

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Influência de polimorfismos do receptor DARC (antígeno *Duffy/receptor para quimiocinas*)
e do HLA (antígeno leucocitário humano) classe II na resposta imune humoral à *Duffy*
binding protein do *Plasmodium vivax*

por

Flávia Alessandra de Souza Quadros

Belo Horizonte,

Março/2014

Tese DDIP - CPqRR F. A. S. QUADROS 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Influência de polimorfismos do receptor DARC (antígeno *Duffy/receptor para quimiocinas*) e do HLA (antígeno leucocitário humano) classe II na resposta imune humoral à *Duffy binding protein* do *Plasmodium vivax*

por

Flávia Alessandra de Souza Quadros

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

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Co-orientação: Dra. Flora Satiko Kano

Belo Horizonte

Março/2014

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

Q1i

Quadros, Flávia Alessandra de Souza.

2014

Influência de polimorfismos do receptor DARC (antígeno Duffy /receptor para quimiocinas) e do HLA (antígeno leucocitário humano) classe II na resposta imune humoral à *Duffy binding protein* do *Plasmodium vivax* / Flávia Alessandra de Souza Quadros. – Belo Horizonte, 2014.

XVIII, 87 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 93 – 105

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

1. Malária Vivax/imunologia 2. Plasmodium vivax /parasitologia 3. Antígenos HLA/imunologia 4. Sistema do grupo sanguíneo Duffy/análise I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Kano, Flora Satiko (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Influência de polimorfismos do receptor DARC (antígeno *Duffy* /receptor para quimiocinas) e do HLA (antígeno leucocitário humano) classe II na resposta imune humoral à *Duffy binding protein* do *Plasmodium vivax*

por

Flávia Alessandra de Souza Quadros

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Profa. Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

Profa. Dra. Maria Victoria Periago

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior

Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho

Suplente: Profa. Dra. Isabela Penna Cerávolo

Tese defendida e aprovada em: 10/03/2014.

“Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, nada serei.”

I Coríntios 13:2

Dedicatória

Aos meus pais e irmã pelo amor, apoio, confiança e dedicação.

Ao meu marido Danilo pelo carinho, conforto, amor e paciência em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela coragem e serenidade para vencer os desafios e por nunca me deixar esquecer que as coisas simples são as que realmente importam na vida.

Aos meus pais pelo amor, por sempre me incentivarem, me ensinando o caminho da honestidade e persistência.

Ao meu marido Danilo pelo amor, carinho, companheirismo, amizade, apoio incondicional mesmo nos momentos mais difíceis e valorização sempre tão entusiasmada do meu trabalho, dando-me coragem para ultrapassar todas as barreiras.

A minha irmã pela amizade e incentivo que sempre me estimulou a correr atrás dos meus objetivos.

A Dra. Luzia Helena Carvalho pela orientação, dedicação e conhecimento transmitido ao longo desses nove anos de convivência.

A Dra. Flora Satiko Kano pela ajuda, apoio e disponibilidade sempre.

A Jéssica Rafaela pelo apoio diário e dedicação no desenvolvimento do projeto.

Ao Geraldo, pela boa-vontade, disposição e ajuda diária.

A Alice por todo o suporte prestado, carinho e boa-vontade sempre.

A todos os amigos do Laboratório de malária que tornaram meus dias mais felizes e cheios de alegria, pelas trocas de experiência e bom convívio diário.

As amigas Daniela Camargos Costa e Letícia Menezes Torres pelo carinho e amizade.

A Isabela Penna Cerávolo por toda a dedicação desde a minha iniciação científica sempre disposta a me ajudar e pela confiança depositada em mim.

Ao Dr. Cor Jesus Fontes pelo exemplo, ajuda e dedicação.

A Dra. Ana Maria Sell pela colaboração, dedicação e entusiasmo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo apoio estrutural e financeiro.

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

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Luzia Helena de Carvalho e Co-orientação da Dra. Flora Satiko Kano, com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Pronex Rede de Malária e Centro de Pesquisas René Rachou.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Malária	19
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>.....	20
1.2.1 <i>Plasmodium</i> e o processo de invasão dos eritrócitos.....	22
1.3 <i>Duffy Binding Protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i> (PvDBP).....	24
1.3.1 Resposta imune naturalmente adquirida à PvDBP.....	25
1.4 A influência do polimorfismo genético do hospedeiro vertebrado na resposta imune à PvDBP.....	28
1.4.1 Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor para quimiocinas (DARC).....	28
1.4.1.1 A influência do DARC na resposta imune à PvDBP.....	31
1.4.2 HLA (Antígeno Leucocitário Humano).....	32
1.4.2.1 HLA classe II e a resposta imune a antígenos de malária.....	36
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Área e população de estudo	41
4.2 Desenho experimental do estudo	42
4.3 Genotipagem do antígeno de grupo sanguíneo DARC pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real	43
4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	45

4.5 Culturas Celulares	45
4.6 Transfecção de células COS-7 e ensaio funcional	46
4.7 Genotipagem do Antígeno Leucocitário Humano (HLA)	47
4.8 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Distribuição de frequência dos genótipos DARC na população estudada	50
5.2 Resposta de anticorpos anti-PvDBP em função da sazonalidade dos episódios de malária	51
5.3 Associação da resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados no ELISA com o genótipo do receptor DARC	53
5.4 Influência do genótipo de DARC na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}	55
5.4.1 Variantes da PvDBP utilizadas nos ensaios funcionais	55
5.4.2 Influência da expressão de DARC dos eritrócitos na interação PvDBP-DARC <i>in vitro</i>	57
5.4.3 Influência do genótipo de DARC na resposta de anticorpos inibitórios	58
5.4.4 Ensaio funcional utilizando eritrócitos e plasmas homólogos	61
5.5 Distribuição de frequência dos alelos do Sistema HLA classe II na população estudada	63
5.6 Influência dos alelos de HLA classe II na resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados no ELISA	64
5.7 Influência dos alelos do HLA classe II na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}	68
6 DISCUSSÃO	70
6.1 Distribuição dos genótipos de DARC na população de estudo	70
6.2 Avaliação longitudinal da resposta de anticorpos anti-PvDBP (ELISA) na população de Rio Pardo	71
6.3 Genótipos de DARC e a resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados pelo ELISA	72
6.4 O genótipo de DARC e a resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP	73
6.5 Distribuição dos alelos de HLA classe II na população de estudo	74

6.6 Alelos de HLA classe II que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP no ELISA.....	75
6.7 Alelos de HLA classe II que influenciam na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} nos ensaios funcionais.....	77
7 CONCLUSÕES	79
8 ANEXOS.....	80
8.1 Anexo 1 - Alelos de HLA classe II mais frequentemente associados à resposta de anticorpos anti-PvDBP.....	80
8.3 Anexo 2 – Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-<i>Duffy binding protein</i> II (DBP_{II}) immunity.....	81
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de casos de malária confirmados nos municípios brasileiros.....	19
Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor <i>Anopheles</i>	22
Figura 3: Representação esquemática do processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto.....	23
Figura 4: Representação esquemática da PvDBP.....	25
Figura 5: Representação esquemática do gene <i>FY</i> que codifica o receptor DARC.....	30
Figura 6: Frequência global dos alelos de DARC.....	31
Figura 7: Desenho esquemático da localização e organização do complexo HLA.....	33
Figura 8: Polimorfismo gênico do sistema HLA.....	35
Figura 9: Mapa representando o estado do Amazonas e a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo.....	41
Figura 10: Ensaio funcional ilustrando as células COS-7 expressando a PvDBP _{II}	47
Figura 11: Distribuição dos genótipos e alelos de DARC na população de Rio Pardo/AM.....	50
Figura 12: Distribuição temporal dos episódios de malária causados por <i>P. vivax</i> , e resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP pelo ELISA.....	52
Figura 13: Resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP _{II} , detectados pelo ELISA, em função do número de alelos positivos de DARC.....	54
Figura 14: Resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP _{II-iv} detectados pelo ELISA, em função do número de alelos positivos de DARC.....	55
Figura 15: Resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP _{II} em ensaios funcionais utilizados duas variantes (Acre-1 e Sal-1) encontradas no Brasil.....	56
Figura 16: Células COS-7 transfectadas com plasmídeo que contém o gene que codifica a proteína PvDBP _{II} incubadas com eritrócitos de indivíduos carreadores de diferentes genótipos de DARC.....	57
Figura 17: Resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP _{II} em função do número de alelos funcionais de DARC.....	59
Figura 18: Os Alelos <i>FY*A</i> e <i>FY*B</i> em homozigose estão associados a baixas frequências de anticorpos funcionais anti-PvDBP _{II}	60
Figura 19: Representação esquemática dos sistemas homólogo e heterólogo utilizados nos ensaios funcionais.....	61

Figura 20: Frequência de resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP _{II} em sistema homólogos e heterólogos.....	62
Figura 21: Frequência alélica de HLA classe II na população de Rio Pardo.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas, epidemiológicas dos 620 indivíduos acompanhados no estudo, Rio Pardo/AM.	43
Tabela 2: Sequência dos iniciadores utilizados para a reação da genotipagem de DARC por PCR em tempo real.....	44
Tabela 3: Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} no ELISA.....	64
Tabela 4. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} e anti-PvDBP _{II-IV} no ELISA.....	65
Tabela 5. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} no ELISA.....	65
Tabela 6. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} e anti-PvDBP _{II-IV} no ELISA.....	66
Tabela 7. Alelos de HLA de classe II que influenciam na aquisição ou não da resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} no ELISA	67
Tabela 8. Alelos de HLA de classe II que influenciam na aquisição ou não da resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II-IV} no ELISA.....	67
Tabela 9. Alelos de HLA de classe II que influenciam na aquisição ou não da resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} e anti-PvDBP _{II-IV} no ELISA.....	68
Tabela 10. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP _{II} comparando os grupos NR, TR e PR.....	69
Tabela 11. Alelos que influenciam longitudinalmente na aquisição da resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP _{II}	69

LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

- Acre-1** - Variante de DBP_{II} de *P. vivax* isolado no Acre
- AMA-1** - Antígeno 1 de membrana apical (*Apical membrane antigen 1*)
- BSG** - Receptor denominado Basigina (essencial para a invasão de todas as cepas de *P. falciparum*).
- CSP** - Proteína de superfície do circunsporozoita (*Circumsporozoite protein*)
- CPqRR** - Centro de Pesquisa René Rachou
- DARC** - Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC; receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for chemokines*).
- DBL** - Domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding like domain*)
- DBL-EBP's** - Família de proteínas que se ligam aos eritrócitos e apresentam um domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding like domain Erythrocyte binding protein*)
- DBP** - Proteína de ligação ao eritrócito (*Duffy binding protein*)
- DBPII** - Região II da *Duffy binding protein* de *P. vivax*.
- DMEM** - Meio essencial mínimo de *Eagle* modificado por *Dulbeccos'* (*Dulbeccos' Modified Eagle Medium*)
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DO** - Densidade ótica
- EBA-175** - Proteína de ligação aos eritrócitos de 175kDa de *P. falciparum* (*Erythrocyte binding antigen 175*)
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ELISA** - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FY** – Locus do antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC)
- FY*A, FY*B** – Alelos DARC que codificam os antígenos Fya e Fyb, respectivamente
- FY*A^{ES}, FY*B^{ES}** – Alelos DARC silenciados na linhagem eritróide
- GST** - glutationa *S*-transferase de *Schistosoma japonicum*
- HLA** - Antígeno Leucocitário Humano
- IC** – Intervalo de confiança
- IgG** - Imunoglobulina da classe G
- IR** - Índice de reatividade
- kDa** - Kilodalton
- μL** – Microlitro
- mM** - Milimolar
- MSP-1** – Proteína 1 de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein 1*)
- MSP-3 alfa** – Proteína 3 de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein 3*)

MSP-9 – Proteína 9 de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein 9*)

nm - Nanômetro

NR – Não respondedor

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

OR – Odds ratio (razão de chance)

PBS - Salina tamponada com fosfato (*Phosphate-buffered saline*)

PBS-T - Salina tamponada com fosfato acrescentada de 0,05% de Tween 20

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR-SSO - Reação em Cadeia da Polimerase - Sequência específica de oligonucleotídeos (*poyimerase chain reaction - specific sequence of oligonucleotides*)

PfRh5 – Proteína presente na superfície dos merozoítos que se liga à Basigina (*reticulocyte-binding protein homologue 5*)

PNG - Papua Nova Guiné, Oceania

PR – Persistentemente respondedor

PvDBP - *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* - proteína do *P. vivax* de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC.

r - coeficiente de correlação de *Pearson*

RAP1- Proteína associada à roptria 1 (*Rhoptry-Associated Protein 1*)

RAP2- Proteína associada à roptria 2 (*Rhoptry-Associated Protein 2*)

RON - Proteína localizada nas roptrias do merozoíto fundamental para a invasão do eritrócito (*Roptry Necked*)

Sal-1 - Variante de DBP_{II} de *P. vivax* de um clone de referência de laboratório isolado em El Salvador (Fang *et al.*, 1991)

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

SPECT2 - Proteína presente nos micronemas dos esporozoítos (*sporozoite protein essential for cell traversal*).

TR – Temporariamente respondedor

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

UI - Unidade Internacional

VK247 - Variante de proteína de superfície do circumsporozoita de *P.vivax*

VK210 - Variante de proteína de superfície do circumsporozoita de *P.vivax*

X² - teste estatístico qui-quadrado

Resumo

A *Duffy binding protein* do *Plasmodium vivax* (PvDBP) é uma proteína essencial para o processo de invasão do *Plasmodium vivax* em eritrócitos humanos *Duffy/DARC* positivos, sendo conseqüentemente uma forte candidata à vacina antimalárica. Apesar disso, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a maioria dos indivíduos expostos à malária na Amazônia brasileira não desenvolvem anticorpos anti-PvDBP. Isto pode estar relacionado tanto a características do parasito quanto do hospedeiro vertebrado. Entre as características do parasito estão a baixa imunogenicidade da PvDBP ao sistema imune e o alto polimorfismo na região do ligante (região II). Entretanto, estas características do parasito não explicam o fato de que a maioria dos indivíduos expostos a diferentes variantes do parasito, por um longo período de tempo, não desenvolvem anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor. Diante disso, faz-se necessário avaliar características do hospedeiro vertebrado que poderiam influenciar nessa baixa resposta de anticorpos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de polimorfismos do receptor DARC e do HLA classe II (antígeno leucocitário humano) na resposta imune anti-PvDBP. O estudo foi do tipo coorte aberta de base populacional realizado em área de assentamento agrícola da Amazônia brasileira onde os indivíduos foram acompanhados por cerca de 12 meses. A abordagem metodológica envolveu: (i) genotipar o receptor *Duffy/DARC* (*Real time PCR*) e o HLA de classe II (*locis* HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1, por PCR-SSO) na população estudada (n=620); (ii) realizar ensaios sorológicos, convencionais (ELISA) e funcionais (bloqueio da interação DBP_{II}-DARC) no plasma dos indivíduos estudados. Os resultados mostram que, na área estudada, o genótipo de DARC mais frequente foi FY*A/FY*B, o que foi consistente com o que tem sido descrito para as populações residentes na Amazônia brasileira. Em relação à resposta de anticorpos, nenhuma associação significativa foi encontrada entre os genótipos de DARC e as respostas de anticorpos IgG no ELISA (região II ou regiões II-IV da PVDBP). Contudo, a resposta de anticorpos que inibem a interação ligante (DBP_{II}) - receptor (DARC) foi significativamente mais frequente em indivíduos heterozigotos carreadores de um alelo DARC positivo (genótipos FY*A/FY*B^{ES} e FY*B/FY*B^{ES}). Em geral, a distribuição de frequência dos alelos de HLA classe II na população estudada corrobora com as frequências já descritas em estudos anteriores realizados no Brasil e na América Latina. De interesse, o estudo permitiu identificar 11 alelos de HLA classe II associados positivamente com a resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados no ELISA, com destaque para os alelos DQA1*01:03 e HLA-DRB1*02:02. Por outro lado, o estudo permitiu identificar 4 alelos associados negativamente com a resposta de anticorpos. Além disso, quatro alelos - HLA-DQA1*02:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DQB1*02:02 e HLA-DQA1*02:01 - parecem influenciar positivamente na resposta de anticorpos inibitórios da interação DBP_{II}-DARC, enquanto que o alelo HLA-DRB1*16:02 influenciou negativamente nesta resposta. Estes achados são de grande importância, pois, em áreas hiperendêmicas de malária, a resposta de anticorpos inibitórios tem sido associada com proteção clínica. Em conjunto, os resultados do presente estudo permitiram demonstrar, pela primeira vez, que polimorfismos do receptor DARC e do HLA classe II podem influenciar na resposta imune protetora contra a PvDBP.

Abstract

The *Duffy binding protein* of *Plasmodium vivax* (PvDBP) is a critical adhesion ligand that participates in merozoite invasion of human Duffy/DARC positive erythrocytes, being considered, therefore, a target for vaccine-mediated immunity. Although anti-PvDBP immune responses have been well characterized, few studies have investigated the influence of host variability on the development of this immune response. In the present study, we examined whether host genetic polymorphisms might affect humoral immunity against PvDBP. More specifically, we investigated polymorphisms on the DARC receptor and in the human leucocyte antigen (HLA) class II. For that, we carried out a 12-months follow-up study in an agricultural settlement of the Brazilian Amazon region (n=620 volunteers). The methodological approach included (i) to genotype the DARC receptor (Real-time PCR), and the HLA class II (loci HLA-DRB1, HLA-DQB1 and HLA-DQA1 by PCR-SSO); (ii) to analyze the plasma levels of PvDBP antibodies through conventional serology (ELISA-detected IgG antibodies) and inhibitory binding assays (PvDBP binding inhibitory antibodies, BIAs). The results showed no association between DARC polymorphisms and ELISA-detected antibodies. However, the follow-up study demonstrated that BIAs targeting PvDBP towards to be more frequent in heterozygous carrying a DARC-silent allele (genotypes FY^*A/FY^*B^{ES} and FY^*B/FY^*B^{ES}), suggesting a gene-dosage effect. Regarding the HLA class II polymorphisms, we identified 11 alleles positively associated with the response of PvDBP ELISA-detected antibodies. In addition, the study revealed four alleles negatively associated with the antibody response (HLA-DRB1*10:01, HLA-DRB*14:02, DRB1*14:02 e DQA1*05:01 citar os 4 aqui). Of relevance, four alleles (HLA-DQA1*02:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DQB1*02:02 and HLA-DQA1*02:01) were positively associated with the PvDBP BIA, whereas a single allele (HLA-DRB1*16:02) was negatively associated with this protective response. Together, the results of the present study demonstrate, for the first time, that polymorphisms on the DARC receptor and in the HLA class II may influence the protective immune response against PvDBP.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma das principais doenças parasitárias da atualidade, causando anualmente cerca de 200 milhões de casos e quase um milhão de mortes. Esta doença está presente em cerca de 100 países, dentre os quais a maioria se localiza em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais propiciam o desenvolvimento do parasito em mosquitos do gênero *Anopheles* (WHO, 2012).

