, tais como o Sudão, Etiópia e Somália, cuja população é predominantemente Duffy positiva (Howes *et al.*, 2011, Kempnińska-podhorodecka *et al.*, 2012).

Diversos estudos voltados para investigar a susceptibilidade à malária causada por *P. vivax* associado ao genótipo Duffy tem sido desenvolvidos, com base no conhecimento de que o *P. vivax* utiliza o antígeno Duffy da superfície do eritrócito para realizar o processo de invasão celular. Entretanto, estudos mais recentes mostram que o *P. vivax* é capaz de invadir a hemácias de indivíduos Duffy negativos. Essa descrição é recente e sugere que a invasão pode ocorrer através de outros receptores, sugerindo que o parasito esteja utilizando rotas alternativas para infectar o reticulócito (Ryan *et al.*, 2006, Cavasini *et al.*, 2007-a, Ménard *et al.*, 2010, Carvalho *et al.* 2012).

1.6 AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MSP1₁₉ NA MALÁRIA POR *P. VIVAX*

Em regiões endêmicas de malária, a aquisição de anticorpos depende principalmente de fatores como a idade e o tempo de exposição ao parasito. Em crianças com idades até seis meses a probabilidade de infecção é menor devido à presença de anticorpos herdados passivamente da mãe durante o processo gestacional, porém, após o término dessa imunidade passiva, as crianças passam a ser uns dos mais frágeis alvos da malária por seu sistema imune ainda não ser suficientemente desenvolvido, bem como por ainda não ter sido muito exposta à malária (Valero *et al.*, 1998; Sachdeva *et al.*, 2004).

Vários estudos mostraram que a interação merozoíto-eritrócito pode ser bloqueada *in vitro* por anticorpos adquiridos naturalmente por indivíduos expostos em área endêmica. Também tem sido observado que, roedores e primatas se tornam parcialmente protegidos após receberem doses de MSP1₁₉ recombinante espécie-específica, os anticorpos produzidos contra este fragmento

são capazes de induzir algum grau de proteção nos animais imunizados (Valero *et al.*, 1998, Sachdeva *et al.*, 2004).

O ciclo do *Plasmodium* tem diversas formas evolutivas, e em cada fase do ciclo ocorre a expressão de um conjunto de moléculas que são importantes para o estabelecimento da infecção. Essas moléculas apresentam propriedades antigênicas, portanto, influenciam na resposta imune. Vários estudos foram desenvolvidos visando à identificação dessas proteínas e dos genes que as codificam, bem como a análise do seu perfil imunogênico. Entre as principais proteínas encontram-se a proteína circunsporozoíta (CS), a proteína 1 de superfície do merozoíta (MSP1) e a proteína ligante de Duffy (Miller *et al.*, 1975, 1976, Galinski *et al.*, 1992, 1996, Souza-Neiras, *et al.*, 2007, Sorti-Melo *et al.*, 2009)

A resposta imune contra o estágio eritrocítico é de fundamental importância para a aquisição de imunidade protetora contra a malária, pois as formas sanguíneas do parasito desencadeiam os eventos responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Estas formas parasitárias são particularmente imunogênicas e ativam clones de linfócitos B, sendo a MSP1 um dos principais alvos imunogênicos (Hafalla *et al.*, 2011).

Estudos soroepidemiológicos mostraram que indivíduos infectados com *P. vivax* produzem anticorpos contra a região C-terminal da proteína 1 da superfície de merozoíta (PvMSP1₁₉). Na região Amazônica a resposta imune naturalmente adquirida contra esta espécie foi bem caracterizada, observou-se que a PvMSP1₁₉ é imunogênica para a maioria dos indivíduos expostos ao *P. vivax*. Devido à importância epidemiológica da malária causada por essa espécie, os estudos que visam analisar a aquisição de anticorpos podem contribuir para identificação de marcadores sorológicos, contribuindo com estudos que envolvem aspectos relacionados à epidemiologia e a resposta imune do hospedeiro (Soares *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2001 *et al.*, Nina, 2004).

Diversos estudos têm mostrado que esta proteína é reconhecida por anticorpos IgG, confirmando seu alto potencial imunogênico, e grande capacidade de induzir resposta imune em humanos (Soares *et al.*, 1997; Cunha 2001 *et al.*, Nina, 2004). Em 2001, Cunha e colaboradores analisaram a resposta de anticorpos IgG contra seis proteínas recombinantes contendo a MSP1_{19e} observaram que, a proteína expressa em fusão com apenas seis resíduos de

histidina e contendo 89 aminoácidos para a região C-terminal da proteína 1 da superfície do merozoito (His₆-MSP1₁₉) foi a mais reconhecida por soros de indivíduos expostos à malária.

Outro estudo analisou amostras de indivíduos residentes na ilha de Cotijuba, estado do Pará, mostrando que a resposta de anticorpos correlacionava com o tempo decorrido do último episódio de malária; sendo que das 104 amostras analisadas, 41 pacientes relataram ter tido pelo menos um episódio de malária há mais de seis meses, 32 pacientes informaram que nunca apresentaram episódio da doença e 31 indivíduos tinham tido malária a menos de seis meses. Os resultados mostraram que o grupo de indivíduos exposto mais recentemente apresentou maior frequência de positivos com anticorpos IgG capazes de reconhecer a MSP1 de *P. vivax* (Soares *et al.*, 1999).

O papel das diferentes subclasses de IgG específicos, ainda continua relativamente pouco elucidado, alguns estudos tem mostrado que anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3 estão predominantemente presentes na resposta para este antígeno. (Soares *et al.*, 1997). Em indivíduos que residiam na Coréia, identificou-se que, aproximadamente em média, 90% destes infectados por *P. vivax* apresentaram anticorpos específicos para MSP1₁₉ (Lim *et al.*, 2000).

Diversos estudos têm observado que a MSP1₁₉ de *P. vivax* é imunogênica quando comparada a outras proteínas (Cunha *et al.*, 2001). Além disso, a detecção de anticorpos anti-MSP1₁₉ tem sido proposta como um marcador de exposição à malária (Cunha *et al.*, 2014). A exposição contínua aos antígenos do parasito contribui para a aquisição de anticorpos específicos. A detecção e a análise dos níveis desses anticorpos em estudos soropidemiológicos podem fornecer informações sobre a intensidade da transmissão (Corran *et al.*, 2007).