Nas Américas 60% dos casos notificados de malária foram no Brasil, os outros 40% estão distribuídos entre os outros países da América do Sul e Central (Guerra *et al.*, 2010). No Brasil, embora tenha ocorrido uma queda de número de casos nos últimos anos, o quadro epidemiológico dessa doença ainda é preocupante. Cerca de 270 mil casos anuais de malária tm sido registrados, dos quais 99,8% se concentram na região da Amazônia Legal. Estima-se que 49 milhões de pessoas estão em áreas de risco no país (WHO, 2012). A **Figura 1** mostra a distribuição de casos de malária em municípios brasileiros no ano de 2011, de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

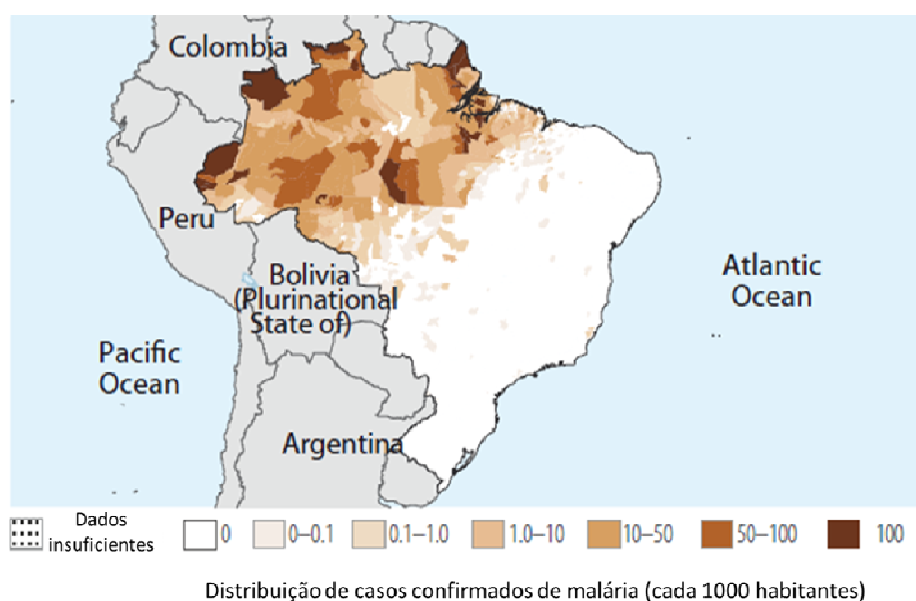


Figura 1- Distribuição de casos de malária confirmados nos municípios brasileiros. Os dados demonstrados são do ano de 2011 e os municípios foram estratificados de acordo com a intensidade de transmissão de malária. Fonte: Modificado de World Malaria Report, 2012.

Cinco espécies de *Plasmodium* são importantes causadoras de malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, e mais recentemente, *P. knowlesi*, previamente descrita como parasito de primatas não humanos (White, 2008; Oon *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Entre estas espécies, o

P. vivax tem a maior distribuição geográfica mundial sendo a espécie mais prevalente fora do continente africano (Guerra *et al.*, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2012), 87% dos casos registrados em 2011 no Brasil foram causados por *P. vivax*.

Embora a malária causada por *P. vivax* seja considerada uma doença benigna e raramente fatal, os estudos mais recentes têm reportado a existência de casos de malária grave na Papua Nova Guiné, Indonésia, Índia e Brasil (Genton *et al.*, 2008; Tjitra *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010; Alexandre *et al.*, 2010). Na região amazônica, foram oficialmente reportadas 234 mortes, no período de 1998 a 2008, causadas por *P. vivax* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Estudos recentes em Manaus demonstraram um aumento no número de casos de hospitalização em decorrência de malária *vivax* associados principalmente, a anemia grave, trombocitopenia, síndrome neurológica, insuficiência renal e icterícia (revisto por Lacerda *et al.*, 2012). Neste sentido, a malária *vivax* representa um grave problema de saúde pública, com elevado custo para o Sistema de Saúde, além de ser um entrave para o desenvolvimento econômico local, uma vez que o paciente debilitado se torna incapaz de exercer seu trabalho em sua plenitude.

Em função disso, torna-se fundamental o estudo da malária *vivax*, principalmente nos aspectos relacionados aos mecanismos de invasão celular e escape da resposta imune.

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium*

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana (**Figura 2**) pode ser dividido em duas fases: uma fase assexuada ou esquizogônica, que ocorre no hospedeiro vertebrado e outra sexuada ou esporogônica, que ocorre em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*. A fase assexuada ou esquizogônica se inicia durante o repasto sanguíneo das fêmeas de anofelinos, onde as formas infectantes (esporozoítos) são inoculadas na pele do hospedeiro, podendo permanecer neste local por várias horas antes de encontrar um vaso sanguíneo (Amino *et al.*, 2006; Prudêncio *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007; Doolan *et al.*, 2009). Recentemente, alguns autores descreveram uma nova rota de migração dos esporozoítos, em que os mesmos, após atravessarem o epitélio do hospedeiro vertebrado, cerca de 30% atingem o sistema linfático (Doolan *et al.*, 2009). Porém, os parasitos não parecem atingir o fígado por esta via. Entretanto, sugere-se que esta rota possa ser importante para estimular o sistema imunológico do hospedeiro (Amino *et al.*, 2006). Uma vez dentro do sistema circulatório, os esporozoítos atingem o fígado, onde infectam os hepatócitos.

O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e depende de várias interações do tipo ligante-receptor. Os esporozoítos possuem a capacidade de migrar através de vários hepatócitos, até se desenvolver dentro de um hepatócito específico, onde ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo bem delimitado (Mota *et al.*, 2001; Frevert *et al.*, 2005). A travessia dos esporozoítos dos capilares sinusóides até o fígado

pode ocorrer através das células de *Kupffer* e células do endotélio dos vasos sanguíneos. Recentemente, foi descrita que uma proteína presente nos micronemas dos esporozoítos (SPECT2) parece ser essencial para essa travessia (Tavares *et al.*, 2013). Esta proteína parece ser importante também para a sobrevivência dos esporozoítos dentro dos sinusóides hepáticos. Neste mesmo estudo, realizado *in vivo* utilizando camundongos, foi demonstrado que a ausência desta proteína fez com que cerca de 90% dos esporozoítos injetados fossem rapidamente fagocitados pelas células de *Kupffer* (Tavares *et al.*, 2013). Diante disso, esta proteína SPECT2 parece servir como um mecanismo de evasão do sistema imune, evitando a atividade fagocitária (revisto por Ménard *et al.*, 2013).

Uma vez dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* algumas populações de parasitos se desenvolvem rapidamente nos hepatócitos, enquanto outras, as responsáveis pelos casos de recaídas (hipnozoítos), permanecem em estado de latência no fígado, meses ou até anos após a infecção inicial. Isto possibilita que a pessoa infectada volte a desenvolver a doença após o tratamento, mesmo na ausência de re-infecção, devido à reativação dos hipnozoítos (Krotoski *et al.*, 1982).

Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam e multiplicam assexuadamente dando origem aos merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea através de vesículas denominadas merossomas (Sturm *et al.*, 2006). Os merozoítos teciduais invadem as hemácias iniciando, assim, a fase eritrocítica, que é responsável pelas manifestações clínicas da malária. Para que o merozoíto invada o eritrócito é necessário que haja também o reconhecimento inicial de receptores específicos (**item 1.2.1**). Após algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos se diferenciam em estágios sexuais, conhecidos como gametócitos femininos e masculinos. A fase sexuada ou esporogônica inicia-se quando os gametócitos são ingeridos durante o repasto sanguíneo por fêmeas do *Anopheles*, dando continuidade ao ciclo do parasito com a formação dos gametas (Revisto por Vlachou *et al.*, 2006). A fusão dos gametas no interior do intestino do mosquito origina um zigoto móvel, chamado oocineto. Após atravessar a parede intestinal do mosquito, aloja-se na membrana basal, onde se desenvolve em oocisto. No interior do oocisto ocorrem diferenciações e divisões nucleares que objetivam a produção dos esporozoítos (Revisto por Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009). Parte desses esporozoítos produzidos migra para a glândula salivar do mosquito, que durante um novo repasto sanguíneo, reiniciará o ciclo dentro do hospedeiro vertebrado (Barillas-Mury & Kumar, 2005).

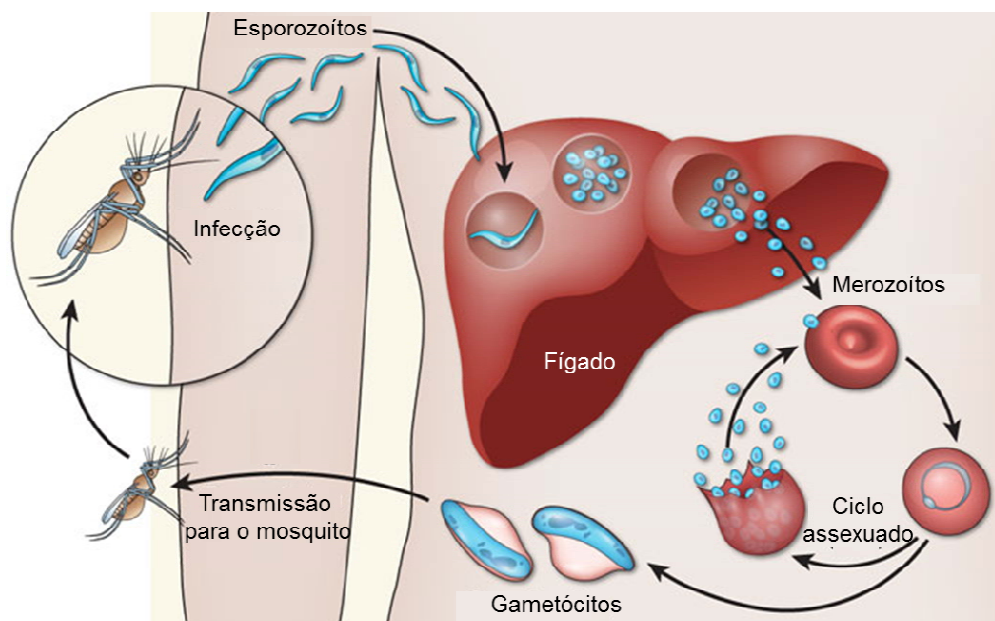


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Fonte: Modificado de Michalakis & Renaud, 2009.

1.2.1 *Plasmodium* e o processo de invasão dos eritrócitos

O processo de invasão dos eritrócitos é complexo e depende de várias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (Gaur et al., 2004). Esse estágio eritrocitário é o responsável pelas manifestações clínicas da malária.

Resumidamente, podemos dividir este processo em quatro fases (Oh & Chishti, 2005; Cowman & Crabb, 2006): (1) reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à superfície eritrocitária; (2) reorientação do parasito para que o seu complexo apical entre em contato com a membrana eritrocítica, formando uma junção irreversível entre as membranas do parasito e do eritrócito; (3) deslocamento da junção em direção ao polo posterior do parasito com a liberação do conteúdo das organelas apicais, principalmente das roptrias e dos micronemas; (4) entrada do parasito no interior do eritrócito através da formação do vacúolo parasitóforo, no interior do qual o merozoíto se desenvolve (**Figura 3**). Apesar do evento inicial que envolve o reconhecimento e adesão do parasito seja formado por interações de baixa afinidade, os eventos seguintes envolvem interações do tipo ligante-receptor de alta afinidade, e torna o processo de invasão irreversível (Barnwell & Wertheimer, 1989; Adams *et al.*, 1990). Embora os plasmódios utilizem esse mecanismo geral de entrada na célula hospedeira, algumas espécies apresentam particularidades biológicas. O processo de invasão do *P. vivax* e *P. falciparum* tem sido melhor estudados, já que estas são as espécies mais importantes do ponto de vista da saúde pública.

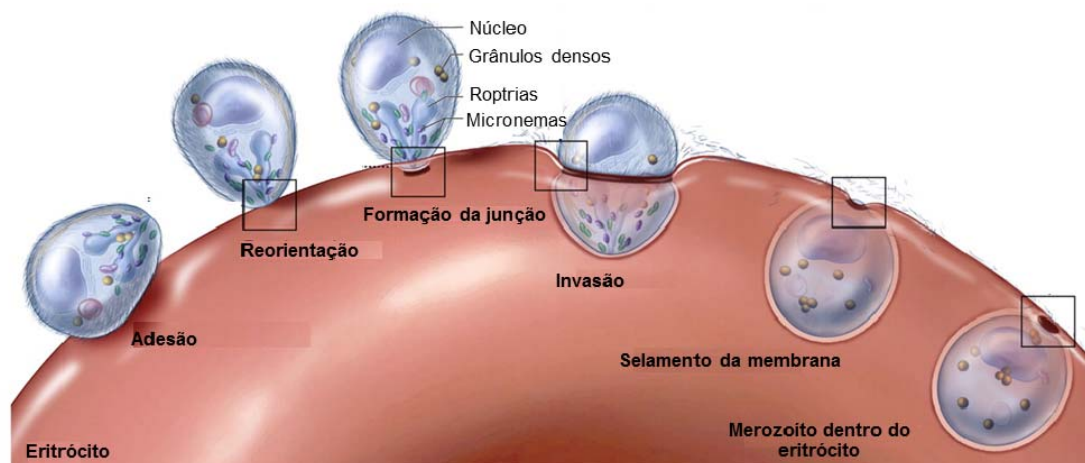


Figura 3 - Representação esquemática do processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto. Fonte: Modificado de Srinivasan *et al.*, 2011.

Numerosos estudos tem demonstrado que merozoítos de *P. falciparum* tem a habilidade de invadir os eritrócitos através de várias vias de invasão (revisto por Person *et al.*, 2010). Entretanto, foi descrito um receptor, denominado Basigina (BSG) ou CD147, que parece ser essencial para a invasão de todas as cepas de *P. falciparum* (Crosnier *et al.*, 2011). Este receptor está presente na superfície dos eritrócitos e se liga a uma proteína do parasito chamada PfRh5 (*Reticulocyte-binding protein homologue 5*) presente na superfície dos merozoítos pertencente à família PfrH (*Reticulocyte binding Homolog*).

Para que ocorra a invasão do *P. vivax* no eritrócito é necessária a interação da proteína *Duffy binding protein* (PvDBP) e seu receptor presente na superfície dos eritrócitos, o antígeno de grupo sanguíneo *Duffy*, que é também um receptor para quimiocinas (DARC, *Duffy Antigen Receptor for chemokines*) (Fang *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992; Horuk *et al.*, 1993). Dessa forma, indivíduos que não expressam o receptor DARC em seus eritrócitos são altamente refratários à infecção pelo *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976; Mendis *et al.*, 2001). Entretanto, evidências recentes demonstraram que indivíduos DARC negativos, particularmente de algumas regiões específicas como Madagascar, podem se infectar com esse parasito (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2007; Ménard *et al.*, 2010), o que sugere a existência de uma via de invasão alternativa.

O *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos, que compreendem uma minoria (1%) da população de eritrócitos circulantes (Galinski *et al.*, 1992; Barnwell & Galinski, 1998). Isto significa que os merozoítos de *P. vivax* interagem com inúmeros eritrócitos maduros na circulação antes de invadirem um reticulócito. Tem sido proposto que interações prematuras entre a PvDBP e o antígeno do grupo sanguíneo DARC em eritrócitos maduros seriam prejudiciais para a sobrevivência do parasito (Barnwell *et al.*, 1989). Desta forma, acredita-se que antes da formação da junção merozoíto-reticulócito haveria uma seleção da célula hospedeira, impedindo, a interação da PvDBP com uma célula não-alvo (Galinski *et al.*, 1992; Barnwell & Galinski, 1998). Se essa hipótese estiver correta, a especificidade de invasão de *P. vivax* poderia

ser atribuída a pelo menos duas proteínas de ligação aos reticulócitos: PvRBP-1 (*reticulocyte binding protein – 1*) e PvRBP-2 (*reticulocyte binding protein – 2*) também pertencentes à família PfRH localizadas no polo apical dos merozoítos (Galinski *et al.*, 1992). Entretanto, até o momento, as funções desta família de proteínas ainda necessitam ser esclarecidas já que proteínas da família PfRH, inclusive a que se liga a basigina, também já foram encontradas em *P. falciparum* e *P. yoelli*, duas espécies de *Plasmodium* que infectam tanto reticulócitos quanto eritrócitos (Galinski *et al.*, 1992). Além dessas proteínas, trabalhos recentes apontam que também há a formação de um complexo entre a proteína *Apical Membrane Antigen1* (AMA-1 - localizada nos micronemas do merozoíto) com as proteínas *Roptry Necked 2, 4 e 5* (RONS; localizadas nas roptrias do merozoíto) na junção entre o merozoíto-eritrócito que seria fundamental para a invasão do eritrócito (revisto Srinivasan e colaboradores 2011).

Diante do exposto, o fato da PvDBP ser importante para garantir o parasitismo humano, bem como as evidências de que a maioria dos indivíduos DARC negativos sejam resistentes à infecção pelo *P. vivax*, fazem desta proteína um dos imunógenos mais promissores para o desenvolvimento de uma vacina contra a infecção causada pelo *P. vivax*.

1.3 *Duffy Binding Protein de Plasmodium vivax* (PvDBP)

A PvDBP é uma proteína de 140KDa e pertence a uma família de proteínas homólogas que se ligam a eritrócitos – *Duffy binding like domain Erythrocyte binding protein* (DBL-EBP's) (Barnwell & Wertheimer, 1989; Adams *et al.*, 1992). Estruturalmente, a PvDBP pode ser dividida em sete regiões, definidas a partir da similaridade da sua estrutura gênica e sequência de aminoácidos com as outras DBL-EBPs. As regiões que constituem a PvDBP são (**Figura 4A**): (i) uma região que contém o peptídeo sinal (região I), (ii) duas regiões ricas em cisteínas amino e carboxiterminal (região II e VI, respectivamente) – sendo conservadas em todos os membros da superfamília DBL-EBPs -, (iii) três regiões hidrofílicas (região III, IV e V), um domínio transmembrana e (iv) um curto segmento citoplasmático (região VII) (Fang *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992). O ligante funcional da PvDBP encontra-se localizado na região II da proteína e apresenta cerca de 300 aminoácidos, sendo seu sítio de ligação ao eritrócito situado em um fragmento de 170 aminoácidos que contém as cisteínas 5 a 8 (Ranjan & Chitnis, 1999; Singh *et al.* 2003). Embora a posição dos resíduos de cisteína seja conservada na região II, já foi demonstrado que outros aminoácidos são altamente polimórficos (Ampudia *et al.*, 1996).

Com a elucidação do modelo tridimensional da PvDBP_{II} (**Figura 4B**), foi possível prever a distribuição dos polimorfismos e verificar se eles se localizam próximos ao sítio de ligação de proteína ao seu receptor DARC. Além disso, foi observado que existe um alto polimorfismo localizado próximo ao sítio de ligação em isolados de *P. vivax* da Amazônia Legal brasileira (Sousa, 2009).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os polimorfismos na PvDBP_{II} apresentam alta relevância imunológica (Cerávolo *et al.*, 2008; Cerávolo *et al.*, 2009). Algumas evidências indicam que a resposta imune pode ser específica para uma variante e que os polimorfismos são capazes de alterar a imunogenicidade da PvDBP_{II} interferindo no processo de invasão celular (Cerávolo *et al.*, 2009; Souza-Silva *et al.*, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a resposta imune anti-PvDBP_{II} também pode ser influenciada pela intensa afinidade e especificidade da interação ligante-receptor (PvDBP-DARC) devido a dimerização necessária para a conclusão deste processo (Batchelor *et al.* 2011).

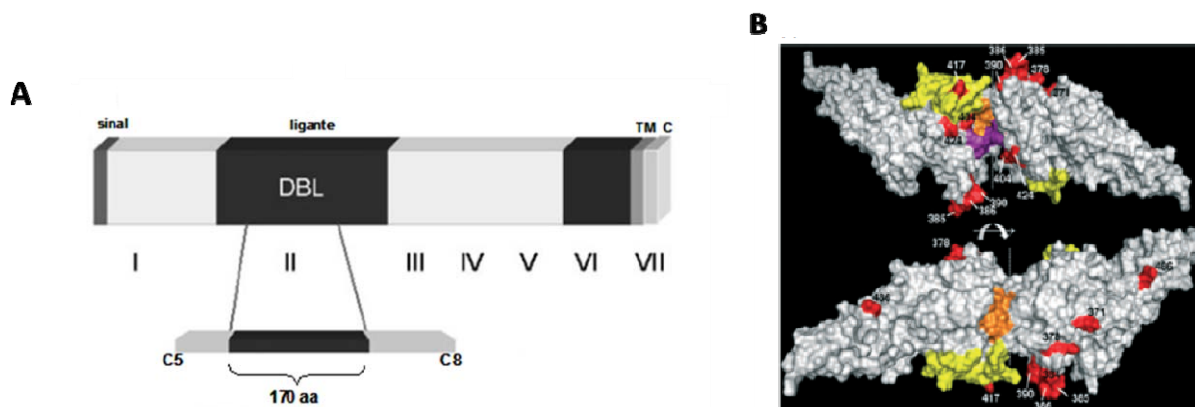


Figura 4 – Representação esquemática da PvDBP. **A)** Estruturalmente a PvDBP é dividida em seis regiões de domínios extracelulares (I a IV) e uma região (VII) de domínio citoplasmático e transmembrana (indicadas em algarismos romanos). Esta proteína é caracterizada por um domínio N-terminal rico em cisteína, o domínio de ligação DBL (região II), e um segundo domínio conservado rico em cisteína (região VI). O principal sítio de ligação para o reconhecimento do receptor (170 aa) é a porção central da PvDBP entre as cisteínas 5 (C5) e 8 (C8), sendo a porção mais polimórfica da proteína (adaptado de VanBuskirk *et al.*, 2004b). **B)** Estrutura 3D da região II da PvDBP com seus polimorfismos encontrados em amostras no Brasil: (i) resíduos que formam um suposto bolso de sulfatirósina para a ligação na interface do dímero (roxo); (ii) resíduos necessários para a interação com o antígeno DARC (amarelo); (iii) resíduos que fazem contato formando uma estrutura dimérica (laranja); (iv) resíduos polimórficos identificados em isolados de Rio Pardo (vermelho). As setas indicam a interface do dímero. Fonte: Modificado de Kano *et al.*, 2012.

1.3.1 Resposta imune naturalmente adquirida à PvDBP

A PvDBP pode ser considerada uma importante candidata à vacina antimalárica, pois é o ligante que permite o parasito invadir os reticulócitos, garantindo o parasitismo humano. O desenvolvimento de uma vacina anti-PvDBP tem por objetivo induzir uma resposta de anticorpos capazes de inibir a adesão do merozoíto nos reticulócitos DARC positivos e, conseqüentemente, impedir o processo de invasão do parasito. Infelizmente, estudos referentes à capacidade inibitória de anticorpos anti-PvDBP em populações humanas ainda são escassos (Michon *et al.* 2000; Cerávolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010; Chootong *et al.*, 2012). Isto se deve principalmente as limitações no cultivo do *P. vivax in vitro* (Ntumngia *et*

al. 2012). Consequentemente, a maioria dos estudos sobre a resposta imune a PvDBP tem avaliado a resposta de anticorpos contra antígenos recombinantes, sem avaliar a sua capacidade inibitória da interação ligante-receptor.

Devido às limitações para a realização dos ensaios funcionais, estudos utilizando a sorologia convencional (ELISA) com diferentes proteínas PvDBP recombinantes tem sido importantes para avaliar o nível de anticorpos IgG de indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas para malária.

O nosso grupo de pesquisa demonstrou através da sorologia convencional que a PvDBP é naturalmente imunogênica na região amazônica e a proporção de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG anti-PvDBP aumentou de acordo com a exposição à malária (Cerávolo *et al.*, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que a cada ano de exposição à malária aumentava em 2% a chance do indivíduo apresentar anticorpos IgG anti-PvDBP (Souza-Silva *et al.*, 2010). Neste estudo a idade não se correlacionou com a presença desses anticorpos. Em um estudo realizado em populações nativas da Amazônia brasileira (Kano *et al.*, 2012), foi demonstrado que 50% dos indivíduos adquiriram anticorpos anti-PvDBP, sendo a idade o único fator preditor de soropositividade para a PvDBP. Diante disso, podemos observar que existe uma grande variedade de padrões de transmissão de malária na Amazônia brasileira.

Até o momento, poucos estudos têm investigado resposta de anticorpos anti-PvDBP na América Latina, sendo ainda restritos a áreas endêmicas do Brasil e da Colômbia (Michon *et al.* 1998; Tran *et al.* 2005; Herrera *et al.* 2005; Cerávolo *et al.* 2005; 2008; Barbedo *et al.* 2007; Souza-Silva *et al.* 2010). Em geral, esses estudos também demonstram que a resposta de anticorpos anti-PvDBP está relacionada com a exposição a *P. vivax*.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a PvDBP é relativamente pouco imunogênica. Na região do litoral do Pacífico colombiano, uma área de transmissão instável de malária e composta principalmente por indivíduos afro-descendentes, menos de 40% do total de indivíduos apresentaram anticorpos anti-PvDBP (Michon *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2005; Maestre *et al.*, 2010). Nestes estudos, o perfil de resposta de anticorpos mostrou-se muito diferente daquele descrito em áreas alta transmissão de malária, como a Papua Nova Guiné (PNG), onde a resposta de anticorpos anti-PvDBP parece ser muito mais comum (60-80%).

Poucos estudos tem sido conduzidos para avaliar a resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP, e a maioria deles têm sido realizados em áreas de alta transmissão de malária (Michon *et al.*, 2000; King *et al.*, 2008), o que não representa o perfil de muitas regiões endêmicas. Diante disso, mais recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP em áreas de transmissão instável para a malária na Amazônia brasileira. Nestes estudos observou-se que a presença de anticorpos inibitórios anti-PvDBP está relacionada a uma exposição à longo prazo ao parasito, e além disso, apenas um terço dos indivíduos desenvolvem estes anticorpos (Cerávolo *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010).

Uma baixa frequência de resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP também foi descrita em áreas de alta transmissão de malária, como na Papua Nova Guiné (King *et al.*, 2008), apesar das diferenças epidemiológicas e genéticas (do parasito e do hospedeiro). Neste estudo menos de 10% das crianças adquiriram altos níveis de anticorpos inibitórios anti-PvDBP. Interessantemente, foi observado que tanto em áreas de transmissão instável quanto em áreas hiperendêmicas de malária a resposta de anticorpos inibitórios se mantém estável ao longo do tempo (King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010). Diante disso, observa-se que apesar de a maioria dos indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax* não desenvolvem anticorpos inibitórios anti-PvDBP, uma vez adquiridos, tendem a ser manter estáveis ao longo do tempo.

Embora os mecanismos pelos quais a PvDBP induz uma baixa resposta de anticorpos ainda sejam desconhecidos, é possível especular fatores que poderiam influenciar nesta resposta. Um dos fatores que provavelmente dificulta a aquisição de uma resposta imune funcional contra a PvDBP é a baixa imunogenicidade da proteína e/ou sua limitada exposição ao sistema imune. Isto porque a PvDPB está localizada nos micronemas do merozoíto, sendo liberada somente no momento da invasão (teoria do “*Just in time*”) (Singh *et al.*, 2006). Desta forma, o *P. vivax* minimizaria a exposição direta do ligante funcional aos anticorpos inibitórios, servindo como um mecanismo de escape deste parasito ao sistema imune do hospedeiro. Entretanto, esta teoria não explica completamente o fato de que a maioria dos indivíduos expostos por um longo período à malária não são capazes de desenvolver anticorpos inibitórios.

É possível que a variabilidade genética na região do ligante (Região II) da PvDBP possa também influenciar na baixa resposta imune contra esta proteína (Vanbuskirk *et al.*, 2004a; McHenry & Adams, 2006; Sousa *et al.*, 2010). A primeira evidência de que os polimorfismos comumente observados na PvDBP_{II} podem alterar o seu caráter antigênico, interferindo assim no bloqueio da ligação PvDBP-DARC por anticorpos inibitórios, foi demonstrado por Vanbuskirk e colaboradores (2004). Os autores demonstraram que soros de coelhos experimentalmente imunizados inibiam a interação ligante-receptor de uma maneira dependente da cepa do parasito. Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que indivíduos residentes em área não-endêmica de malária - em um pequeno foco de transmissão autóctone de *P. vivax* em Minas Gerais - desenvolveram anticorpos inibitórios que são cepa-específicos (Cerávolo *et al.*, 2009). Em um estudo realizado na Tailândia - área de transmissão instável para a malária - também foi demonstrado que a resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP está relacionada à cepa do parasito (Chootong *et al.*, 2012). Um perfil de resposta semelhante foi observado em crianças assintomáticas residentes em área de alta transmissão de malária (PNG) (Cole-Tobian *et al.*, 2009).

1.4 A influência do polimorfismo genético do hospedeiro vertebrado na resposta imune à PvDBP

As características genéticas dos indivíduos podem influenciar diretamente na sua resposta imune contra os diversos patógenos. No caso da malária causada por *P. vivax*, poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar polimorfismos genéticos do hospedeiro vertebrado e sua resposta imune (Maestre *et al.*, 2010; Storti-Melo *et al.*, 2012).

Entre os genes do hospedeiro vertebrado, dois merecem particular interesse: o receptor DARC e HLA. O receptor DARC, fundamental para o processo de invasão dos merozoítos nos eritrócitos é muito polimórfico (Sousa *et al.*, 2006; Sousa, 2009). Este polimorfismo poderia contribuir para que a maioria dos indivíduos expostos ao *P. vivax* não desenvolvam anticorpos capazes de bloquear a interação PvDBP-DARC (King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010). Apesar disso, poucos estudos avaliaram a influência do receptor DARC na resposta imune à PvDBP (item 1.4.1.1.)

Outro fator que pode influenciar nesta resposta imune diferenciada entre os indivíduos é o HLA (Antígeno Leucocitário Humano). A habilidade do sistema imune em responder a um antígeno particular difere entre os indivíduos porque, entre outros fatores, eles possuem diferentes padrões de genes do Sistema HLA (item 1.4.2.1). Entretanto, estudos referentes à influência do polimorfismo do HLA na resposta de anticorpos inibitórios da interação PvDBP-DARC nunca foram realizados.

1.4.1 Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor para quimiocinas (DARC)

O receptor para a *Duffy binding protein* de *P. vivax* e *P. knowlesi* nos eritrócitos humanos é também um receptor de alta afinidade para vários membros de quimiocinas das classes CC e CXC, conhecido também como antígeno *Duffy* e receptor para quimiocinas (*Duffy antigen/receptor for chemokines*, DARC) descrito pela primeira vez por Moore e colaboradores (1982). Este receptor também possui importância clínica e biológica, pois anticorpos que reconhecem o antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* são responsáveis por muitos casos de incompatibilidade transfusional e doença hemolítica em recém-nascidos (Badakere & Bhatia, 1970; Moise, 2000). Recentemente, o receptor DARC tem sido associado à várias doenças inflamatórias, doenças infecciosas e tumorais, e com a infecção pelo vírus HIV (revisto por Smolarek *et al.*, 2010). De grande importância, um estudo recente demonstrou que o DARC é importante na infecção pelo *P. falciparum* (McMorran *et al.*, 2012). Mais especificamente, estes autores mostram que a interação do DARC com uma proteína plaquetária (Pf4 ou CXCL4) é fundamental para que as plaquetas atuem destruindo o parasito.

O receptor DARC, uma glicoproteína de 40-45kDa é expressa principalmente nos eritrócitos e nas células endoteliais de vênulas pós-capilares de vários tecidos (Chaudhuri *et al.*, 1995). O gene que codifica este receptor DARC é formado por dois exons e um intron de aproximadamente 450pb (Figura 5A). O locus

Duffy/DARC (FY) é caracterizado por três alelos principais: *FY*A*, *FY*B* e *FY*B^{ES}* (ES, *Erythroid Silent*; silenciado na linhagem eritróide) (Hadley & Peiper, 1997). Os dois alelos funcionais co-dominantes *FY*A* e *FY*B* codificam os antígenos Fya e Fyb, respectivamente, sendo os mesmos herdados de maneira mendeliana direta (Zimmerman *et al.*, 1999; Blumenfeld *et al.*, 2004; Meny, 2010). Esses alelos diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125 (G125A). No alelo *FY*A*, a base presente é guanina (G), resultando em um códon para glicina; no alelo *FY*B*, a base é adenina (A), resultando em um códon para ácido aspártico (**Figura 5B**). A completa ausência de expressão desses antígenos nos eritrócitos define o fenótipo DARC negativo Fy(a-b-) (Tournamille *et al.*, 1995a, 1995b). Esse fenótipo é caracterizado pela presença de dois alelos não funcionais *FY*B^{ES}*, cujo silenciamento gênico se deve a uma mutação na região promotora do gene *FY* (T- 67C). Essa alteração impede a ligação ao fator de transcrição à região promotora *GATA-1* mutada do gene nos eritrócitos, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos (Tournamille *et al.*, 1995a, Iwamoto *et al.*, 1995). O genótipo *FY*A^{ES}* também pode aparecer caso a mutação no promotor seja no alelo *FY*A*, porém este genótipo é extremamente raro e foi melhor caracterizado na Papua Nova Guiné (Zimmerman *et al.*, 1999).

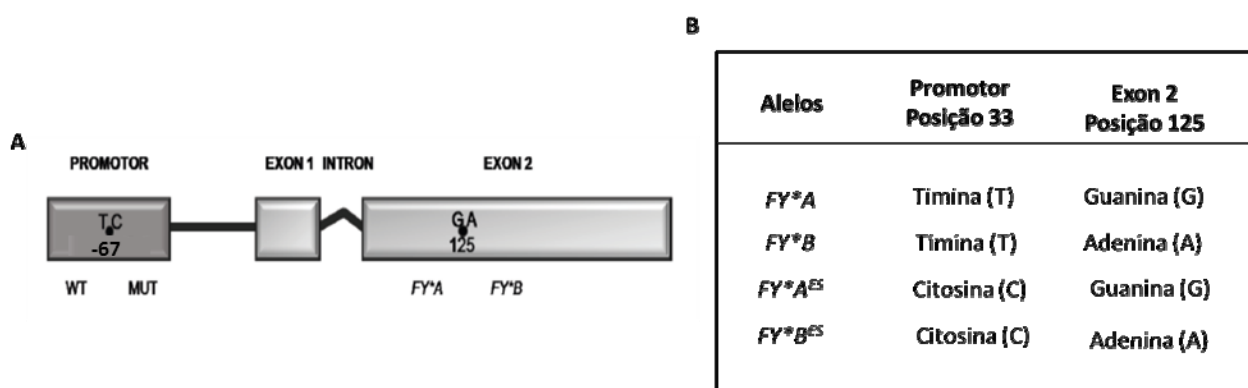


Figura 5 - Representação esquemática do gene *FY* que codifica o receptor DARC. **A**) Ilustração da região promotora, dois exons e o intron entre os exons 1 e 2. Está representado na figura: a mutação G125A, que define os alelos *FY*A* e *FY*B*, respectivamente e; a mutação T-67C, que diferencia o promotor selvagem (WT) do promotor mutado (MUT). **B**) Alelos e mutações responsáveis para a determinação dos principais genótipos de DARC. Fonte: modificado de Cavasini *et al.*, 2001.