Neste estudo, realizaremos a detecção de anticorpos IgG que reconhecem a porção C-terminal da MSP1, como um marcador sorológico de exposição à malária, no âmbito de uma estratégia complementar para analisar aspectos da infecção por *P. vivax* em indivíduos de grupo sanguíneo Duffy negativo, que residem em área endêmica de malária.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aquisição de anticorpos e analisar aspectos do hospedeiro relacionados à invasão das formas sanguíneas na malária causada por *Plasmodium vivax*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a proteína recombinante contendo a porção C-terminal da Proteína 1 da Superfície de Merozoítos de *P. vivax* (His₆MSP1₁₉).
- Avaliar a aquisição natural de anticorpos da classe IgG que reconhecem a proteína recombinante derivada da Proteína 1 da Superfície de Merozoítos de *P. vivax* (PvMSP1).
- Comparar o reconhecimento da porção C-terminal da MSP1 (PvMSP1₁₉) por anticorpos IgG em indivíduos com diferentes genótipos do sistema sanguíneo Duffy.
- Estimar a concentração dos anticorpos IgG anti-PvSMP1₁₉ nos indivíduos com IgG positivo e que apresentam o genótipo do sistema sanguíneo Duffy negativo.
- Gerar informações acerca da resposta imune e exposição à malária diante do potencial de restrição da ligação do *P. vivax* nos reticulócitos do hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

As áreas selecionadas para esse estudo estão localizadas na mesorregião do sudoeste do estado do Pará, onde residiam indivíduos expostos ao risco de adquirir malária. Foram incluídas no estudo duas localidades, ambas são localidades ribeirinhas, localizadas em áreas onde ocorre registro de casos de malária. A localidade de São Luiz do Tapajós, na microrregião de Itaituba, com coordenadas geográficas: 04° 16' 24" S e 55° 59' 09" W. Essa localidade está situada no município de Itaituba (área territorial 62.040,95km²). A outra localidade é São Raimundo Nonato, no município de Aveiro (área territorial 17.074,051 km²), com coordenadas geográficas: 03° 36' 20" S e 55° 19' 54"W. Essas regiões são caracterizadas pelo clima tropical (quente e úmido), a estação chuvosa tem duração de dezembro a março, e o período seco, estende-se de abril a novembro, sendo que, nesse intervalo de tempo, registra-se o maior número de casos de malária.

As duas áreas de estudo caracterizam-se por estarem localizadas na área de abrangência da BR-163. A localidade de São Luiz do Tapajós situa-se à margem do rio Tapajós, afastada cerca de 60 km da BR 163(Cuiabá-Santarém), sendo que a maior parte da sua população é descendente de índios nativos e negros residentes, sofrendo pouca influência do processo de migração. A localidade de Aveiro também está na área de abrangência da BR 163, o acesso para a rodovia é pela PA-435. A maioria da população também descende de índios nativos e negros. Nas duas áreas de estudo, no ano da coleta das amostras, São Luiz do Tapajós (2007) e Aveiro (2008), foram registrados casos de malária por *P. vivax*. No total foram analisadas 257 amostras, sendo 180 de residentes de São Luiz do Tapajós e 77 de Aveiro.

As áreas de estudo são regiões onde a transmissão de malária é variável, sendo que o maior número de casos é causado por *P. vivax*. Nessas localidades, as condições sanitárias são deficientes, com pouco saneamento básico. Apesar de ter ocorrido uma redução no número de casos de malária no decorrer dos últimos anos no estado do Pará, o município de Itaituba ainda registra um número considerável de casos de malária. Em 2013, foram notificados

10.981 casos e com isso Itaituba detém 40% dos casos registrados no estado do Pará.

3.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue analisadas nesse estudo foram obtidas de indivíduos que residiam em duas áreas de transmissão de malária; a localidade ribeirinha de São Luiz do Tapajós e São Raimundo Nonato. As amostras foram coletadas em 2007 e 2008. O soro foi separado e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento da realização dos ensaios sorológicos.

No momento da coleta, a população foi esclarecida sobre o trabalho, os que concordaram em participar assinaram o termo de Consentimento Livre e esclarecido, conforme as normas de ética em pesquisa com seres humanos. Para todos os participantes foi realizada a pesquisa de *Plasmodium* pelo exame da gota espessa, conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde (Brasil, Ministério da Saúde, 2009). Todos os participantes foram atendidos por médicos do laboratório de genética humana e médica da Universidade Federal do Pará (UFPA), em conjunto com os técnicos da secretaria municipal de saúde de cada município. Para esta etapa do trabalho foi utilizada a infra-estrutura do posto de saúde local. Todos os que procuraram o serviço foram atendidos.

3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HIS₆-MSP₁₋₁₉ DE *P. VIVAX*.

Após a transformação de bactérias *Escherichia coli* (cepa BI21) com DNA plasmidal, a expressão e purificação foram realizadas, conforme descrito por Cunha (2000). A proteína recombinante His-MSP₁₋₁₉ foi purificada de *E.coli* cepa BI21 transformadas com o plasmídio pET14b-MSP₁₋₁₉. As bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram cultivadas em LB-ampicilina, a 37°C sob agitação. A expressão foi induzida com IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosídeo). Após o cultivo, o sedimento de bactérias foi resuspenso e sonificado. O sobrenadante foi incubado sob agitação em gelo com resina de níquel (Ni^{2+} -NTA-agarose, Quiagen). Após 1 hora, a resina foi aplicada em coluna para lavagem com o tampão de sonicação, seguida de tampão de lavagem (NaH_2PO_4 57 mM, NaCl 128 mM, glicerina 10%, pH 6,0).

As proteínas que se ligarem à coluna foram eluídas com tampão de lavagem contendo imidazol. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE e coradas por azul de Coomassie. Frações contendo as proteínas recombinantes em alto grau de pureza foram dialisadas contra PBS e a concentração foi determinada pelo método de Bradford.

3.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG.

A detecção de anticorpos IgG anti-MSP₁₉ foi realizada por ELISA, conforme descrito por Soares *et al*, 1997 e Cunha, 2001. O antígeno utilizado foi a proteína recombinante His₆MSP₁₉ produzida em bactéria. A concentração das proteínas foi ajustada para 4µg/ml em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6. As amostras foram testadas na diluição 1:100. Para a revelação foram utilizados solução contendo IgG de cabra, anti-IgG humano conjugado a peroxidase, em solução PBS-leite desnatado, respectivamente.

A reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/ml de orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma), diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução contendo H₂SO₄ 4N. A Densidade óptica foi determinada em um leitor de placas de ELISA usando comprimento de onda de 490 nm (DO₄₉₀). A absorvância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cut off"/ponto de corte) foi estabelecida pela média das absorvâncias produzidas por amostras de soros de indivíduos sem história clínica de malária, residentes em Belém, Pará, acrescida de três desvios padrões. Esses indivíduos foram selecionados entre doadores de sangue do centro de hemoterapia do estado do Pará (Hemopa).

3.5 GENOTIPAGEM DO SISTEMA SANQUÍNEO DUFFY

A genotipagem do grupo sanguíneo Duffy foi realizada por meio de biologia molecular com etapas de extração e amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa etapa do trabalho foi realizada pelo grupo do

professor Dr. João Farias Guerreiro do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, que irá fornecer os dados da genotipagem, conforme colaboração estabelecida, para realizar esse estudo na UFPA.

As amostras foram genotipadas utilizando primers específicos para a reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme a técnica descrita por Olsson e colaboradores (1998). A amplificação foi realizada para cada indivíduo. Os primers discriminaram os alelos FY*A e FY*B em quatro combinações diferentes de pares. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese, em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de 711 pares de base representam a amplificação dos alelos do sistema Duffy.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi parte do projeto de pesquisa “Estudos Moleculares e Imunoepidemiológicos visando estratégias de controle de Malária em Municípios localizados na área de abrangência da Rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo Progresso - Estado do Pará submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto (Anexo I), de acordo com o Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que trata das diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos.

Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa, no momento da coleta, receberam informações sobre os objetivos do trabalho, riscos e benefícios (Anexo II). Em seguida, foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III), que foi assinado por cada participante. As informações foram coletadas em uma ficha epidemiológica (Anexo IV).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por comparação das frequências de amostras positivas na análise sorológica, de acordo com os dados da genotipagem do sistema sanguíneo Duffy. As frequências foram obtidas por contagem diretas. Os testes foram executados no programa Bioestat versão 5.0. O nível de significância foi 0.05.