Com relação à expressão do antígeno DARC na célula hospedeira, tem-se observado que a expressão de DARC varia entre os diferentes genótipos e com a idade dos eritrócitos, sendo maior em reticulócitos do que em eritrócitos maduros (Woolley *et al.*, 2000).

Diferentes estudos têm mostrado a influência do DARC na susceptibilidade ao *P. vivax*. De fato, estudos desenvolvidos em diferentes áreas de transmissão de malária vivax, inclusive no Brasil, têm mostrado que indivíduos com dois alelos funcionais, em homozigose ou heterozigose, parecem ser mais susceptíveis à infecção do que àqueles com um único alelo funcional (Zimmerman *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2006). Uma

evidência indireta dessa associação foi obtida por Michon e colaboradores (2001), no qual foi observado que a expressão diminuída de DARC nos eritrócitos de indivíduos com um único alelo DARC positivo resultou na redução significativa da citoaderência em ensaios *in vitro*. Em um estudo de coorte realizado no Brasil, sugere-se que os indivíduos com hemácias *FY*A* (em homozigose ou heterozigose) têm menor incidência de malária vivax do que os habitantes da mesma comunidade que apresentavam hemácias *FY*B* (King *et al.*, 2011).

Recentemente foi compilado um mapa global da distribuição dos alelos *Duffy* (Howes *et al.*, 2011). De acordo com os autores, a frequência dos alelos revelou um claro padrão geográfico (**Figura 6**). O aspecto mais marcante é a presença do alelo silencioso *FY*B^{ES}* em toda África subsaariana, enquanto que os alelos *FY*A* ou *FY*B* na mesma região tem frequência de 0 a 5%. Nas Américas existe uma maior heterogeneidade dos três alelos. Somente em algumas áreas existem predominância de alelos únicos. Além disso, o alelo *FY*B* se mostrou o menos prevalente globalmente e o alelo silencioso *FY*A^{ES}* não pôde ser retratado espacialmente devido a sua raridade (Howes *et al.*, 2011).

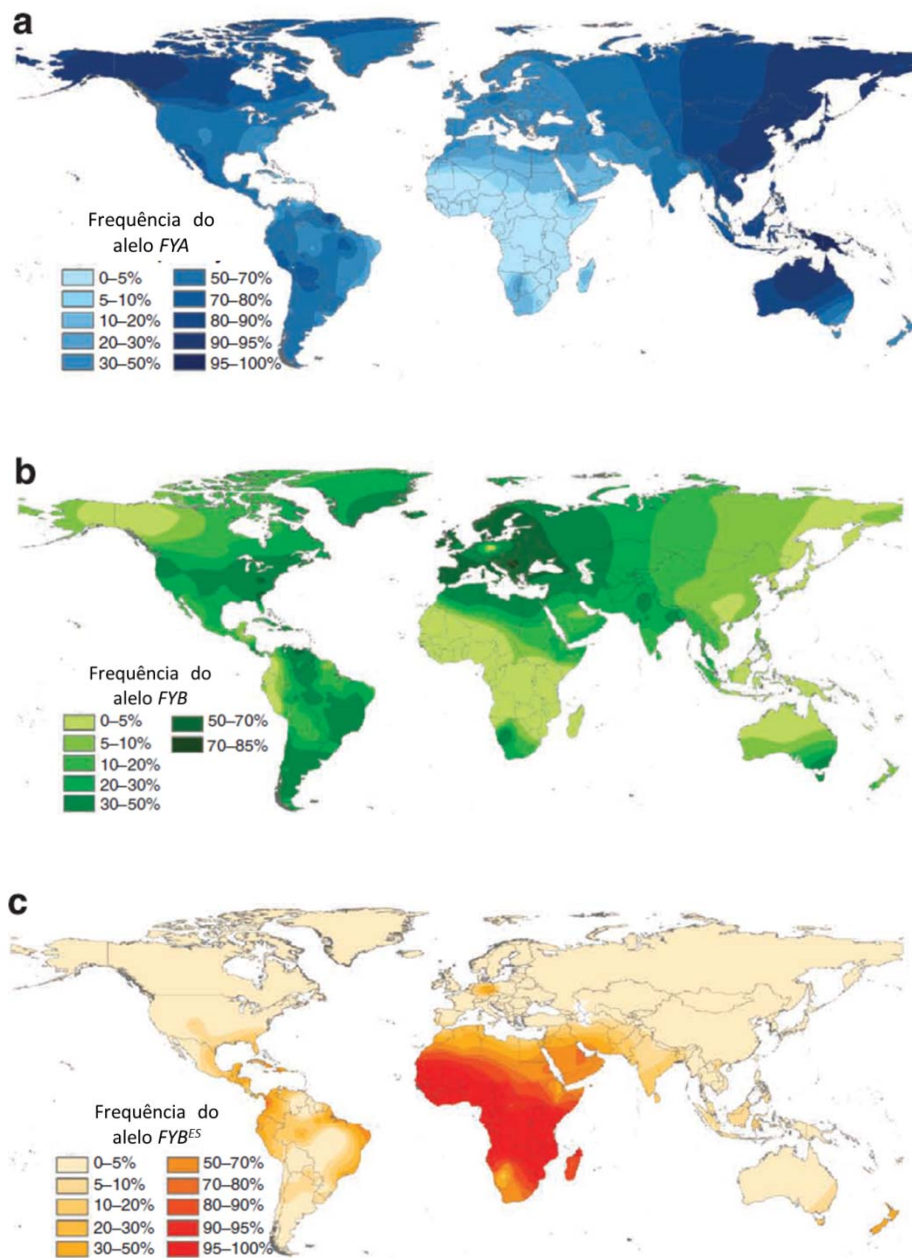


Figura 6 – Frequência global dos alelos de DARC. (a) Frequência do alelo *FY*A*; (b) Frequência do alelo *FY*B*; (c) Frequência do alelo *FY*B^{ES}*. Fonte: modificado de Howes *et al.*, 2011.

1.4.1.1 A influência do DARC na resposta imune à PvDBP

Embora o receptor DARC seja essencial ao processo de invasão dos eritrócitos pelo merozoíto do *P. vivax*, a influência deste receptor na resposta imune tem sido pouco estudada. Sabe-se que indivíduos DARC negativos são altamente resistentes à infecção pelo *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976), e já foi descrito que esses indivíduos apresentam baixos níveis de anticorpos contra proteínas de fase eritrocítica deste parasito (Herrera *et al.*, 2005). Entretanto, poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar a influência dos genótipos

DARC positivos na aquisição de anticorpos anti-PvDBP pela sorologia convencional (Maestre *et al.*, 2010; King *et al.*, 2011). Maestre e colaboradores (2010) sugerem que indivíduos que apresentam um único alelo DARC positivo tem maior frequência de anticorpos anti-PvDBP detectados pela sorologia convencional (Maestre *et al.*, 2010). Entretanto, este estudo foi conduzido em uma região onde a população é em sua grande maioria afro-descendente, portanto, altamente resistente ao *P. vivax* (DARC negativos). Além disso, um estudo recente demonstrou que a variabilidade genética dos parasitos que circulam na Colômbia é diferente da maior parte das áreas de risco de transmissão de malária no mundo (Sousa *et al.*, 2011). Por outro lado, King e colaboradores (2011) não encontraram nenhuma associação entre os genótipos de DARC e a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} detectados pelo ELISA. Com relação à influência do genótipo do receptor DARC na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}, apenas um único estudo demonstrou que o polimorfismo envolvendo o alelo *FY*A* parece influenciar na aquisição destes anticorpos (King *et al.*, 2011). Entretanto, a influência dos diferentes genótipos de DARC nesta resposta de anticorpos capazes de bloquear a invasão do merozoítos nos eritrócitos precisa ser mais estudada.

1.4.2 HLA (Antígeno Leucocitário Humano)

O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) é formado por um grupo de genes que codificam receptores proteicos de superfície celular ou moléculas apresentadoras de antígenos identificadas originalmente por sua habilidade de provocar rejeição a enxertos transplantados entre membros de uma mesma espécie (Dunham *et al.*, 1987; Croua-Roy *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2011).

Em humanos, os receptores de superfície codificados pelos genes MHC são chamados antígenos leucocitários humanos (HLA – do inglês *Human Leucocyte Antigens*). Estes receptores são capazes de reconhecer antígenos ativando células como linfócitos T, células NK, NKT e conduzindo a uma resposta imune efetiva. A expressão do HLA é facilitada pelos estímulos inflamatórios e imune, particularmente por citocinas como IFN- γ (interferon- γ), que estimula a transcrição dos genes do HLA (Cogneta *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012).

O HLA está dividido de acordo com a estrutura e a função dos produtos gênicos em três regiões classificadas como: classe I, classe II e classe III. O sistema HLA ocupa uma região de aproximadamente 4 megabases (Mb) no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (**Figura 7**) (Senger *et al.*, 1993). Mais de 220 genes organizados em “cluster” têm sido localizados no HLA e, no mínimo 10%, têm funções relacionadas ao sistema imune. São herdados em blocos ou séries chamados haplótipos e expressos codominantemente em cada indivíduo (Donadi *et al.*, 2000; Klein & Sato, 2000, Marsh *et al.*, 2000. Robinson *et al.*, 2001, revisto por Oliveira & Sell, 2002).

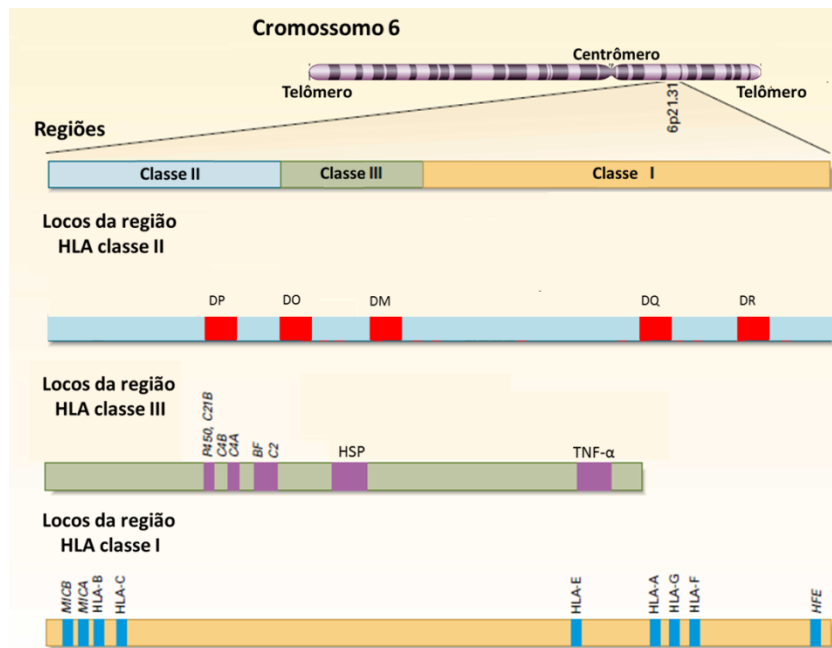


Figura 7 – Desenho esquemático ilustrando a localização e organização do complexo HLA no cromossomo 6 e a disposição dos principais genes em cada loco. Fonte: modificado de Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición, 2006. Disponível em: <http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg>.

Entre todos os genes do HLA, apenas alguns estão envolvidos com a apresentação de antígenos, sendo denominados genes HLA clássicos. Os genes HLA são expressos de forma co-dominante e acompanham a segregação mendeliana clássica (Choo, 2007; Trivedi *et al.*, 2007). As moléculas de classe I se ligam a peptídeos cujo processamento é de origem intracelular e os apresentam para células T CD8+. As moléculas de classe II primariamente ligam-se a peptídeos extracelulares e os apresentam para células T CD4+ resultando na produção de citocinas e ativação de células T auxiliares importantes para a produção de anticorpos (Torres, 2010). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que as moléculas de classe III estão envolvidas na imunidade inata e na resposta inflamatória (Harney *et al.*, 2008; Maggioli *et al.*, 2013).

A região de classe I tem cerca de 2.000Kb e constitui a porção mais telomérica do HLA. Esta região contém os três principais *loci* clássicos funcionais (definidos como determinantes da rejeição a enxertos), que codificam as cadeias pesadas das proteínas HLA de classe I – HLA-A, HLA-B e HLA-C – todos altamente polimórficos e expressos pela maioria das células somáticas em níveis variados. A cadeia leve das proteínas HLA de classe I (não polimórfica), denominada β 2-microglobulina, é codificada fora do HLA, por um gene localizado no cromossomo 15. Os *loci* não-clássicos de classe I incluem HLA-E, HLA-F, HLA-G, HFE e MIC (Carosella *et al.*, 1996; Fainardi *et al.*, 2003).

A região de classe II, de aproximadamente 1.000Kb, constitui a porção mais centromérica do HLA. Dentro dos *loci* de classe II estão genes que codificam diversas proteínas que exercem papéis essenciais no processamento do antígeno, como as proteínas de classe II clássicas – HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). O HLA de classe II também codifica proteínas de classe II não clássicas, como HLA-DM e HLA-DO (Le Bouteiller, 1997).

A região de classe III do sistema HLA localiza-se entre os genes de classe I e de classe II e, apesar de não ser tão polimórfico como estes últimos, constitui o segmento do genoma humano com maior densidade de genes. Os genes presentes nesta região possuem funções variadas, destacando-se o seu papel na codificação de proteínas solúveis importantes na modelação e regulação da resposta imunitária (Xie *et al.*, 2003).

O HLA é o sistema genético mais polimórfico no genoma humano. Este polimorfismo extenso de genes HLA torna pouco provável que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente expressem grupos de moléculas HLA idênticas. Este polimorfismo é a base para a rejeição rápida de enxerto entre indivíduos geneticamente diferentes (Petersdorf *et al.*, 2003).

De acordo com o site <http://hla.alleles.org/>, que é vinculado ao *Anthony Nolan Research Institute*, até outubro de 2013 foram descritos 10.104 alelos HLA, sendo 7.678 alelos de classe I e 2.268 alelos de classe II (**Figura 8**). O *loci* HLA classe II que tem maior variabilidade é o DRB1, com 1.476 alelos, enquanto HLA-DQA1 tem 51 e DQB1 459 alelos já identificados (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> - Outubro 2013). Os antígenos HLA mostram ainda variações características de um grupo racial para outro. As frequências de alelos HLA individuais variam fortemente dentro de uma população e entre populações distintas. Esta diversidade, mais uma vez, reforça a necessidade do conhecimento das frequências de alelos e haplótipos em populações específicas (Middleton *et al.*, 2000; Bicalho *et al.*, 2002; Mickelson *et al.*, 2004; Pena, 2005; Ferreira *et al.*, 2005; Pimenta *et al.*, 2006).

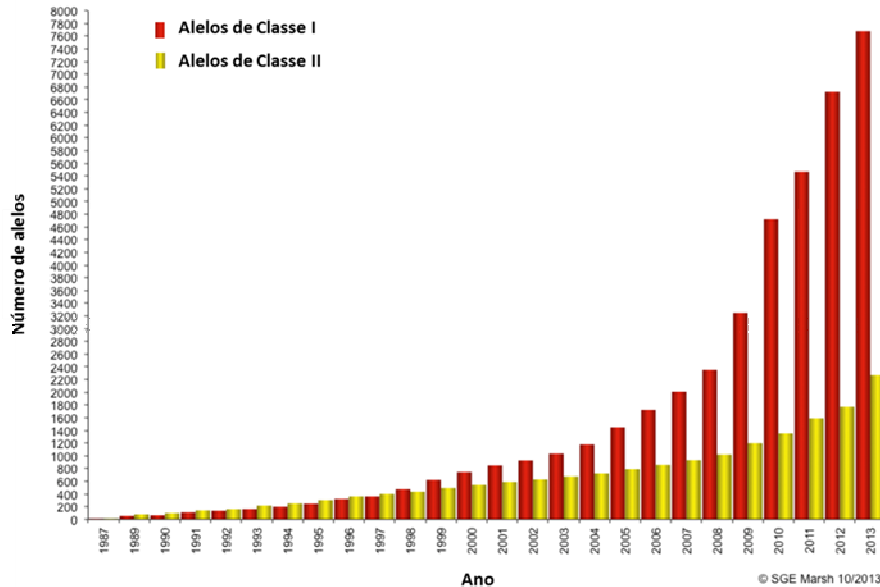


Figura 8 - Polimorfismo gênico do Sistema HLA. Disponível em: http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png (Fonte: modificado de Marsh, 2013).

No Brasil estudos recentes, realizados com população nativa da Amazônia Legal demonstraram que dentro do *loci* DRB1, o grupo alélico HLA-DRB1*04 tem se mostrado o mais frequente para a classe II do HLA (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011; Lima-júnior *et al.*, 2012). Foi descrito também que para o *loci* DQB1*, o alelo DQB1*03 tem se destacado na população da Amazônia brasileira (Lima-júnior *et al.*, 2012). Entre populações ameríndias, mais especificamente em duas populações indígenas (Guarani e Kaingang) foi descrito que para o *loci* DQA1* o grupo alélico mais frequente foi DQA1*01 (Tsuneto *et al.*, 2003). Entretanto, a grande variabilidade do Sistema HLA, faz com que ainda sejam necessários muitos estudos para que se possa determinar a frequência alélica deste Sistema a nível mundial. Estudos aprofundados do polimorfismo do Sistema HLA em populações miscigenadas podem revelar diferentes frequências de alelos e haplótipos de HLA, em comparação com outros grupos raciais e étnicos, que pode influenciar as associações entre HLA e resposta imune. Estas diferenças contribuem para a discriminação entre alelos diretamente envolvidos no desenvolvimento de doenças e aqueles apenas intimamente ligados.

A eficiência da resposta imune de cada indivíduo está condicionada ao HLA (Thorsby, 1997). Até o momento, já foram descritas muitas associações importantes entre antígenos HLA e susceptibilidade a várias doenças, tais como: espondilite anquilosante, doença de Crohn, hepatite B, diabetes *mellitus*, leishmaniose, esquistossomose, entre outras (Brewerton *et al.*, 1973; Lara *et al.*, 1991; Kornbluth *et al.*, 1998, McManus *et al.*, 2001; Han *et al.* 2005). Por outro lado, moléculas de HLA podem ser consideradas como fatores de proteção para determinadas doenças interferindo tanto na infecção quanto na progressão da doença. Dentre

estas doenças, podemos citar: HIV, vasculite reumatóide, dengue, entre outras (Kaslow *et al.* 1996; Tadeu, 1999; Nishimura *et al.*, 2012).

No caso da malária, vários estudos têm mostrado que alelos específicos de HLA desempenham importante papel no desenvolvimento da malária cerebral (Diakite *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010; Cserti-Gazdewich *et al.*, 2011; Hirayasu *et al.*, 2012). Já foi demonstrado também que alelos específicos de HLA estão intimamente associados ao desenvolvimento de anemia em indivíduos acometidos pela malária (Guerra, 2003).

1.4.2.1 HLA classe II e a resposta imune a antígenos de malária

Estudos mostram que o polimorfismo genético do HLA de classe II pode influenciar na resposta de anticorpos (Germain 1999; McFarland & Beeson, 2002). Vários estudos mostram que este polimorfismo está relacionado à infecção pela malária e a capacidade do indivíduo de elaborar uma resposta imune humoral (Patarroyo *et al.*, 1991; Nardin *et al.*, 2001).

O HLA pode influenciar na resposta imune contra vários antígenos de malária. Estudos mostram que o HLA de classe II, incluindo o HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP podem modular a produção de anticorpos contra vários antígenos candidatos à vacina (Germain 1999; McFarland & Beeson, 2002). O *loci* HLA-DR por ser o mais polimórfico, tem sido amplamente estudado e de fato, observou-se que ele apresenta um papel crucial na resposta de anticorpos contra vários antígenos, incluindo proteínas do *P. falciparum* (RAP1, RAP2, AMA1 e EBA-175), e do *P. vivax* (CSP, MSP-1, MSP-3 alfa, MSP-9) (Johnson *et al.*, 2000, 2004; Banic 2004; Cifuentes *et al.*, 2005; Lima-Júnior *et al.*, 2012). Stephens e colaboradores (1995) descreveram acentuada resposta de anticorpos em indivíduos tailandeses vacinados com antígenos da proteína circunsporozoíta (CS) de *P. falciparum* e a presença do HLA DRB1*0501. Ensaio de vacina utilizando múltiplos antígenos de esporozoítos de *P. falciparum* obtiveram altos níveis de imunização. Entretanto, esta resposta mostrou-se geneticamente restrita a indivíduos que apresentavam especificamente três alelos do HLA de classe II: HLA DRB1*0401, DRB1*1101 e DQB1*0603. Por outro lado, o alelo DRB1*0701 foi associado a baixos níveis de resposta de anticorpos (Nardin *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado no Brasil, indivíduos expostos ao *P. vivax*, não foi observada nenhuma associação entre as moléculas de HLA-DR e a resposta de anticorpos contra a variante *P. vivax-like*. Entretanto, foi observada associação entre a resposta de anticorpos para VK247 e a presença dos antígenos HLA-DR16 e entre HLA-DR7 e a ausência de anticorpos de resposta para VK210 (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2004).

Até o momento, um único estudo investigou a influência do polimorfismo do HLA na resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados pela sorologia convencional, não sendo encontrada nenhuma associação entre alelos de HLA-DRB1 e resposta de anticorpos (Storti-Melo *et al.*, 2012). Entretanto, este estudo incluiu

um número muito pequeno de indivíduos, o que não foi representativo para estudos genéticos de HLA. Sendo assim, a caracterização dos genótipos de HLA em estudos de base populacional é fundamental para contribuir no entendimento da influência deste fator genético no desenvolvimento de uma resposta imune protetora.

2 JUSTIFICATIVA

A malária causada pelo *P. vivax* atinge milhões de pessoas no mundo sendo responsável por grande parte da morbidade da malária humana. De importância, causando prejuízos consideráveis sobre comunidades que vivem em áreas endêmicas. No Brasil, essa é a espécie mais prevalente, tendo sido responsável por mais de 80% dos casos de malária (WHO, 2012). Considerando que a malária causada por *P. vivax* é um problema de saúde pública em várias regiões do mundo, e principalmente no Brasil, é fundamental o conhecimento da biologia do parasito para o desenvolvimento de medidas mais efetivas que auxiliem no controle da doença.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo há vários anos estudos que sugerem que a baixa resposta de anticorpos anti-PvDBP pode estar relacionada a características do parasito e do hospedeiro vertebrado (Cerávolo *et al.*, 2009; Kano *et al.*, 2012). Entre as características do parasito estão a baixa imunogenicidade da PvDBP e/ou limitada exposição desta proteína ao sistema imune, visto que esta proteína só é exposta na superfície do parasito no momento da invasão. Outra característica que pode influenciar na baixa resposta imune seria o alto polimorfismo na região do ligante (região II) da PvDBP (Sousa *et al.*, 2010, Sousa *et al.*, 2011). Entretanto, estas características do parasito não explicam o fato de que a maioria dos indivíduos expostos a diferentes variantes do parasito, por um longo período de tempo, não são capazes de desenvolver anticorpos bloqueadores.

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

Outro fator genético do hospedeiro vertebrado que pode interferir na resposta imune contra antígenos da malária é o Sistema HLA (Johnson *et al.*, 2000, 2004; Banic 2004; Cifuentes *et al.*, 2005; Lima-Júnior *et al.*, 2012). Entretanto, um único estudo referente à influência do polimorfismo do Sistema HLA na resposta de anticorpos anti-PvDBP foi realizado, sendo este avaliado apenas à nível de sorologia convencional (Storti-Melo *et al.*, 2012). Neste estudo, que avaliou os alelos de HLA-DRB1 e resposta imune, não foi encontrada nenhuma associação entre esses alelos e resposta de anticorpo. Entretanto, este estudo incluiu um número muito pequeno de indivíduos. Diante disso, a caracterização dos genótipos de HLA em estudos de base populacional é fundamental para contribuir no entendimento da influência deste fator genético no

desenvolvimento de uma resposta imune protetora. Estes achados podem futuramente auxiliar nos estudos para o desenvolvimento de uma vacina antimalária.

Em 2008, o nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo de base populacional, do tipo coorte, em uma área de assentamento agrícola, no estado do Amazonas, comunidade de Rio Pardo (Kano *et al.*, 2012). Assim, o trabalho de campo no assentamento ofereceu uma oportunidade única para estudar aspectos genéticos relacionados ao indivíduo que poderiam estar interferindo na resposta de anticorpos anti-PvDBP.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do polimorfismo do receptor DARC e do HLA classe II na resposta imune anti-PvDBP

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar a influência do polimorfismo genético do receptor eritrocítico do hospedeiro vertebrado (receptor DARC) na resposta imune convencional e funcional à PvDBP;
- 2) Analisar *in vitro* se anticorpos anti-PvDBP reconhecem igualmente eritrócitos pertencentes aos diferentes genótipos de DARC;
- 3) Associar os polimorfismos do HLA classe II com a resposta imune convencional e funcional à PvDBP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área e população de estudo

O estudo foi desenvolvido no assentamento agrícola de Rio Pardo (1°46'S, 1°54'S, 60°22'O, 60°10'O), localizado no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas (**Figura 9**). A localidade rural de Rio Pardo situa-se a aproximadamente 160km de Manaus, com acesso pela rodovia federal (BR-174) que liga o estado do Amazonas ao estado de Roraima. O assentamento agrícola foi oficialmente criado em 1996, pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), como parte dos grandes projetos de colonização da Amazônia focados na agricultura e ocupação humana da região (de Castro *et al.*, 2006). Nesta comunidade a população vive principalmente da agricultura de subsistência e pesca. A temperatura média anual da região é de 31°C, com clima úmido e precipitação média anual de 2.000mm. Existem duas estações bem definidas: um período chuvoso (novembro a maio) e um período de seca (junho a outubro). O assentamento é composto por sete áreas denominadas “ramais”: Principal, Samuel, Novo Paraíso, Gusmão, Terra Preta, Taxista e Novo Progresso - que inclui as famílias assentadas de ambos os lados de vias não pavimentadas. Além disto, há uma população ribeirinha, que vive às margens do Igarapé de Rio Pardo. Nesta área, um censo da população (setembro a outubro de 2008) identificou 701 habitantes, onde 360 (51,4%) residiam nas áreas de ramais e 341 (48,6%) no Igarapé. Os serviços de saúde oficiais disponíveis são restritos, com apenas um posto de diagnóstico de malária dentro da comunidade, que fornece o diagnóstico e tratamento gratuito para os moradores da área.

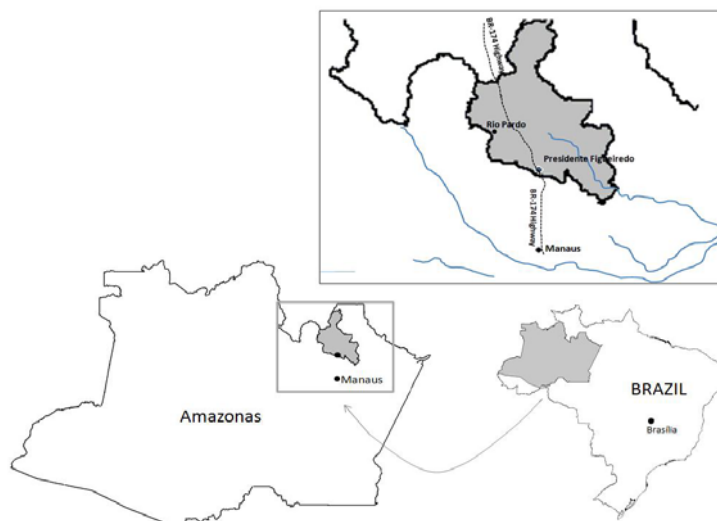


Figura 9 - Mapa do estado do Amazonas, região noroeste do Brasil, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo, dentro da municipalidade de Presidente Figueiredo (área em cinza dentro do estado do Amazonas), localizado há aproximadamente 160Km da capital Manaus.

4.2 Desenho experimental do estudo

Os aspectos éticos e metodológicos do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (Carta de Aprovação N°007/2006 e N°07/2009), de acordo com a Resolução do Conselho Brasileiro de Saúde- CNS 196/96. A descrição detalhada do estudo de coorte na comunidade de Rio Pardo foi publicada recentemente por Kano e colaboradores (Kano *et al.*, 2012). Resumidamente, o estudo de coorte aberta de base populacional foi iniciado em novembro de 2008, e os seguintes procedimentos foram realizados durante a primeira viagem da equipe de campo para a área: (i) aplicação de um questionário estruturado para todos os voluntários a fim de obter dados demográficos, epidemiológicos e clínicos; (ii) exames físicos dos indivíduos, incluindo temperatura corporal e avaliação do tamanho do fígado e do baço; (iii) busca ativa de pacientes com malária diagnosticados através de microscopia óptica (gota espessa); e (iv) coleta de sangue, sendo que dos indivíduos acima de cinco anos de idade foi coletado sangue venoso (10mL em EDTA) e das crianças com menos de cinco anos de idade, o sangue foi coletado em papel filtro no momento do diagnóstico. Dos 541 indivíduos incluídos na linha de base, 395 (73%) tiveram amostras de DNA e plasma necessárias aos ensaios moleculares e sorológicos.

Após seis e 12 meses, dois outros inquéritos transversais idênticos foram realizados. Foram recrutados 154 indivíduos adicionais no 2° corte (junho de 2009) e 71 indivíduos no 3° corte (outubro-novembro de 2009), totalizando 620 voluntários que contribuíram com o DNA e amostras de plasma. Dos 620 indivíduos incluídos no estudo, 205 (33%) tiveram amostra de plasma coletada nos três cortes consecutivos (amostras pareadas).

As características dos 620 indivíduos incluídos no estudo estão demonstradas na **Tabela 1**. A mediana de idade de 28 anos e a proporção de homens e mulheres 1,4:1. Nesta população, a idade dos indivíduos corresponde ao tempo de exposição à malária na Amazônia brasileira ($r = 0,91$; $p < 0,0001$, teste de correlação de *Pearson*); o que demonstra que estes indivíduos estavam residindo na região amazônica por cerca de 24 anos. No momento da primeira coleta de sangue do indivíduo, foram identificadas pela microscopia óptica 19 (3%) infecções agudas, sendo que 17 (90%) das infecções foram causadas pelo *P. vivax*. Através da técnica de PCR foram identificadas 17 infecções adicionais, sendo 15 causadas por *P. vivax* e duas por *P. falciparum*. Nenhuma infecção por *P. malariae* ou infecção mista foram detectadas tanto pela microscopia óptica quanto pela PCR.

Tabela 1. Características demográficas, epidemiológicas dos 620 indivíduos acompanhados no estudo, Rio Pardo/AM.

Características	
Mediana de idade, anos (IQR)	28 (14 - 47 anos)
Gênero, homem:mulher	1,4:1
Infecções por malária, n (%)	
Microscopia óptica	19 (3,1)
PCR	17 (2,7)
Total	36 (5,8)
Tempo de exposição à malária, mediana (IQR)	24 (13 - 41 anos)
Episódios prévios de malária, mediana (IQR)	5 (1 - 11)

IQR=intervalo interquartil

Os 620 participantes foram acompanhados por uma média de 7 meses (10 dias – 12 meses), totalizando uma contribuição de 4.646 pessoas-mês. Baseado em casos confirmados parasitologicamente, a densidade de incidência de *P. vivax* foi de 2,32 episódios de malária por 100 pessoas-mês (95% IC: 1.92-2.80/100 pessoas-mês) e 0,04 episódios por 100 pessoas-mês para *P. falciparum* (95% IC: 0.007-0.14/100 pessoas-mês).

4.3 Genotipagem do antígeno de grupo sanguíneo DARC pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

A genotipagem do antígeno de grupo sanguíneo DARC foi realizado segundo protocolo previamente descrito por Sousa *et al.*, 2007, com modificações. Resumidamente, as amostras de DNA extraídas foram processadas em placas óticas de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para a amplificação dos alelos de DARC. O volume final da reação foi de 20µL contendo 50-100ng de DNA genômico, 10µL SYBR® Green PCR master mix (Biosystems), e 0,1-1,0 pmoles de cada iniciador (Biosystems). A amplificação e a fluorescência foram detectadas utilizando ABI Prism® 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). As condições da PCR foram: um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, foi realizado um ciclo de dissociação com variação crescente de temperatura (60°C a 95°C).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (**Tabela 2**) foram desenhados no programa Primer Express® v.2.0 (Applied Biosystems), como descrito por Sousa e colaboradores (2007) com pequenas modificações. Os

primers originais FGATA e RYA foram substituídos por FGATANEW e RYANEW. Os pares de iniciadores FY/RYANEW e FAB/RABGATA foram utilizados na mesma reação, como uma reação de PCR multiplex, bem como os pares FY/RYB e FGATANEW/RABGATA. Os iniciadores RYANEW e RYB apresentam o polimorfismo G125A na extremidade 3' e juntamente com o iniciador senso FY amplificam os alelos *FY*A* e *FY*B*, respectivamente. Para detecção da mutação T- 67C na região promotora do gene FY, foram desenhados os iniciadores FAB e FGATANEW, que amplificam juntamente com o iniciador RABGATA, o promotor selvagem e o mutado, respectivamente. Como os iniciadores FAB/FGATANEW e RYANEW/RYB são semelhantes foi introduzida uma alteração no nucleotídeo imediatamente anterior ao nucleotídeo polimórfico, com o objetivo de impedir a amplificação inespecífica dos alelos. A alteração impede o pareamento nucleotídico na extremidade 3' entre o iniciador não-específico e a fita molde de DNA. Uma segunda modificação no iniciador FGATANEW foi realizada a partir da adição de uma cauda C/G na região 5' do iniciador, com a finalidade de aumentar a diferença de tamanho e temperatura de dissociação dos produtos da PCR em tempo real amplificados com o par de iniciadores FAB e FGATANEW.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores utilizados para a reação da genotipagem de DARC por PCR em tempo real.

Nome dos Iniciadores	Região	Sequência dos iniciadores	Região
FGATANEW	5'	CCC GGG CCC GCC GCC CTCA TTA GTC CTT GGC TCT TGC	3'
FAB*	5'	CCC TCA TTA GTC GGC TCT TTT	3'
RABAGATA*	5'	A GGG GCA TAG GGA TAA GGG ACT	3'
FY*	5'	C TCA AGT CAG CTG GAC TTC GAA GAT	3'
RYANEW	5'	AG CTG CTT CCA GGT TGG CGC	3'
RYB*	5'	CTG CTT CCA GGT TGG CGT	3'

*Primers originalmente descritos por Sousa *et al.* (2007); os iniciadores FGATANEW e RYANEW foram desenhados no presente trabalho (Programa *Primer Express*® v.2.0 (Applied Biosystems)).