4. RESULTADOS

Neste estudo realizamos análise molecular e sorológica com a finalidade de avaliar aspectos relacionados ao grupo sanguíneo Duffy, que participa da interação parasito/hospedeiro na infecção por *P. vivax*, bem como a resposta de anticorpos adquiridos contra antígeno da fase sanguínea desse parasito. Para tanto, analisamos 257 amostras de indivíduos que residem em área de transmissão de malária, sendo que 180 amostras foram coletadas de indivíduos que residiam no município de São Luiz do Tapajós e 77 de indivíduos de Aveiro. As amostras de São Luiz do Tapajós foram coletadas no ano de 2007 e as de Aveiro no ano de 2008. Essas áreas foram selecionadas para este estudo com base no índice que estima o risco de malária na área, o IPA (Incidência Parasitária Anual). No ano da coleta dessas amostras, o perfil de registro de casos de malária nessas áreas caracterizava área de alto risco.

Inicialmente, analisamos os dados da genotipagem do sistema sanguíneo Duffy. Na tabela 1, podemos observar que os seis possíveis genótipos de Duffy foram identificados tanto nas amostras de indivíduos de São Luiz do Tapajós quanto em indivíduos de Aveiro, porém houve variação na distribuição desses genótipos nessas áreas. No grupo de indivíduos com genótipos que não expressam o antígeno Duffy (FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}), a frequência observada em São Luiz do Tapajós e Aveiro foi 20,0% e 7,8%, respectivamente.

No grupo de indivíduos com genótipos que expressam o antígeno Duffy, o genótipo mais frequente em São Luiz do Tapajós foi o FY^*A/FY^*A (23,9%) e em Aveiro foi FY^*B/FY^*B^{ES} (35,1%), enquanto que o genótipo menos frequente em São Luiz do Tapajós foi FY^*A/FY^*B^{ES} (9,4%) e em Aveiro foi FY^*A/FY^*A (6,5%). O mais frequente em São Luiz do Tapajós foi o menos frequente em Aveiro, mostrando variação no fenótipo Duffy positivo Fy(a+b-).

A frequência dos demais genótipos variou nas duas áreas. Em São Luiz do Tapajós variou de 12,2% a 20,0%, e em Aveiro variou de 9,1% a 25,9%. A comparação mostrou que houve diferença significativa, sendo que em São Luiz do Tapajós observamos mais indivíduos com genótipo Duffy negativo.

Tabela 1: Genotipagem do grupo sanguíneo Duffy em indivíduos que residiam em São Luiz dos Tapajós (Itaituba) e São Raimundo Nonato (Aveiro), no estado do Pará.

Genótipos de Duffy	Fenótipos de Duffy	Frequência dos genótipos do grupo sanguíneo Duffy % (n/N)	
		São Luiz do Tapajós N (%)	Aveiro N (%)
FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Fy(a-b-)	36 (20,0%)	6 (7,8%)
FY*A/FY*B ^{ES}	Fy(a+b-)	17 (9,4%)	7 (9,1%)
FY*B/FY*B ^{ES}	Fy(a-b+)	22 (12,2%)	27 (35,1%)
FY*A/FY*B	Fy(a+b+)	26 (14,5%)	12 (15,6%)
FY*A/FY*A	Fy(a+b-)	43 (23,9 %)	5 (6,5%)
FY*B/FY*B	Fy(a-b+)	36 (20,0%)	20 (25,9%)
Total		180 (100%)	77 (100%)

Valor do Qui-Quadrado: 29,353; p<0,0001

Com o intuito de analisar a aquisição de marcador biológico de exposição à malária, avaliamos a resposta de anticorpos em indivíduos com perfil genético com resistência natural à infecção por *P. vivax*, observamos que nas duas áreas houve casos de indivíduos Duffy negativos, os quais foram positivos para a pesquisa de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉. Entretanto, em São Luiz do Tapajós a porcentagem desses indivíduos foi maior que em Aveiro. Em São Luiz do Tapajós a frequência de Duffy negativos com anticorpos IgG foi 4,4% e em Aveiro foi 2,6% (Tabela 2). Com base nessa análise, podemos inferir que indivíduos Duffy negativos foram previamente expostos à infecção por *P. vivax*.

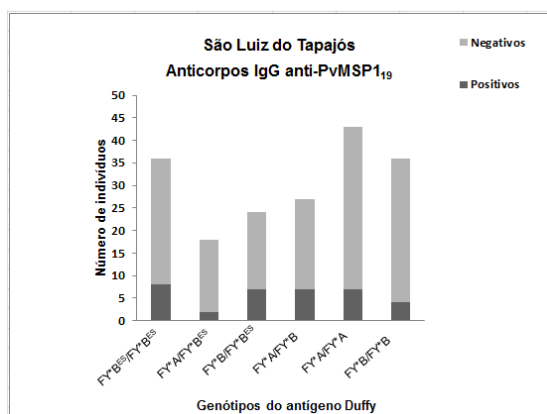
No grupo Duffy positivo, observamos que em Aveiro 32,5% apresentaram resposta de anticorpos IgG. Enquanto que em São Luiz do Tapajós apenas 16,1% do grupo Duffy positivo também foi positivo na sorologia, para detecção de anticorpos anti-PvMSP1₁₉. Esse resultado confirma que tanto no grupo Duffy negativo quanto no positivo, a população de São Luiz do Tapajós apresentou um perfil diferente da população de Aveiro.

Tabela 2: Frequência de indivíduos com genótipo Duffy negativo e positivo com anticorpos IgG que reconhecem o antígeno recombinante de *P. vivax*

Grupos de amostras	% IgG positivos (n/N)/Localidade	
	São Luiz do Tapajós	Aveiro
Indivíduos Duffy negativos com IgG	4,4% (8/180)	2,6% (2/77)
Indivíduos Duffy positivos com IgG	16,1% (29/180)	32,5% (25/77)
Total de indivíduos	20,5% (37/180)	35,1% (27/77)

No grupo de indivíduos que apresentaram anticorpos, realizamos uma análise mais detalhada visando determinar o número de indivíduos com IgG anti-MSP1₁₉ em cada um dos genótipos identificados. Nas duas áreas de estudo, identificamos indivíduos positivos para IgG em todos os genótipos (Duffy positivo e negativo). Em São Luiz do tapajós, identificamos 8 indivíduos Duffy negativo com IgG anti-MSP1₁₉ entre os 37 positivos na sorologia. Os outros 29 indivíduos (29/37) com IgG anti-MSP1₁₉ estavam distribuídos nos demais genótipos. Em Aveiro, identificamos 2 indivíduos Duffy negativo com IgG anti-MSP1₁₉ entre os 8 positivos na sorologia. Os outros 6 (6/8) indivíduos com IgG anti-MSP1₁₉ estavam distribuídos nos demais genótipos (Figura 6).