4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-PvDBP foram realizados utilizando duas proteínas recombinantes correspondendo à região II (PvDBP_{II}) e região II-IV (PvDBP_{II-IV}). A proteína PvDBP_{II} inclui os aminoácidos 243-573 (região II) e foi expressa em sistema procarioto em fusão com uma cauda de poli-histidina (6xHis) de 39 kDa, já descrita previamente (Ntumngia *et al.*, 2012). A proteína recombinante PvDBP_{II-IV} contém os aminoácidos 132–771 (região II–IV), sendo expressa com uma proteína de fusão solúvel glutatona *S*-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST), de 140kDa, previamente descrita (Fraser *et al.*, 1997; Cerávolo *et al.*, 2005).

Os ensaios foram realizados segundo protocolo padrão, sendo a diluição dos anticorpos primários e secundários determinados previamente por titulação (Cerávolo *et al.*, 2005). A concentração dos antígenos recombinantes PvDBP_{II} e PvDBP_{II-IV}, foram 3µg/mL e 1,25µg/mL respectivamente. Os 96 poços das placas de ELISA (Maxysorp, Nunc, Denmark) foram sensibilizados por 12h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem [(0,05% tween 20 em PBS1X, pH 7,2, (PBS-T)] e a cada poço foram adicionados 200µL de tampão de bloqueio [5% de leite em pó (Molico) diluído em PBS-T]. Após 1h de bloqueio a 37°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T, e 100µL dos soros testes foram adicionados aos poços, em duplicatas, na diluição de 1:100 em PBS-T adicionado de 1,5% de leite em pó. Após incubação por 1h a 37°C, as placas foram lavadas com PBS-T por 10 vezes e incubadas novamente, nas mesmas condições, com 100µL/poço do anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase, diluído a 1:1.000 (PBS-T com 1,5% de leite). Após a lavagem, foi adicionado 100µL/poço de solução contendo 10mg de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride substrate* - Sigma-Aldrich, USA) diluído em 50 mL de tampão citrato de sódio (0,1M pH 5,0) na presença de 40µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% (Sigma-Aldrich). A reatividade dos anticorpos anti-PvDBP foi determinada pelo valor obtido da absorbância no comprimento de onda de 490nm (D.O. _{490nm}), realizada em um leitor de ELISA (Stat Fax-2.100, Awareness Technology, Palm City, FL). Para os soros testados com a proteína PvDBP_{II-IV}, as absorbâncias foram corrigidas do valor obtido da proteína controle, GST. O limite de positividade (*cut-off*) entre os resultados positivos e negativos foi estabelecido entre a média observada pelos soros de 30 indivíduos nunca expostos à malária, acrescida de três desvios-padrão. O valor da D.O. foi dividida pelo *cut-off* para a obtenção dos valores de IR (Índice de Reatividade). Valores de IR > 1 foram considerados positivos.

4.5 Culturas Celulares

Para realização dos ensaios funcionais foi utilizada uma linhagem de células de mamíferos permissíveis à transfecção, COS-7, originalmente isolada a partir de células de rim de primata não humano africano, e modificada pelo vírus SV 40 (*American Type Culture Collection* - ATCC, Manassas, VA). Para realização dos ensaios funcionais, as células COS-7 foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning Incorporated, EUA) contendo 10mL do meio de cultura *Dulbecco's Minimal Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA). O meio para manutenção das células (meio DMEM completo) continha 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, EUA), 25mM de bicarbonato de sódio, 2mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA), 100UI/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) e 25mM de HEPES (Sigma). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade, sendo os repiques realizados a cada dois dias, utilizando-se solução de tripsina e EDTA a 0,25% (Gibco), conforme protocolo padrão (Phelan, 2003).

4.6 Transfecção de células COS-7 e ensaio funcional

Para os ensaios de transfecção utilizou-se um plasmídeo construído previamente pelo nosso grupo de pesquisa que contém o gene da DBP_{II} da variante de *P. vivax* mais frequente no Brasil (Souza-Silva *et al.*, 2010). Para os ensaios de transfecção utilizou-se a lipofectamina e reagente *Plus* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), nas concentrações e protocolos indicados pelo fabricante. Resumidamente, as células COS-7 foram adicionadas às placas de cultura de seis poços (Nunc, Denmark) (1,5 x 10⁵ células/poço) e então transfectadas com 0,5µg/poço de DNA plasmidial e complexos de lipossomos (5% de reagente *Plus* e 3% de lipofectamina) em meio de cultura DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Rockville, MD) sem soro bovino fetal (SBF) (meio DMEM incompleto). Este meio incompleto continha 25mM de bicarbonato de sódio, 2mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) e 25mM de HEPES (Sigma). Após 6h de incubação do complexo lipossoma-DNA (37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade), o meio de transfecção foi substituído por meio DMEM contendo 10% SBF (Gibco), 2mM de L-glutamina (Gibco), 25mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 25mM de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), sendo as placas incubadas a 37°C. Após 24h, o meio de cultura foi novamente substituído por meio DMEM completo, e a eficiência da transfecção verificada por meio da visualização das células em um microscópio de fluorescência. Quarenta e oito horas após a transfecção, as placas foram lavadas com meio DMEM incompleto, e as células incubadas com os

soros/plasmas-testes (37°C, 1h, 5% de CO₂) diluídos em meio DMEM incompleto. A diluição utilizada foi de 1:40, pois em ensaios prévios, essa diluição apresentou a melhor inibição interação ligante-receptor quando diferentes soros foram testados. Posteriormente, foram adicionados 200µL/poço de uma solução a 10% de eritrócitos humanos O/DARC positivos em meio DMEM completo e as placas incubadas à temperatura ambiente por 2h. Ao final da incubação as placas foram lavadas, três vezes com meio DMEM incompleto, para remoção dos eritrócitos não aderentes. As rosetas formadas a partir da interação ligante-receptor (**Figura 10**) foram quantificadas (20 campos/poço) em um microscópio estereoscópio de fluorescência invertido e com contraste de fase (200x) (Nikon, Melville, NY, USA). As rosetas só foram quantificadas quando eritrócitos aderentes cobriram mais que 50% de sua superfície celular (Michon *et al.*, 2000). A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula $100 \times (R_c - R_t)/R_c$, onde R_c é a média do número de rosetas presente no controle e R_t a média do número de rosetas presentes nos soros-testes.

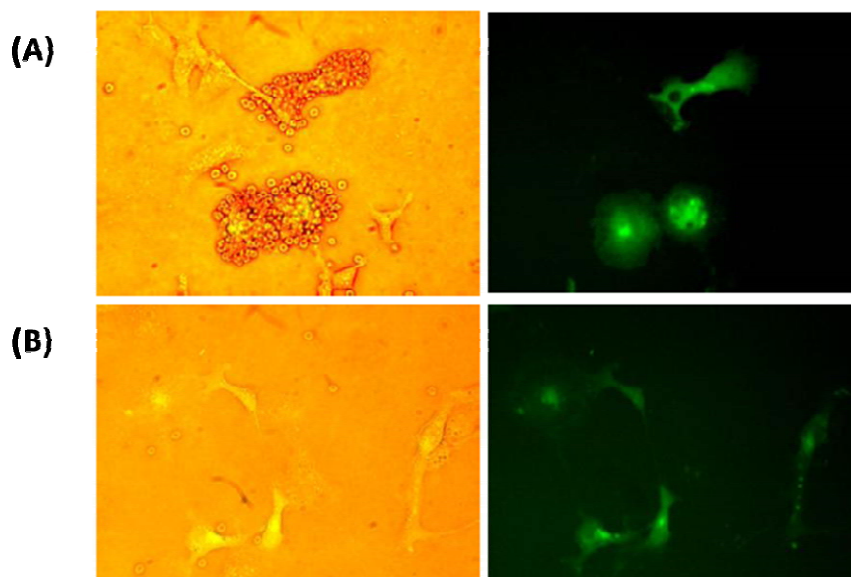


Figura 10 - Ensaio funcional ilustrando as células COS-7 expressando a PvDBP_{II}. **(A)** A figura mostra a presença de eritrócitos aderidos às células COS-7 transfectadas (rosetas) através da ligação DBP_{II}/DARC. **(B)** A figura ilustra a ausência de ligação entre eritrócitos e as células COS-7 transfectadas em função da presença de anticorpos inibitórios no soro.

4.7 Genotipagem do Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

No presente trabalho, a genotipagem dos alelos dos gene do Sistema HLA classe II (DRB1, DQB1 e DQA1) foi realizada pelo método molecular de alta resolução, PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence of Oligonucleotides*) utilizando o kit *One Lambda* (Canoga Park, CA, USA) com tecnologia

Luminex, conforme recomendações do fabricante. A amplificação do DNA alvo utilizando iniciadores específicos para os *loci* HLA-DRB1 (alelos 01-16), HLA-DQA1 (alelos 01-06) e HLA-DQB1 (02-06) foi realizada conforme protocolo bem estabelecido pelo grupo da nossa colaboradora Dra. Ana Maria Sell (UEM- Universidade Estadual de Maringá). A amplificação dos fragmentos de DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 2,5%. A visualização das bandas foi realizada pela coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência de fragmentos específicos de DNA amplificados. Posteriormente, os DNAs amplificados foram submetidos à hibridização com microesferas ligadas aos oligonucleotídeos específicos para os alelos de HLA de classe II conjugados à biotina, seguida de incubação com a estreptavidina conjugada com ficoeritrina. A leitura da reação foi realizada por meio de um citômetro de fluxo. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, em colaboração pela a Dra. Ana Maria Sell.

4. 8 Análise estatística

Um banco de dados contendo informações demográficas, epidemiológicas, clínicas e imunológicas de cada participante do estudo foi criado utilizando o programa Epidata (<http://www.epidata.dk>). Dependendo da distribuição dos dados amostrais (seguem ou não uma distribuição normal) testes estatísticos paramétricos e não paramétricos foram utilizados. Assim, correlações lineares entre duas variáveis contínuas foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson* ou *Spearman*. Para comparar proporções independentes foram utilizados o teste Z (dados paramétricos) ou Qui-quadrado (χ^2) (dados não paramétricos). Para avaliar correlações entre proporções foi utilizado o teste *McNemar*. Para comparar a diferença de médias/medianas foram utilizados os teste de análise de variância (ANOVA) (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) seguido de teste de Tukey ou Dunn como teste *post hoc*. Para determinar as taxas de incidência (pessoas-tempo) foi utilizado o teste Mid-P exato. A primeira parte das análises estatísticas que envolveram polimorfismos de DARC e resposta imune foram realizadas no programa Stata, versão 12 e OpenEpi (http://www.openepi.com/v37/Menu/OE_Menu.htm), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

No caso específico do HLA as análises que envolveram delineamento transversal foram realizadas empregando-se a Regressão Logística utilizando o algoritmo *stepwise*, método *backward*. De acordo com a categorização dos dados foi utilizada a Regressão Logística binomial (comparação entre dois grupos) ou Multinomial (comparação entre três grupos). Para as análises que envolveram o delineamento longitudinal dos dados, foi utilizado a Regressão Marginal Logística, univariada (frequência alélica $< 5\%$) ou multivariada (frequência alélica $> 5\%$). Todas as análises de HLA com a resposta de anticorpos foram realizadas utilizando

o Programa R versão 3.0.1. (<http://www.r-project.org>) com o suporte do estatístico André Gabriel F.C. da Costa (ABG Consultoria Estatística LTDA). Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Distribuição de frequência dos genótipos DARC na população estudada

Na população estudada, o genótipo FY^*A/FY^*B foi o mais frequente (29,4%), seguido dos genótipos FY^*A/FY^*A e FY^*A/FY^*B^{ES} (Figura 11A). Como esperado, o genótipo FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES} correspondente ao fenótipo DARC negativo, foi pouco frequente na população estudada (3,2%). Com relação aos alelos de DARC, foi observado uma predominância significativa dos alelos DARC não-silenciados na população, com $FY^*A > FY^*B > FY^*B^{ES}$ ($p < 0,0001$, teste Z) (Figura 11B). Além disso, as variáveis demográficas e epidemiológicas associadas ao risco de infecção por malária (tais como idade, gênero e local de residência) foram distribuídas igualmente entre os indivíduos carreadores dos diferentes genótipos de DARC (dados não mostrados).

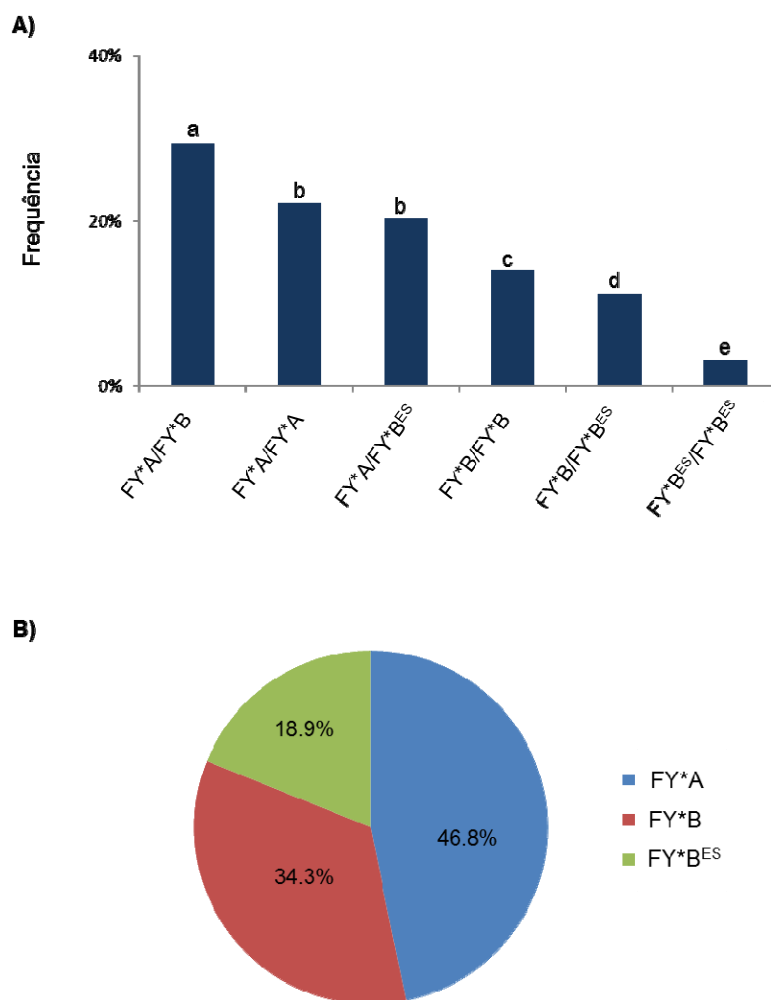


Figura 11 - Distribuição dos genótipos e alelos de DARC na população de Rio Pardo/AM. **A)** Porcentagem de indivíduos carreadores de diferentes genótipos de DARC (FY^*A/FY^*B , FY^*A/FY^*A , FY^*A/FY^*B^{ES} , FY^*B/FY^*B , FY^*B/FY^*B^{ES} e FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}). Diferentes letras localizadas acima das barras (a-e) indicam diferenças nas frequências dos genótipos de DARC ($p < 0,05$, determinado pelo teste Z). **B)** Frequência alélica ($FY^*A > FY^*B > FY^*B^{ES}$).

5.2 Resposta de anticorpos anti-PvDBP em função da sazonalidade dos episódios de malária

A distribuição temporal de episódios de malária causados por *P. vivax* de acordo com índice pluviométrico no período de novembro/08 a novembro/09 está representada na **Figura 12A**. Como esperado, o número de episódios de malária variou com a estação do ano e com o índice pluviométrico.

Os anticorpos anti-IgG contra a principal variante presente na região estudada (Sal-1) foram detectados pela sorologia convencional (ELISA) utilizando-se duas proteínas recombinantes, PvDBP_{II} (região do ligante) e PvDBP_{II-IV} (proteína recombinante maior correspondendo as regiões II-IV). Entre os 620 participantes, 395 participaram do estudo no primeiro corte (linha de base), 410 no segundo corte (6 meses depois) e 407 no terceiro corte (12 meses depois).

A **Figura 12B** ilustra a resposta de anticorpos anti-PvDBP ao longo do estudo, nos indivíduos com ou sem malária aguda. No primeiro corte, 32% a 36% responderam à região II (PvDBP_{II}) e 44% a 50% responderam à região II-IV (PvDBP_{II-IV}). De grande importância, foi observado que o perfil de resposta anti-PvDBP_{II} permaneceu relativamente estável ao longo do estudo, sendo independente do perfil de transmissão de malária. Por outro lado, o perfil de resposta anti-PvDBP_{II-IV} variou de acordo com a transmissão de malária; mais especificamente, variou de 50% a 29% ($p < 0,05$, teste Z). Nesta população, a resposta de anticorpos anti-PvDBP não parece ser influenciada por infecção aguda, visto que a frequência de resposta foi semelhante para os grupos agudos e não agudos ($p > 0,05$ para todas as comparações). Entretanto, o baixo número de infecções agudas identificadas na população de estudo, impediu qualquer conclusão sobre a associação de infecção e resposta de anticorpos anti-PvDBP. Desta forma, as infecções agudas não foram exploradas nas análises posteriores.

Foi possível observar também que, enquanto 50% daqueles que respondem à PvDBP_{II} foram classificados como alto respondedores (IR > 4), a maioria dos que respondem à PvDBP_{II-IV} tiveram resposta mais baixa (70 a 85%, IR < 4).