A



B

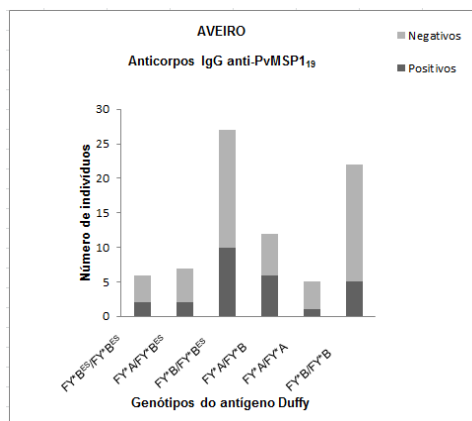


Figura 6: Análise descritiva da distribuição dos indivíduos com IgG anti-MSP1₁₉ em cada um dos genótipos identificados. A genotipagem foi realizada no total de 180 amostras em São Luiz do Tapajós e 77 em Aveiro. Os anticorpos IgG foram detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA) com os soros diluídos 1:100. Foram excluídas três amostras de São Luiz do Tapajós, as quais foram analisadas apenas na sorologia.

Na análise descritiva dos resultados da genotipagem e sorologia das amostras coletadas em São Luiz do Tapajós, podemos observar que o número de indivíduos com IgG observado no grupo Duffy negativo foi semelhante aqueles de dois grupos com Duffy positivo heterozigoto (FY^*B/FY^*B^{ES} , FY^*A/FY^*B) e um homozigoto (FY^*A/FY^*A). Enquanto que em Aveiro o número de indivíduos com IgG observado no grupo Duffy negativo foi menor que aqueles observados nos dois grupos com Duffy positivo heterozigoto (FY^*B/FY^*B^{ES} , FY^*A/FY^*B) e em um homozigoto (FY^*B/FY^*B).

Com a finalidade de realizar uma análise com a informação epidemiológica relacionada ao histórico de exposição prévia à malária, comparamos os grupos que relataram nunca ter tido episódio de malária com o grupo que relatou pelos menos uma exposição. Na tabela 3, podemos observar que com essas informações, foram identificados quatro indivíduos Duffy negativo com anticorpos IgG e que relataram nunca terem tido malária, sendo dois em São Luiz do Tapajós e dois em Aveiro. Também identificamos sete indivíduos Duffy negativo com anticorpos, mas que relataram episódio prévio de malária, sendo seis em São Luiz do Tapajós e um em Aveiro.

Essa mesma análise foi aplicada para os indivíduos com os demais genótipos, e também identificamos casos de indivíduos que não relatam exposição à malária, mas apresentaram anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ em quaisquer um dos outros cinco genótipos descritos.

Entre os 32 indivíduos que apresentaram genótipo Duffy negativo, e que residiam em São Luiz do Tapajós, no grupo não exposto, sem história clínica de malária foram identificados nove indivíduos IgG positivo. Entre esses indivíduos, somente dois indivíduos apresentaram o genótipo Duffy negativo (FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}). Em Aveiro, para o grupo não exposto foram identificados quatro indivíduos IgG positivo, sendo que dois apresentavam o genótipo Duffy negativo. Com base nessa análise, podemos observar que tanto na localidade de São Luiz do Tapajós quanto em Aveiro, detectamos casos de indivíduos Duffy negativo, que apresentaram sorologia positiva.

Com a finalidade de melhor caracterizar a aquisição de anticorpos, realizamos uma análise dos níveis séricos de anticorpos IgG, nos 10 indivíduos

Duffy negativo (Tabela 4). Os títulos de anticorpos variaram de 1:400 a 1:6400, sendo que três indivíduos relataram nunca terem tido malária. Os valores de densidade óptica e o índice de reatividade também apresentaram ampla variação. No exame da gota espessa não foi detectado parasito no sangue periférico. A maioria eram indivíduos adultos, sendo que a idade variou de 10 a 77 anos.

Com base nessa análise, podemos inferir que houve caso de exposição anterior, levando a aquisição natural de anticorpos IgG que reconheceram a porção C-terminal da PvMSP1 (Proteína 1 da Superfície dos Merozoitos), que é parte de uma das proteínas mais imunogênicas presentes nas formas sanguíneas de *P. vivax*.

Tabela 3: Exposição à malária e aquisição de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ distribuídos de acordo com o genótipo do antígeno Duffy

Genótipos de Duffy	Aquisição de anticorpos IgG anti-MSP1 ₁₉ / Exposição à malária							
	São Luiz do Tapajós				Aveiro			
	Nunca teve malária (N=103)		Exposição prévia à malária (N=77)		Nunca teve malária (N=30)		Exposição prévia à malária (N=47)	
	IgGPos	IgGNeg	IgGPos	IgGNeg	IgGPos	IgGNeg	IgGPos	IgGNeg
FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	2	21	6	7	2	2	1	1
FY*A/FY*B ^{ES}	0	9	2	6	0	3	2	2
FY*B/FY*B ^{ES}	2	9	5	6	2	10	6	9
FY*A/FY*B	2	15	4	5	0	4	6	2
FY*A/FY*A	2	22	6	13	0	1	1	3
FY*B/FY*B	1	18	3	14	0	6	5	9
Total	9	94	26	51	4	26	21	26

Tabela 4: Determinação dos níveis de anticorpos IgG em indivíduos Duffy negativos que residem em área de transmissão de malária e histórico da exposição prévia ao parasito

Amostra(código)	Análise molecular e marcadores de exposição à malária							Pesquisa de <i>Plasmodium</i> Gota Espessa
	Grupo sanguíneo Duffy		Resposta de Anticorpos IgG			Exposição prévia à malária		
	Genótipo	Fenótipo	DO ₄₉₀	IR	Título	Episódios	Idade (anos)	
7SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,592	2,99	1:3200	Nunca teve	55	Negativo
26SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,710	3,58	1:6400	2	77	Negativo
41SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,275	1,39	1:800	Nunca teve	46	Negativo
46SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,938	4,74	1:6400	2	67	Negativo
53SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,339	1,71	1:3200	1	26	Negativo
65SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,404	2,04	1:1600	1	21	Negativo
160SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,272	1,37	1:3200	1	35	Negativo
188SLT	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,268	1,35	1:1600	2	57	Negativo
37AV	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	0,762	1,78	1:400	Nunca teve	63	Negativo
58AV	FY*B ^{ES} /FY*B ^{ES}	Negativo	1,880	4,38	1:3200	3	10	Negativo

IR: Índice de reatividade (Valor da DO da amostra/valor de cut-off)

5. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos a distribuição dos genótipos que codificam o antígeno do grupo sanguíneo Duffy, com ênfase na análise da resposta de anticorpos IgG adquiridos por exposição natural à malária em indivíduos do grupo sanguíneo Duffy negativo. As duas áreas selecionadas para o estudo estão localizadas no estado do Pará, e foram classificadas como área de risco para a transmissão de malária. Com base na Incidência Parasitária Anual (IPA), os municípios onde estão as localidades de São Luiz do Tapajós, município de Itaituba, e, São Raimundo Nonato, município de Aveiro, foram classificadas no ano da coleta das amostras como áreas de alto risco para malária.

Na década de 70, foram realizados os primeiros estudos relacionados à identificação de um ligante na superfície das hemácias, que favorecia a infecção dessas hemácias pelo *P. vivax*. Tais estudos também mostraram que em populações Africanas a ausência desse ligante conferia uma proteção natural contra a malária causada por *P. vivax* (Miller *et al*, 1975, 1976). Desde então, foi muito bem estudado vários aspectos relacionados a esse ligante, incluindo os aspectos genéticos, moleculares, bioquímicos e imunológicos. No entanto, apenas recentemente, foi mostrado que indivíduos Duffy negativos podem ser infectados por essa espécie de *Plasmodium* (Ryan *et al*, 2006).

Inicialmente, realizamos a análise dos dados da genotipagem, e observamos que todos os genótipos estavam presentes nas duas populações, sendo que o genótipo mais frequente em São Luiz do Tapajós foi o FY*A/FY*A (23,9%) e em Aveiro foi FY*B/FY*B^{ES} (35,1%). Porém, não analisamos a associação de malária clínica com esses genótipos, pois todos os indivíduos apresentaram resultado negativo para a pesquisa de *Plasmodium ssp*. Deve ser ressaltado que essa não era a proposta do estudo. Tais populações foram selecionadas com base no histórico de exposição, sendo que em São Luiz do Tapajós 55,74% (102/183) dos indivíduos relataram nunca terem tido malária. Enquanto em Aveiro 38,96% (30/77), informaram nunca terem tido malária.

A proposta do nosso estudo foi analisar a aquisição de anticorpos em indivíduos Duffy negativos, uma vez que tem sido consistente a ocorrência de infecção nesse grupo. Vários estudos têm analisado a distribuição dos genótipos de Duffy e malária. Em 2010, Menard e colaboradores realizaram a genotipagem de 661 amostras coletadas de crianças em idade escolar e de diferentes origens, sendo 382 Asiáticas e 327 Africanas. Observou-se que 476 amostras eram genótipo Duffy negativo (72%) e 185 eram Duffy positiva. Entre as amostras analisadas de indivíduos Duffy negativo, 42 apresentaram resultado de PCR positivo para malária causada por *P. vivax* (8,8%). Desses 32 eram monoinfecção. Nesse mesmo estudo, também foram analisadas outras 183 amostras de pacientes infectados, 153 era monoinfecção por *P. vivax* e 30 apresentavam infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*. Entre esses 183 pacientes que tiveram malária clínica, 17 apresentavam o genótipo Duffy negativo.

No Brasil, o primeiro relato de indivíduos Duffy negativo infectados por *P. vivax* foi o trabalho de Cavasini e colaboradores (2007), no qual identificaram dois indivíduos Duffy negativo homozigoto (Fy*B-33) infectados. A infecção foi confirmada por diagnóstico molecular e pela identificação das variantes do *P. vivax*, realizada pela análise do gene da proteína circum-esporozoitada (CS). Também verificaram que os dois indivíduos apresentavam anticorpos IgG específico contra uma proteína recombinante de *P. vivax* (Pv200L).

Posteriormente, outro estudo também mostrou a ocorrência de um caso de infecção por *P. vivax*, quando analisou 678 amostras de indivíduos residentes em Anajás, no estado do Pará, uma área de alta endemicidade para malária. Foram identificados por diagnóstico molecular, dois indivíduos infectados entre os 29 indivíduos Duffy negativo (Carvalho et al., 2012). Nesse estudo a frequência de indivíduos Duffy negativo foi 4,3% (29/678). Enquanto que em no estudo que analisou amostras da Ásia e da África a percentagem de indivíduos Duffy negativo foi, consideravelmente, mais alta 72,0% (476/661). (Menard et al., 2010). Também foi realizada a análise por genotipagem de 205 amostras de pacientes da Etiópia, e avaliada a associação com malária, observou-se que entre 74 pacientes infectados por *P. vivax*, com resultado de

PCR e microscopia positiva, 41 eram do genótipo Duffy negativo (Woldearegai *et al.*, 2013).

No nosso estudo também foram encontrados indivíduos Duffy negativo com resultados de sorologia positivo, sendo que em São Luiz do Tapajós encontramos 8 pacientes, com uma frequência de 4,4%, e em Aveiro, encontramos também 2 pacientes com IgG positivo e genótipo Duffy negativo (2,6%), o que nos permite confirmar que houve exposição prévia aos antígeno do parasito.

Em 2010, Maestre e colaboradores realizaram uma avaliação detalhada da aquisição de anticorpos, utilizando antígenos de *P. vivax* e de *P. falciparum*; a PvCSP, PvMSP1, PvDBP e PfCSP e PfMSP1. Foram analisadas amostras de 233 doadores de sangue de regiões endêmicas de malária, localizadas na Colômbia. Nesse estudo, considerando todos os genótipos, foi observado 60% dos indivíduos apresentavam anticorpos IgG contra pelo menos um desses cinco antígenos. A frequência de indivíduos Duffy negativo foi de 26%, sendo que a maioria apresentou IgG anti-PvCSP (33%), seguido de anti-PvMSP1 (8%) e nenhum reconheceu a Pv-DBP. Quanto aos antígenos de *P. falciparum* o reconhecimento da Pf-CSP e PfMSP foi semelhante (10%).

No nosso estudo analisamos apenas a resposta contra PvMSP1₁₉, e observamos nas duas áreas, que a percentagem de indivíduos Duffy negativo e sorologia positiva foi menor que a observada na Colômbia. Essa diferença pode ser explicada em parte pela endemicidade, mas outros aspectos ainda precisam de mais estudos no sentido de explicar essa diferença.

Nas duas localidades incluídas no nosso estudo, a frequência de indivíduos Duffy negativo foi 20% e 7,8%, em São Luiz do Tapajós e Aveiro, respectivamente. A comparação mostrou diferença significativa na distribuição dos genótipos. Essa diferença pode explicar em parte a situação epidemiológica de São Luiz de Tapajós, onde historicamente há relatos de baixo registro de ocorrência de malária, mesmo estando em uma área de alto risco, o município de Itaituba. A comparação com outros estudos realizados no Brasil e em outros Países mostrou que essa variação por ocorrer, pois tem sido observado que a distribuição do genótipo Duffy negativo pode variar de 4,3% a

72,0%, como observado em estudos anteriores (Carvalho *et al.*, 2012, Maestre, 2010, Menard *et al.*, 2010).

Também tem sido observado que em determinadas áreas não foi encontrado indivíduos com genótipo Duffy negativo, mas encontraram genótipos Duffy positivos homozigoto para FY*A como predominante (52%). Esse também foi o genótipo que observamos como o mais frequente em São Luiz do Tapajós (Chittoria *et al.*, 2012).

Nesse mesmo estudo foi observado que o genótipo FY*B/FY*B estava associado a maior susceptibilidade à malária, sendo que a frequência desse genótipo foi 21,2%. Também no nosso estudo esse foi o genótipo que apresentou a maior frequência (25,9%) depois do genótipo FY*B/FY*B^{ES}. Essa análise mostra que o fenótipo Fy (a-b+) ocorreu com mais frequência na localidade do município de Aveiro, onde, há mais relato de casos de malária, com base nos índices epidemiológicos.

No estudo de Chittoria e colaboradores (2012) o FY*A/FY*A estava fortemente associado ao baixo risco de malária causada por *P. vivax*, em comparação ao genótipo FY*B/FY*B, desta maneira os autores mostraram que há uma associação negativa entre a malária e o genótipo FY*A/FY*A, associando este genótipo a um fator de resistência ao parasito, e o genótipo FY*B/FY*B com associação positiva com a malária por *P. vivax*, favorecendo a susceptibilidade a infecção.