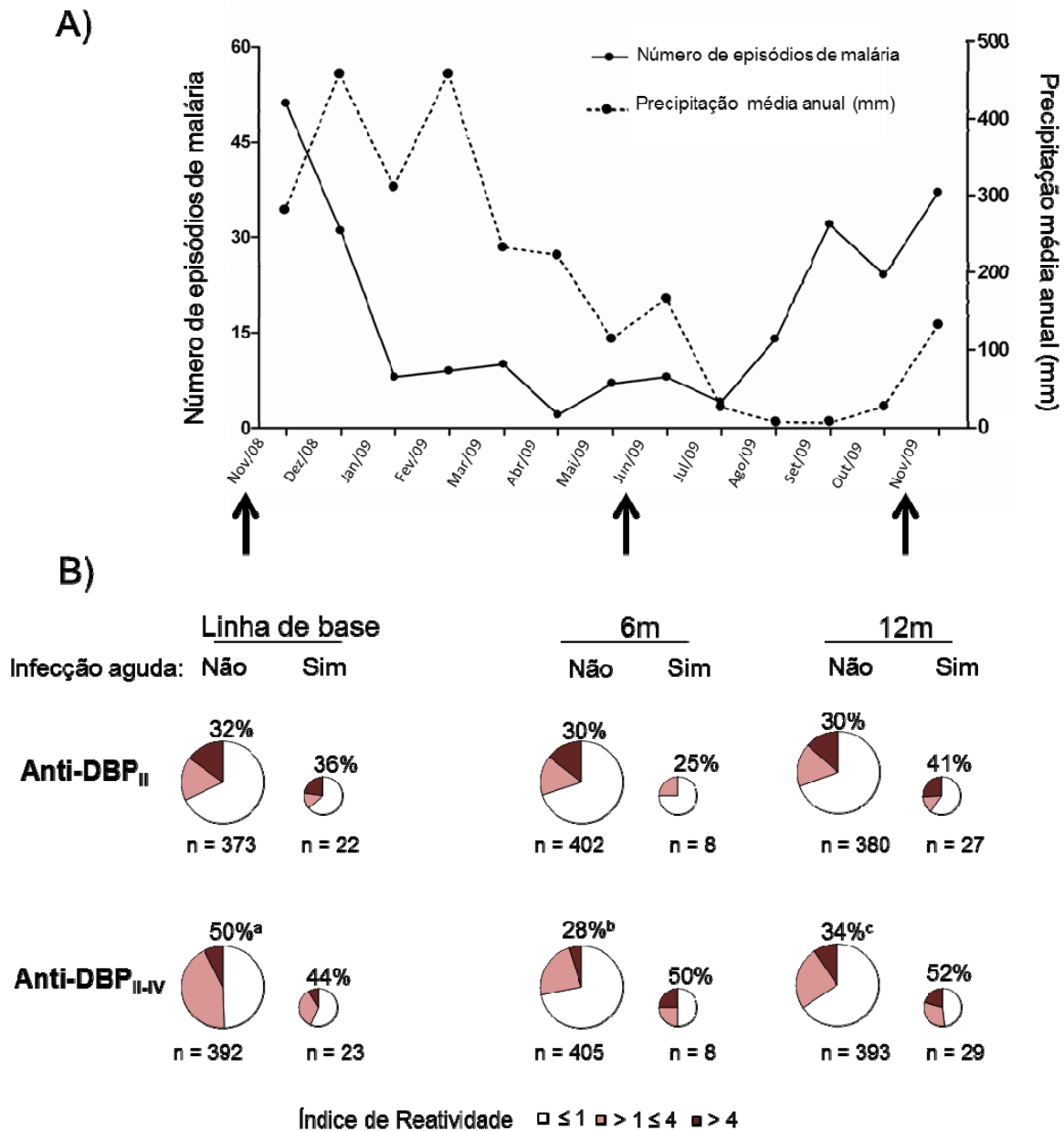


Figura 12 - Distribuição temporal dos episódios de malária causados por *P. vivax*, e resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP pelo ELISA; Amazonas, Brasil (nov 2008-dez 2009). **(A)** O número de episódios de malária, detectados pela microscopia óptica variou de acordo com a estação do ano e precipitação anual de chuva. **(B)** Frequência de anticorpos anti-PvDBP_{II} e anti-PvDBP_{II-IV} detectados pela sorologia convencional (ELISA), ao longo do estudo (linha de base, 6 e 12 meses depois). Os indivíduos foram agrupados de acordo com a presença (sim) ou ausência (não) de infecção aguda no momento da coleta de sangue. Os resultados estão representados pela frequência de respondedores (porcentagem acima dos gráficos), sendo o IR > 1 considerado positivo. As diferentes letras localizadas acima dos gráficos (a-c) indicam diferenças nas frequências de resposta de anticorpos entre os diferentes cortes.

5.3 Associação da resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados no ELISA com o genótipo do receptor DARC

Para determinar se o polimorfismo de DARC é capaz de influenciar a resposta de anticorpos anti-PvDBP, os indivíduos foram separados em grupos de acordo com o genótipo de DARC, isto é, carreadores de dois alelos DARC positivos (FY^*A/FY^*A , FY^*A/FY^*B , FY^*B/FY^*B), de um alelo DARC positivo (FY^*A/FY^*B^{ES} , FY^*B/FY^*B^{ES}), ou nenhum (FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}). Inicialmente, avaliou-se a frequência de anticorpos contra a PvDBP_{II} (**Figura 13**). Como esperado, a frequência de anticorpos entre os indivíduos carreadores de nenhum alelo DARC-positivo (FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}) foi muito baixa e o padrão de resposta se manteve estável ao longo do tempo, ou seja, durante todo o estudo de coorte (**Figura 13A**). Entre os indivíduos que carregavam pelo menos um alelo DARC-positivo, cerca de 30% (29-36%) tinham anticorpos anti-PvDBP_{II}, não sendo observada diferença entre os indivíduos carreadores de um ou dois alelos DARC positivos (**Figura 13A**).

Dos 620 indivíduos incluídos no estudo, 205 tiveram amostras de plasma coletadas nos três cortes transversais (amostras pareadas). Assim, analisou-se a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} entre os indivíduos deste subgrupo. Os resultados confirmaram não haver associação clara entre a resposta de anticorpos anti-PvDBP e o genótipo DARC (**Figura 13B**). Apesar disso, no grupo de indivíduos que tiveram amostras pareadas, foi possível observar uma leve tendência de resposta anti-PvDBP_{II} mais intensa ($IR > 4$) entre os indivíduos carreadores de um único alelo DARC positivo. Entretanto, esta diferença foi significativa apenas no terceiro corte, com 13% e 26% dos altos respondedores detectados entre os carreadores de dois e um alelo DARC positivo, respectivamente ($p = 0,0014$, teste $Z = 3,2$).

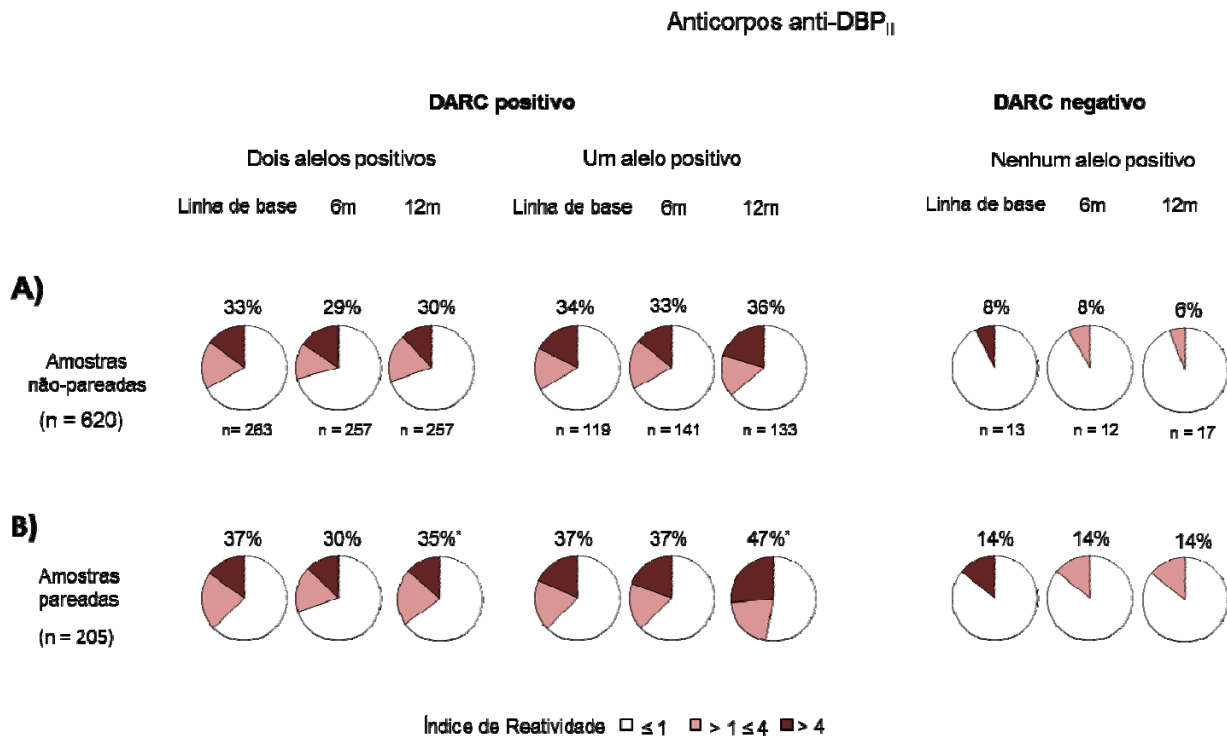


Figura 13 - Resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP_{II} detectados pelo ELISA entre indivíduos carreadores de dois alelos DARC positivos (FY^*A/FY^*A , FY^*A/FY^*B , FY^*B/FY^*B), um alelo DARC positivo (FY^*A/FY^*B^{ES} , FY^*B/FY^*B^{ES}) e nenhum alelo DARC positivo (FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES} , DARC negativo). Estão representadas as frequências (%) de respondedores que **(A)** participaram pelo menos uma vez durante a coorte (amostras não pareadas, n=620) ou **(B)** que participaram dos três cortes, isto é, linha de base, 6 e 12 meses depois (amostras pareadas, n = 205). O índice de reatividade (IR) > 1,0 foi considerado positivo. Diferenças significativas entre frequências de resposta foram encontradas apenas entre os grupos DARC negativo e DARC positivo ($p < 0,05$, teste qui-quadrado). O símbolo asterisco (*) representa diferença significativa entre a intensidade da resposta de anticorpos.

A influência do polimorfismo de DARC na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} detectados pela sorologia convencional também foi avaliada. Em geral, observou-se que o perfil de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} foi muito semelhante ao observado para a proteína PvDBP_{II} (**Figura 14**), exceto para o genótipo DARC negativo. Neste grupo, (DARC negativo) foi observada uma alta frequência de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV}, entretanto o número de indivíduos incluídos neste grupo foi muito pequeno impedindo qualquer conclusão definitiva sobre a associação deste genótipo de DARC e a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV}.

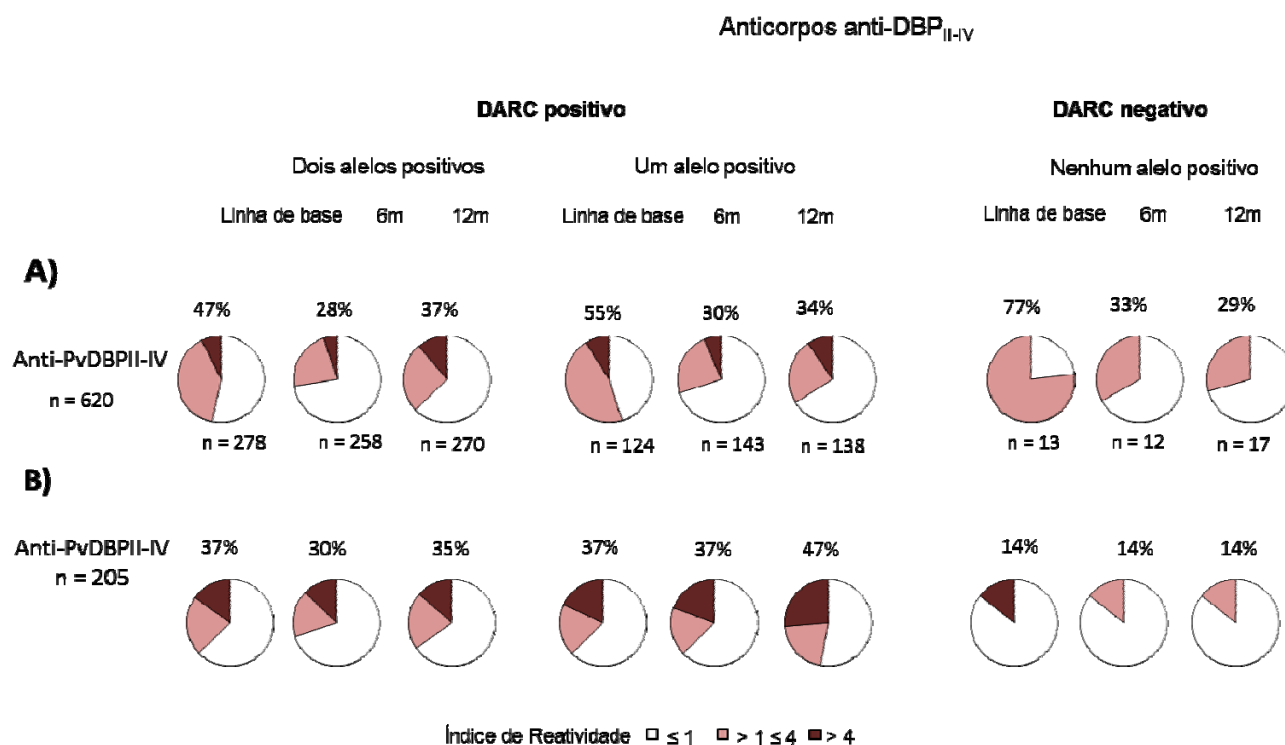


Figura 14 - Resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP_{II-IV} detectados pelo ELISA entre indivíduos carreadores de dois alelos DARC positivos, um alelo DARC positivo e nenhum alelo DARC positivo. Estão representadas as frequências (%) de respondedores (A) que participaram pelo menos uma vez durante a coorte (amostras não pareadas, n = 620) ou (B) participaram dos três cortes, isto é, linha de base, 6 e 12 meses depois (amostras pareadas, n = 205). Os resultados estão representados pela frequência de respondedores, sendo o IR > 1,0 considerado positivo.

5.4 Influência do genótipo de DARC na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}

5.4.1 Variantes da PvDBP utilizadas nos ensaios funcionais

A região do ligante da PvDBP_{II} (região II, DBP_{II}) é muito polimórfica, sendo que este polimorfismo pode influenciar na resposta imune contra a PvDBP, como já descrito pelo nosso grupo de pesquisa (Cerávolo *et al.*, 2009). Visando reduzir a influência do polimorfismo na capacidade do plasma em inibir a interação PvDBP_{II}-DARC, no presente trabalho utilizou-se a variante mais comumente encontrada no Brasil (Acre-1) (Sousa *et al.*, 2010). Entretanto, como foi observado mais recentemente que na população de Rio Pardo Sal-1 é uma variante frequente (Kano *et al.*, 2012), fez-se necessário comparar a resposta de anticorpos inibitórios frente à expressão da PvDBP_{II} das variantes Acre-1 e Sal-1. Para isso, foram selecionados de forma aleatória amostras de plasma de 15 indivíduos incluídos no estudo para serem testados nos ensaios funcionais com estes plasmídeos recombinantes. Como mostrado na **Figura 15**, observou-se uma resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} semelhante para as duas variantes (Sal-1 e Acre-1) utilizadas nos ensaios

funcionais. O mesmo perfil foi obtido com os plasmas diluídos 40 vezes (A) ou 120 vezes (B). Diante disso, todos os ensaios foram realizados apenas com a variante Acre-1.

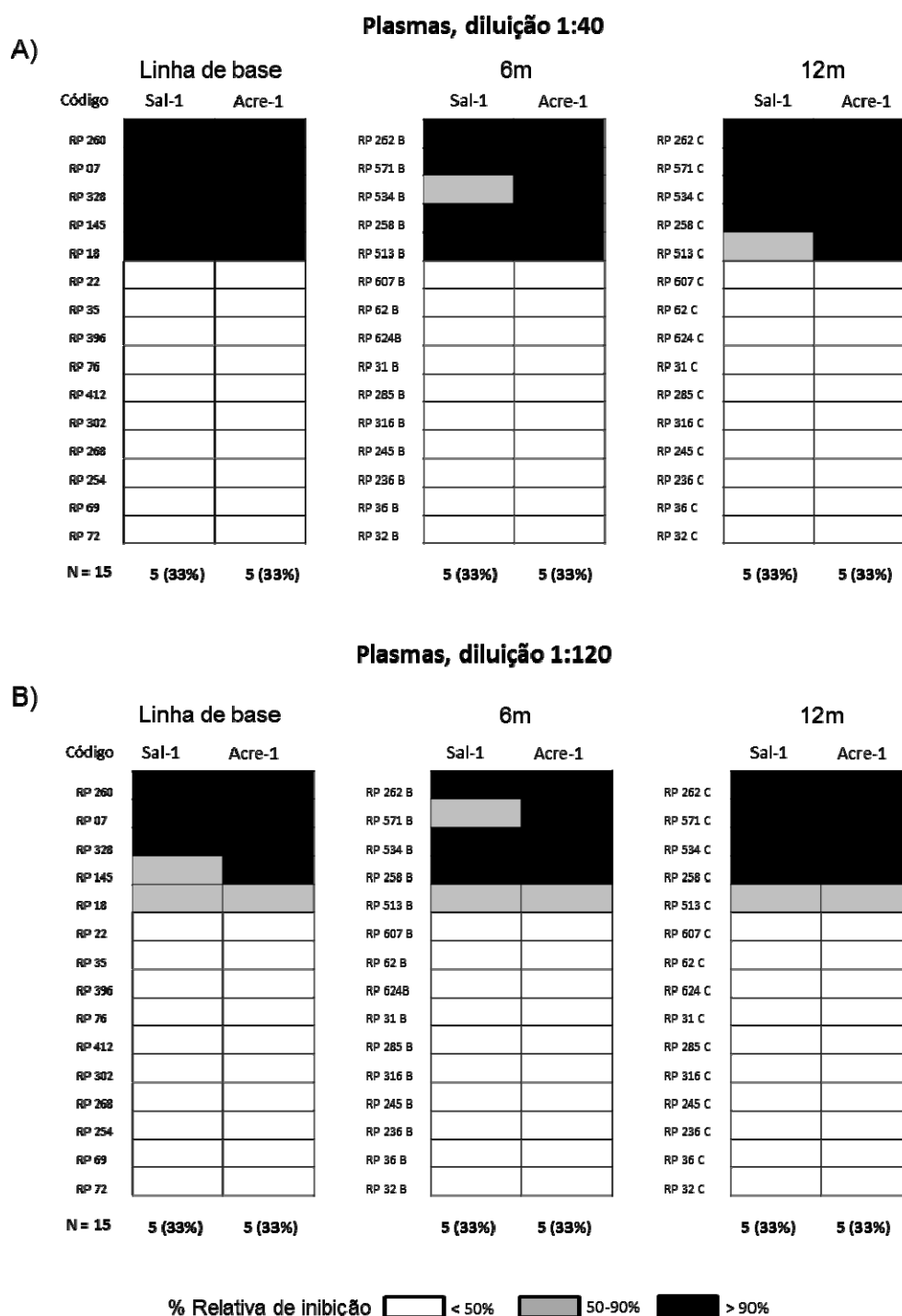


Figura 15 - Resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} em ensaios funcionais utilizados duas variantes (Acre-1 e Sal-1) encontradas no Brasil. A resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} foi avaliada nos três cortes consecutivos (linha de base, 6 e 12 meses depois). As amostras foram testadas na diluição 1:40 (A) e 1:120 (B) sendo considerados positivos indivíduos com porcentagem relativa de inibição ≥ 50%. Os códigos à esquerda representam o plasma de cada indivíduo.