No nosso estudo, observamos que São Luiz do Tapajós, onde a população foi predominantemente FY*A/FY*A, a maioria dos indivíduos apresentaram sorologia negativa para anticorpos IgG. Com base nessa comparação, podemos inferir que essa população poderia apresentar um perfil de resistência à malária associado ao genótipo FY*A/FY*A. Porém, essa análise ainda é preliminar e são necessários mais estudos complementares.

Com base nesses resultados, apresentamos evidências por sorologia, as quais indicam que indivíduos Duffy negativo podem ser infectados com *P.vivax*, assim, pode-se supor que o parasito poderia utilizar outros receptores que não Duffy, ou outros receptores de grupos sanguíneos para o

processo de invasão dos eritrócitos. Essa possibilidade pode ser corroborada com os resultados observados no estudo realizado com amostras da Colômbia (Maestre *et al.*, 2010), que também mostraram o reconhecimento da MSP1 por anticorpos IgG em indivíduos que residem em área endêmica.

Portanto, os dois estudos mostram a relevância de expandir as análises que envolvem a associação entre o grupo sanguíneo Duffy, a aquisição de anticorpos, a exposição prévia ao parasito e a infecção por *P.vivax*, visando colaborar para a compreensão dos mecanismos relacionados ao processo de invasão eritrocítica, a caracterização do perfil de susceptibilidade, bem como com a compressão de aspectos da epidemiologia da transmissão da malária causada por *P.vivax*, a espécie de *Plasmodium* mais relevante no Brasil e na América do sul.

6. CONCLUSÕES

1. A obtenção de proteína recombinante contendo a porção C-terminal da Proteína 1 da Superfície de Merozoitos de *P. vivax*(PvMSP1₁₉) possibilitou realizar análises relacionadas a resposta imune, a exposição ao *P. vivax* e os genótipos do sistema sanguíneo Duffy.

2. A genotipagem do antígeno Duffy em indivíduos que residem em duas áreas de transmissão de malária, localizadas no estado do Pará, mostrou que em ambas foram identificados indivíduos do genótipo Duffy negativo, sendo que em São Luiz do Tapajós esse fenótipo foi mais frequente que em Aveiro.

3. No grupo Duffy negativo, foram identificados indivíduos que apresentaram resposta de anticorpos IgG que reconheceram o antígeno recombinante derivado da MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1₁₉).

4. A comparação dos grupos que apresentam o antígeno sanguíneo Duffy mostrou que a resposta de anticorpo anti-PvMSP1₁₉ pode ocorrer em indivíduos Duffy positivo homozigotos ou heterozigotos.

5. A análise com base no relato de exposição à malária mostrou que tanto os indivíduos Duffy negativo quanto os Duffy positivo podem apresentar anticorpos com ou sem relato de episódio prévio de malária.

6. A determinação da concentração sérica dos anticorpos mostrou que houve variação nos níveis de IgG entre indivíduos Duffy negativo, indicando que a resposta ao antígeno de *P. vivax* foi específica e com variação individual.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AIKAWA, M.; MILLER, L. H.; JOHNSON, J.; RABBEGE, J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. **The Journal of cell biology**, v. 77, n. 1, p. 72-82, 1978.

ALY, A.S.; MATUSCHEWSKI, K. A malarial cysteine protease is necessary for Plasmodium sporozoite egress from oocysts. **Journal Experimental Medicine**. 202, 225–230, 2005.

BARNWELL, JOHN W.; NICHOLS, E.; RUBINSTEIN, P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by Plasmodium vivax. **The Journal of experimental medicine**, 169, n. 5, p. 1795-1802, 1989.

BLACKMAN, M.J.; LING, I.T.; NICHOLLS, S.C.; HOLDER, A.A. Proteolytic processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 produces a membrane bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. **Molecular Biochemical Parasitology**. 40:29-33, 1991.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos Epidemiológicos. 2013**. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em 21/05/2015).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos Epidemiológicos. 2014**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>. (Acessado em 21/06/2016).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos Epidemiológicos. 2015**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>. (Acessado em 25/06/2016).

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E., ... & CHENG, Q. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 757-763, 2008.

CARVALHO, T. A.; QUEIROZ, M. G.; CARDOSO, G. L.; DINIZ, I. G.; SILVA, A. N.; PINTO, A. Y.; GUERREIRO, J. F. Plasmodium vivax infection in Anajas, State of Para: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; PELLEGRINO, J. ; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; REID, M. E. A novel FY allele in Brazilians. **Voxsanguinis**, v. 87, n. 3, p. 190-195, 2004.

CAVASINI, C. E. DE MATTOS, L. C., COUTO, Á. A. D. A., BONINI-DOMINGOS, C. R., VALENCIA, S. H., DE SOUZA NEIRAS, W. C., MACHADO, R. L. D. Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 10, p. 1042-1044, 2007 (a).

CAVASINI, C. E.; DE MATTOS, L. C.; COUTO, Á. A.; COUTO, V. S.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L. J.; MACHADO, R. L. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malaria journal**, v. 6, n. 1, p. 167, 2007 (b)

CERAVOLO, I. P.; BRUNA-ROMERO, O.; BRAGA, E. M.; FONTES, C. J.; BRITO, C. F.; SOUZA, J. M.; CARVALHO, L. H. CERAVOLO, Isabela P. et al. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 6, p. 675-681, 2005.

CHITTORIA, A., MOHANTY, S., JAISWAL, Y. K., & DAS, A. Natural selection mediated association of the Duffy (FY) gene polymorphisms with Plasmodium vivax malaria in India. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45219, 2012.

COLE-TOBIAN, J. ; KING, C.L. Diversity and natural selection in Plasmodium vivax Duffy binding protein gene . **Molecular and biochemical parasitology**, v. 127, n. 2, p. 121-132, 2003.

CORRAN, P.; COLEMAN, P.; RILEY, E.; DRAKELEY, C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity?. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 12, p. 575-582, 2007.

COWMAN, A.L.; CRAAB, B.S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**.124: 755-766, 2006.

CUNHA, M.G., RODRIGUES, M.M., SOARES, I.S. Comparasion of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, 20: 385 - 396, 2001.

CUNHA, M. G .; SILVA, E. S.; SEPÚLVEDA, N .; COSTA, S. P.; SABOIA, T. C.; GUERREIRO, J. F .; DRAKELEY, C. J. Serologically defined variations in malaria endemicity in Pará state, Brazil. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e113357, 2014.

DEL PORTILLO, H. A.; LONGACRE, S .; KHOURI, E.; DAVID, P. H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of Plasmodium vivax reveals sequences conserved between different Plasmodium species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 9, p. 4030-4034, 1991.

DLUZEWSKI, A. R.; LING, I. T.; HOPKINS, J. M.; GRAINGER, M. ; MARGOS, G.; MITCHELL, G. H.; BANNISTER, L. H. (Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1 19). **PLoS One**, 3(8), e3085, 2008.

DOOLAN,D.L.;DOBAÑO, C.;BAIRD, J.K.Acquired immunity to malaria.**Clinical Microbiology Reviews** .22: 13-26,2009

ESCALANTE,A. A.; FREELAND, D.E.;COLLINS ,W.E.;LAL, A.A. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 95:8124-8129,1998.

GALINSKI, M.R., MEDINA, C.C., Ingravallo, P., Barnwell, J.W., A reticulocyte-bindingproteincomplexof*Plasmodiumvivax*merozoites.**Cell** 69, 1213–1226, 1992.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitology today**, v. 12, n. 1, p. 20-29, 1996.

GAZZINELI, R.T.;KALANTARI, P.;FITZGERALD, K.A.;GOLEBOCK, D.T. Innate sensing of malaria parasites. **Nature**,14: 744-756,2014

GAUR, D.;MAYER, D.C.G.;MILLER, L;H. Parasite ligant-host receptor interations during invasion of erythrocytes by *Plasmodium*merozoites. **International journal for parasitology**. 34: 13-14, 1413-29,2004.

GREENWOOD, B.M., FIDOCK, D.A., KYLE, D.E., KAPPE, S.H.I., ALONSO, P.L., COLLINS, F.H., DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation** 118: 1266-1276, 2008.

GOOD,M.F.Vaccine induce immunity to malaria parasites an the need for novel strategies.**Trends of Parasitology** .21:29-34, 2005.

GRIMBERG, B. T.; UDOMSANGPETCH, R.; XAINLI, J.; MCHENRY, A., PANICHAKUL, T.; SATTABONGKOT, J.; ZIMMERMAN, P. A. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS Med**, v. 4, n. 12, p. e337, 2007.

GUERRA, C.A.;SNOW,R.W.;HAY,S.I.Mapping the global extend of malaria in 2005.**Trends Parasitology**.22:353-358,2006.

HAFALLA, J. C. ; SILVIE, O.; & MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 297-316, 2011.

HODDER, A.N., DREW, D.R., EPA, V.C., DELORENZI, M., BOURGON, R., MILLER,S.K., MORITZ, R.L., FRECKLINGTON, D.F., SIMPSON, R.J., SPEED, T.P., ET AL. Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of Plasmodium falciparum SERA5. **Journal of Biological Chemistry** 278, 48169–48177, 2003.

HORUK, R.;CHITNIS, C. E.; DARBONNE, W. C.; COLBY, T. J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T. J.; MILLER, L. H. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. **Science**,261(5125), 1182-1184, 1993.

HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; PIEL, F. B.; NYANGIRI, O. A.; KABARIA, C. W.; GETHING, P. W.; MÉNARD, D. The global distribution of the Duffy blood group. **Nature communications**, v. 2, p. 266, 2011

IKIN, E.W.; MOURANT A.E.;PETTENKOFFER H.J.; BLUMENTHAL G. Discovery of the excepted haemagglutinin anti-Fyb. **Nature**,168:1.077,1951.

IWAMOTO, S., OMI, T., KAJII, E., IKEMOTO, S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. **Blood**, v. 85, n. 3, p. 622-626, 1995.

KEELEY, A.; SOLDATI, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. Trends. **Cell Biol.** 14, 528–532, 2004.

KEMPIŃSKA-PODHORODECKA, A.; KNAP, O.; DROZD, A.; KACZMARCZYK, M.; PARAFINIUK, M.; PARCZEWSKI, M.; CIECHANOWICZ, A. Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the Fourth Cataract of the Nile. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2012.

KING, C. L.; MICHON, P.; SHAKRI, A. R .; MARCOTTY, A.;STANISIC, D.;ZIMMERMAN, P. A.;CHITNIS, C. E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8363-8368, 2008.

LIM, C. S., KIM, S.H., KWON, S.I., SONG, J.W., SONG, K.NLJ. Analysis of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 62:261 - 265, 2000.

MAESTRE, A., MUSKUS, C., DUQUE, V., AGUDELO, O., LIU, P., TAKAGI, A., CORRADIN, G. Acquired antibody responses against Plasmodium vivax infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11437, 2010.

MÉNARD, D.; BARNADAS, C.; BOUCHIER, C.; HENRY-HALLDIN, C.; GRAY, L. R.; RATSIMBASOA, A.; BERTRAND, O. Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5967-5971, 2010.

MENDIS, K.N.;SINA,B.J.;MARCHESINI, P.;CARTER,R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American journal of Medicine Hygiene**,64: 97-106, 2001.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; DVORAK, J. A.; MCGINNISS, M. H.; ROTHMAN, I. K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**,189 (4202), 561-563, 1975.

MILLER, L.H.; MASON, S.J.; CLYDE D.F.; MCGINNISS M.H, The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy- blood-group. **New England Journal of Medicine** 295:302-304, 1976.

MILLER, L. H.; AIKAWA, M.; JOHNSON, J. G.; SHIROISHI, T. S. U. G. I. Y. E. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. **The Journal of experimental medicine**,149(1), 172-184, 1979.

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 Cels. **Infection and immunity**. 72: 154-158, 2004

MUELLER,I.;GALINSKI,M.R.;BAIRD,J.K.;CARLTON,J.M.;KOCHAR,D.K.;ALONSO,P. L.;DEL PORTILLO,H.A .Key gaps in theknowledgeof*Plasmodiumvivax* , a neglectedhumam malária parasite. **The Lancet infectius diseases**. 9:555-566,2009.

NINA, J.C. **Prevalência de Portadores Assintomáticos de *Plasmodiumvivax* e Avaliação da Resposta imune Humoral em Indivíduos que Residem em Área Endêmica de Transmissão Estável de Malária**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes infecciosos e parasitários), 108p., Belém, Pará Universidade Federal do Pará, 2004.

OLIVEIRA-FILHO,A.B.E.;MARTINELLI,J.M. Notified cases of malária in the State of Pará, Braziliam Amazon, from 1998 to 2006. **Epidemiology Service Saúde**. 9:115, 2010

OLSSON, M. L., HANSSON, C., AVENT, N. D., AKESSON, I. E., GREEN, C. A., DANIELS, G. L. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. **Transfusion**, v. 38, n. 2, p. 168-173, 1998.

PEIPER, S. C.; WANG, Z. X.; NEOTE, K.; MARTIN, A. W.; SHOWELL, H. J.; CONKLYN, M. J.;HORUK, R. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is

expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 4, p. 1311-1317, 1995.

PERLMANN,P.;TROYE-BLOMBERG.M. **Malária Immunology 2ª ed.** Stockholm Karger,2002.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R., KOROS, J.; ROSENBERG, R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 4, p. 575-581, 2006.

SACHDEVA, S.; AHMAD, G.; MALHOTRA, P.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19-and 42-kiloDalton fragments expressed in *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 10, p. 5775-5782, 2004.

SANDERS, P.R., GILSON, P.E., CANTI, G.T., GREENBAUM, D.C., NEBL, T.,CARUCCI, D.J., MCCONVILLE, M.J., SCHOFIELD, L., HODDER, A.N., YATES,J.R., III, AND CRABB, B.S. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**. **280**: 40169–40176, 2005

SANGER ,R.; RACE, R.R.; JACK J. The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy (a-b-). **Br J Haematol**;1(4):370-4, 1955.

SOARES, I.S., LEVITUS, G., SOUZA, J.M., DEL PORTILLO, H.A., RODRIGUES,M.M. Acquired immune responses to the N-and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infection and Immunity**, 1606 - 1614, 1997.

SOARES, I.S., OLIVEIRA, S., SOUZA, J.M., RODRIGUES, M.M. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **ActaTropica** 72: 13 - 24, 1999.