5.4.2 Influência da expressão de DARC dos eritrócitos na interação PvDBP_{II}-DARC *in vitro*

Recentemente, foi sugerido que os eritrócitos podem se aderir à PvDBP em intensidades diferentes em função da expressão do DARC (King *et al.*, 2011). Assim, em um primeiro momento, fez-se necessário padronizar o genótipo DARC dos eritrócitos a serem utilizados nos ensaios funcionais. Para isto, analisamos a capacidade de adesão da PvDBP_{II} em eritrócitos expressando diferentes antígenos DARC.

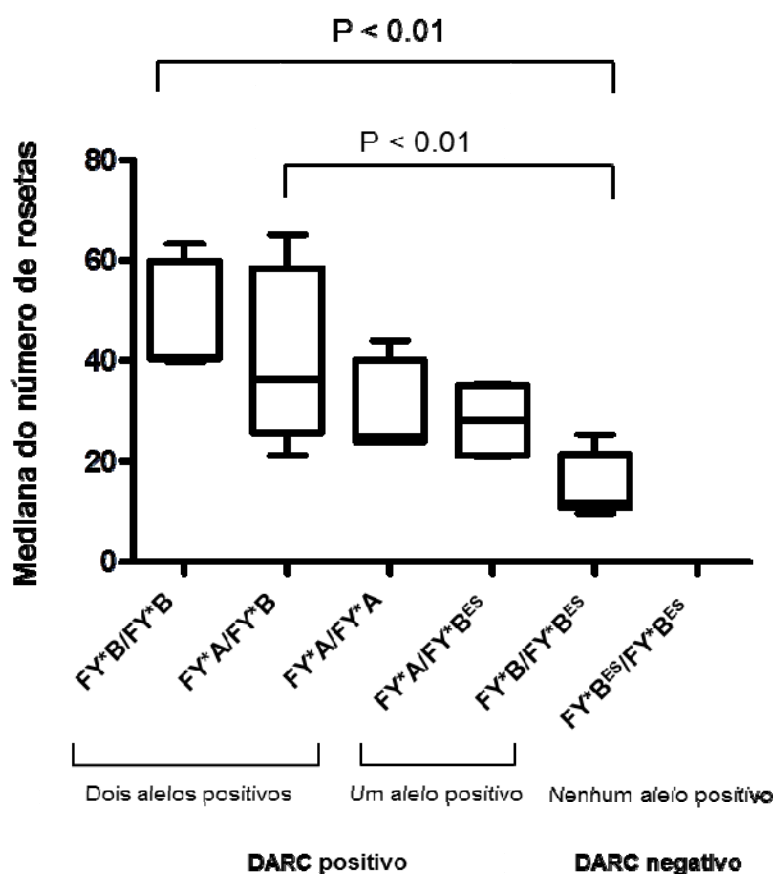


Figura 16 - Células COS-7 transfectadas com plasmídeo que contém o gene que codifica a proteína PvDBP_{II} incubadas com eritrócitos de indivíduos carreadores de diferentes genótipos de DARC. Os resultados estão representados como mediana do número de rosetas detectadas nos ensaios funcionais (5 - 10 amostras por genótipo), como descrito no material e métodos. Box-plots: linha contínua no interior da caixa representa a mediana do número de rosetas, a linha contínua na parte inferior e superior representam os percentis 25 e 75 respectivamente e as linhas verticais representam a variação. Ensaios utilizando eritrócitos DARC negativos foram realizados como controle negativo; foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre FY^*B/FY^*B e FY^*B/FY^*B^{ES} e entre FY^*A/FY^*B e FY^*B/FY^*B^{ES} ($p < 0,01$ determinado por Kruskal-Wallis com teste Dunn como teste *post hoc*).

Os resultados demonstrados na **Figura 16** confirmaram uma menor interação PvDBP-DARC em eritrócitos que expressavam um alelo funcional (FY^*B/FY^*B^{ES} e FY^*A/FY^*B^{ES}) quando comparados com eritrócitos que expressavam dois alelos funcionais (FY^*A/FY^*A , FY^*B/FY^*B , FY^*A/FY^*B). Por outro lado,

como esperado, os eritrócitos DARC negativos não formaram rosetas (controle negativo). Visando a padronização do ensaio funcional, optou-se por utilizar em nossos ensaios apenas eritrócitos *FY*A/FY*B*, pois (1) expressam ambos os antígenos Fya e Fyb na superfície dos eritrócitos, e (2) foi o genótipo mais frequente na população de estudo.

5.4.3 Influência do genótipo de DARC na resposta de anticorpos inibitórios

Uma vez padronizado o genótipo dos eritrócitos a serem utilizados nos ensaios funcionais, avaliou-se a influência do genótipo de DARC na resposta de anticorpos bloqueadores da interação PvDBP-DARC. Devido à complexidade da realização dos ensaios funcionais, o que inviabilizaria a realização destes ensaios com todas as amostras estudadas, optou-se por selecionar uma amostra representativa da população de estudo. Para isso, selecionou-se 270 amostras de plasma correspondentes a 90 indivíduos carreadores de diferentes genótipos de DARC (16-23 indivíduos por genótipo), pareadas de acordo com as variáveis de confusão (idade, gênero, exposição à malária, local de residência). Como o número de indivíduos DARC negativos foi muito pequeno, foram incluídas no estudo, todas as amostras de plasma referentes a estes indivíduos ($n = 21$). Estas amostras foram utilizadas como um controle negativo, e, como esperado, os indivíduos DARC negativos não apresentaram anticorpos inibitórios anti-PvDBP (**Figura 17A**).

Os resultados permitiram mostrar, pela primeira vez, uma menor frequência de resposta de anticorpos inibitórios em indivíduos carreadores de dois alelos DARC positivos, quando comparado a indivíduos carreadores de um único alelo DARC positivo. Verificou-se, ainda, que o perfil da resposta de anticorpos funcionais anti-PvDBP_{II} foi semelhante em todos os cortes do estudo (**Figura 17A**). Em análises subsequentes, avaliou-se a influência do genótipo DARC na persistência da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}. Para isto, os indivíduos foram classificados de acordo com o seu perfil de resposta observado ao longo do estudo, isto é, (i) não respondedores (NR), indivíduos que não apresentaram anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} em nenhum momento do estudo (linha de base, 6 e 12 meses); (ii) temporariamente respondedores (TR), indivíduos que apresentaram estes anticorpos em pelo menos um momento do estudo; ou (iii) persistentemente respondedores (PR), indivíduos positivos nos três cortes. De interesse, a persistência de resposta de anticorpos inibitórios foi mais frequentemente associada aos genótipos com apenas um alelo DARC positivo ($p = 0,0027$, teste $Z = 3,002$) (**Figura 17B**).

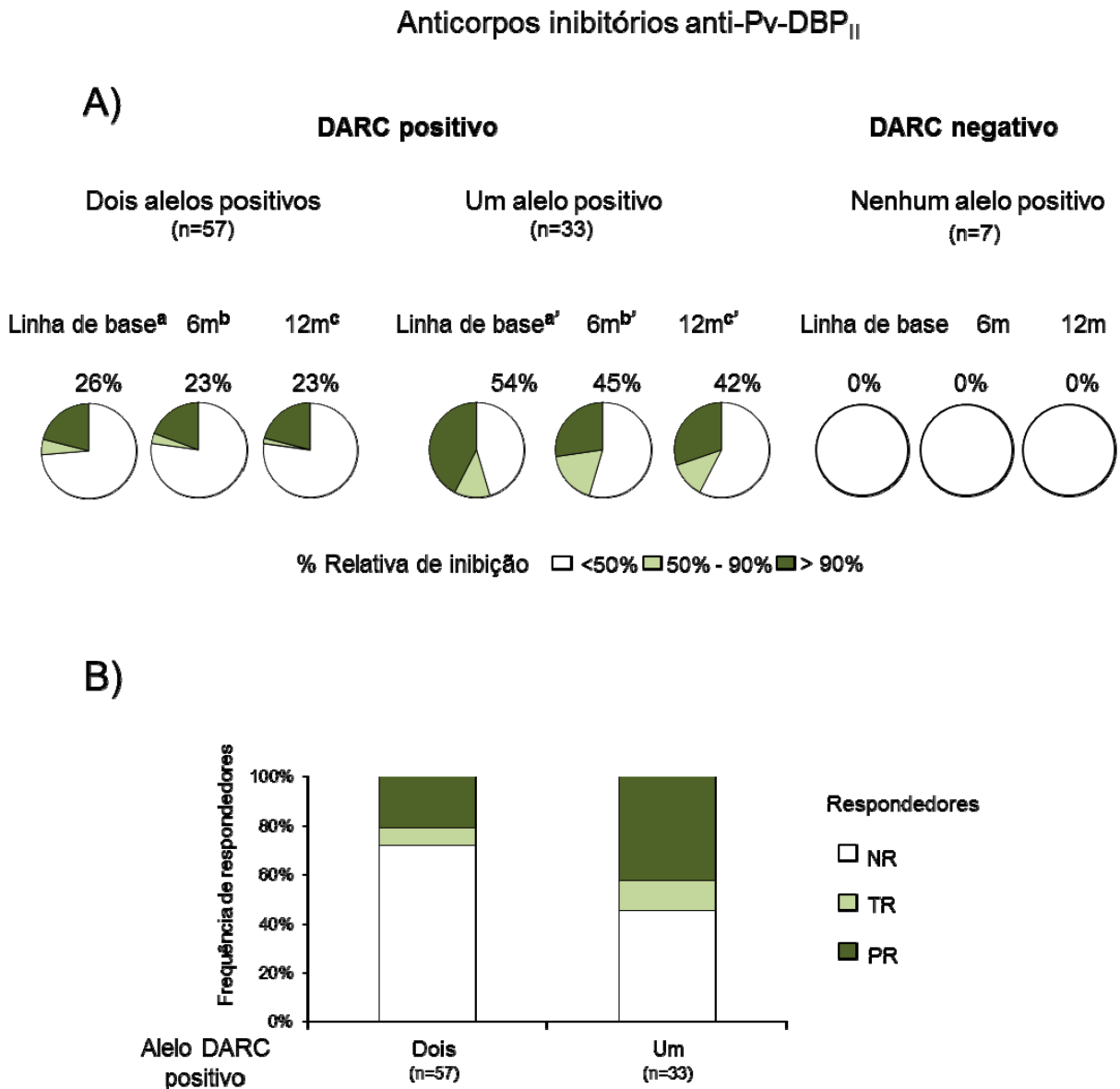


Figura 17 - Anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} avaliados entre indivíduos carreadores de dois alelos DARC positivos (FY^*A/FY^*A , FY^*A/FY^*B , FY^*B/FY^*B), um alelo DARC positivo (FY^*A/FY^*B^{ES} , FY^*B/FY^*B^{ES}) e nenhum alelo DARC positivo (FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES} , DARC negativo). **A)** frequência de anticorpos inibitórios, durante os três cortes (linha de base, 6 e 12 meses). As frequências foram significativamente menores entre os indivíduos carreadores de dois alelos DARC positivos quando comparado com aqueles com apenas um alelo (diferenças significativas entre **a** e **a'**; **b** e **b'**; **c** e **c'**, $p < 0.05$, determinados pelo teste Z). Amostras de plasma de indivíduos DARC negativos foram usadas como controle negativo; **B)** Persistência da resposta de anticorpos em indivíduos DARC positivos (12 meses de acompanhamento). Baseado na resposta de anticorpos os indivíduos foram classificados como não respondedores (NR, nenhuma resposta de anticorpos inibitórios detectada no estudo), temporariamente respondedores (TR, anticorpos inibitórios em pelo menos um corte) ou persistentemente respondedores (PR, resposta de anticorpos inibitórios em todos os três cortes do estudo). Anticorpos inibitórios foram detectados em ensaios funcionais (como descrito no material e métodos) e as amostras foram testadas na diluição 1:40, sendo considerados positivos indivíduos com porcentagem relativa de inibição $\geq 50\%$.

Visto que uma maior resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} inibitórios foi observada entre os indivíduos que apresentavam um único alelo DARC positivo, o próximo passo foi investigar se um genótipo específico era responsável por esta diferença. Foi observado que os indivíduos que expressam os alelos *FY*A* e *FY*B* em homozigose apresentavam uma menor frequência de resposta de anticorpos inibitórios quando comparados com aqueles indivíduos que expressavam esses alelos em heterozigose para a mutação GATA (*FY*A/FY*B^{ES}* e *FY*B/FY*B^{ES}*) (Figura 18). Indivíduos que tinham esses alelos em heterozigose (*FY*A/FY*B*) apresentaram uma frequência de resposta inibitória intermediária. De grande interesse, estes perfis de resposta se mantiveram estáveis ao longo do tempo (12 meses).

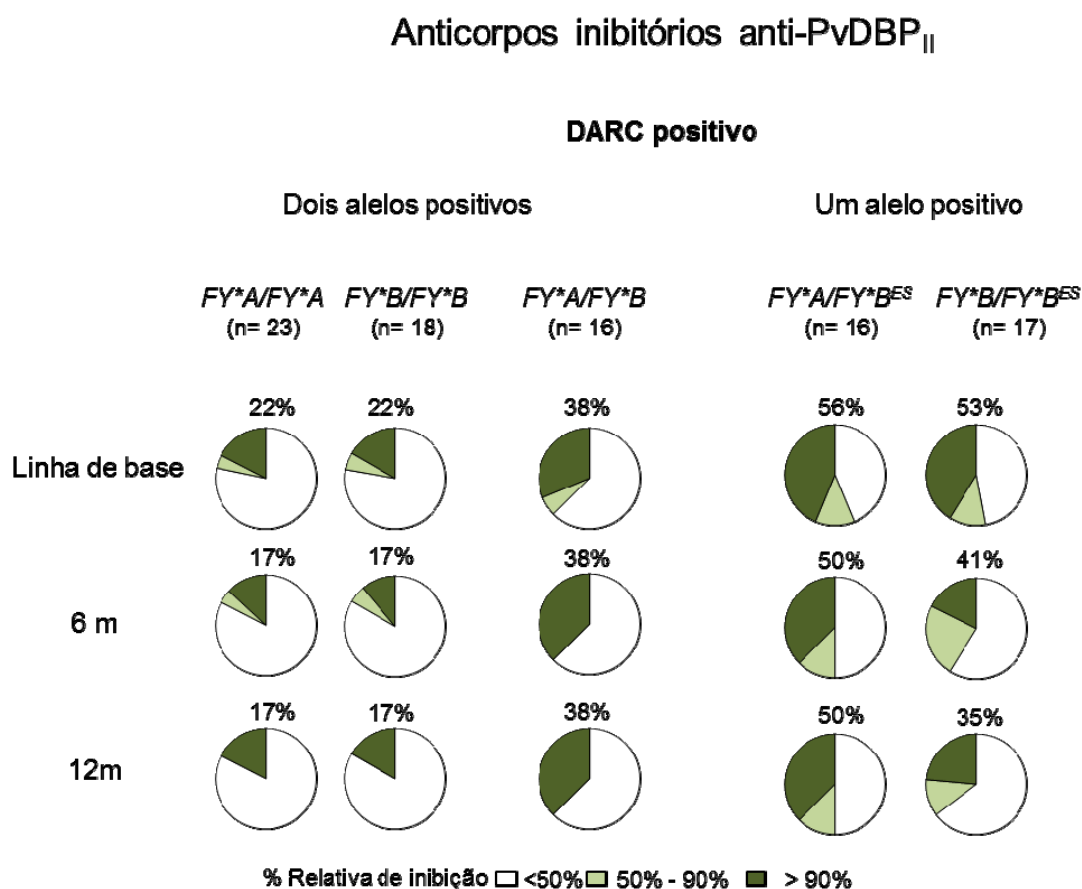


Figura 18 - Os alelos *FY*A* e *FY*B* em homozigose estão associados a baixas frequências de anticorpos funcionais anti-PvDBP_{II}. As amostras foram agrupadas de acordo com o genótipo de DARC do indivíduo. A resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} foi avaliada nos três cortes consecutivos (linha de base, 6 e 12 meses depois). As amostras foram testadas na diluição 1:40, sendo considerados positivos indivíduos com porcentagem relativa de inibição $\geq 50\%$.

5.4.4 Ensaios funcionais utilizando eritrócitos e plasmas homólogos

Como foi verificada uma menor resposta de anticorpos inibitórios em amostras de plasmas de indivíduos homocigotos que apresentavam dois alelos DARC positivos (genótipos FY^*A/FY^*A , FY^*B/FY^*B), em uma próxima etapa, pretendeu-se avaliar se