SOUZA-NEIRAS, W. C. D.; MELO, L. M. S. D.; MACHADO, R. L. D. The genetic diversity of *Plasmodium vivax*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 245-254, 2007.

SRINIVASAN,P.;BEATTY, W.L.;DOIUF, A.;HERRERA,R.;AMBROGGIO, X.;MOCH,J.K.;TYLER,J.S.;NARUN,D.L.;PIERCE,S.K.;BOOTHROYD,J.C.;HAYNES, J.D.;MILLER,L.H.Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 108:n.32p 13275-80,2011.

STORTI-MELO, L. M., DE SOUZA-NEIRAS, W. C., CASSIANO, G. C., JOAZEIRO, A. C., FONTES, C. J., BONINI-DOMINGOS, C. R., . ROSSIT, A. R. Plasmodium vivax circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 672-678, 2009.

STURM,A.;AMINO,R.;VANDESAND,C.;REGEN,T.;RETZLAFF,S.;RENNENBERG A.;POLLOK,J.M.;MERARD,R.; HEUSSLER,V.T.Manipulation of host hepatocytes by the malária parasites for delivery into liver sinusoids. **Science**. 313: 1287-1290,2006.

SUH, K.N.;KAIN, K.C.;KEYSTONE,J.S. **Malária.C.M.A.J.** 170: 1693-1702, 2004.

TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J. P.; LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nature genetics**, v. 10, n. 2, p. 224-228, 1995.

TOURNAMILLE, C.; LE VAN KIM, C.; GANE, P.; CARTRON, J. P.; COLIN, Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. **Human genetics**, v. 95, n. 4, p. 407-410, 1995.

VALERO, L. M. S.; OGUN, S. A.; FLECK, S. L .; LING, I. T.; SCOTT-FINNIGAN, T. J.; BLACKMAN, M. J.; HOLDER, A. A. VALERO, Lilian M. Spencer et al. Passive immunization with antibodies against three distinct epitopes on Plasmodium yoeliimerozoite surface protein 1 suppresses parasitemia. **Infection and immunity**, v. 66, n. 8, p. 3925-3930, 1998.

WOLDEAREGAI, T. G., KREMSNER, P. G., KUN, J. F., MORDMÜLLER, B. Plasmodium vivax malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 328-331, 2013.

World Health Organization (WHO) **World Malaria Report**, 2012 Genebra 2012. Disponível em:http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/. Acesso em 14 de dezembro de 2015

World Health Organization(WHO) **World MalariaReport**, 2013, Genebra, 2013. Disponível em:http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/.

Acesso em 15 de dezembro de 2015.

World Health Organization (WHO) **World Malaria Report**, 2015, Genebra, 2015

Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>

Acesso em 25 de junho de 2016

ANEXO I



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Estudos Moleculares e Imunoepidemiológicos visando estratégias de controle de Malária em Municípios localizados na área de abrangência da Rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo Progresso - Estado do Pará**”, protocolo nº 3686/2005, com a participação dos pesquisadores, *Maristela Gomes da Cunha, Marta Maria Maia Melo, Fernanda Lott, Hailton Monteiro de Oliveira, Vilson da Costa Monteiro, Carlos Augusto Lima Barros, José Luiz Fernandes Vieira, Regina Guerreiro do Amaral, Greice de Lemos Cardoso, Sheyla Patrícia Teixeira, Eliane Silva e Silva, Lauro da Silva Cunha, Tarcisio André Amorim Carvalho, Tainá Guimarães Barros, José Raimundo Farias, Maria das Graças Reis e Ciria Pimentel*, sob a Coordenação do *Prof. Dr. João Farias Guerreiro*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 24/02/2006, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 24 de fevereiro de 2006


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFGA

Hospital Universitário João de Barros Barreto – Comitê de Ética em Pesquisa
Rua dos Mundurucus, 4487 – Guamá CEP. 66.073-000 Belém-Pará Fone:3201 6653 / PABX:3201 6652

ANEXO II

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

1. Título do Subprojeto: Detecção de anticorpos que reconhecem antígeno recombinante de *Plasmodium vivax* e genotipagem do sistema sanguíneo duffy

2. Instituição onde será desenvolvido o Subprojeto: Universidade Federal do Pará (UFPA)

3. Objetivo: Realizar estudos sobre a aquisição de anticorpos na malária causada por *P. vivax*.

4. Procedimentos: Serão coletados 10-15 mL de sangue venoso em tubo a vácuo. Todo o material utilizado na coleta é descartável e você não será submetido a qualquer risco.

5. Benefícios: A realização desse estudo irá contribuir para aumentar o conhecimento sobre o que ocorre no organismo de uma pessoa, quando ela foi exposta ao parasito que causa a malária.

6. Ética: Sua participação neste estudo será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa da divulgação dos resultados desta pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Também será apresentada uma carta de esclarecimento sobre o estudo e os procedimentos envolvidos, que será lida para você, e caso concorde em participar, você deve assinar para confirmar sua participação e o entendimento dessa pesquisa em malária.

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A malária é uma doença transmitida pela picada do mosquito e seus principais sintomas são calafrio, febre e suor. A finalidade desse estudo é avaliar o que ocorre no organismo de um indivíduo com malária, contribuindo para o conhecimento sobre essa doença. A realização deste estudo precisa da participação de pessoas que residem em área onde ocorre malária. Você será esclarecido sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Todo o material utilizado na coleta é descartável. Serão coletados 10-15 mL de sangue, e durante este procedimento, você não será submetido a nenhum risco. **A sua participação será sigilosa, o seu nome não será mostrado. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento.** Se desejar obter mais informações ou esclarecer qualquer dúvida, pode entrar em contato com a responsável, professora Maristela Gomes da Cunha, na Universidade Federal do Pará ou pelo telefone (91) 3201-7565.

Após a leitura e explicações, entendi, não tenho dúvidas e concordei voluntariamente em participar desse estudo.

NOME:

DATA:

RG:

ASSINATURA:

Confirmo ter explicado a natureza e objetivos deste estudo ao paciente acima,

NOME:

RG:

DATA:

ASSINATURA

ANEXO IV
FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Título do projeto:

Nº da amostra:.....Data:.....

Resultado do exame - parasitemia e espécie:

Nome:.....

Sexo: () F () M Idade:..... Local de Nascimento.....

Endereço

Quanto tempo mora neste endereço (meses)?

Quanto tempo mora na área endêmica (meses)?

Viajou nos últimos 30 dias (local)?.....

Local de provável infecção.....

Usa alguma proteção individual? () Sim () Não

Se sim, quais (1-mosquiteiro, 2-repelente, 3-quimioprofilaxia, 4-outros)?.....

Quantas malárias já teve?.....Qual (quais) espécie (s)?.....

Tempo da última malária (meses):..... Espécie (s):

Foi hospitalizado durante alguma malária?.....

Doenças tropicais:()Leishmaniose ()Doença de Chagas ()Toxoplasmose

Já fez transfusão de sangue () Sim () Não Quantas?

Está tomando medicamento?

História clínica atual (1-febre, 2-cefaléia, 3-calafrios, 4-náuseas, 5-mialgia, 6-(outros).....Início dos sintomas.....

Temperatura corporal:Tipo sanguíneo (ABO/Rh):.....

Se mulher, está grávida? () Sim () Não

Observações:

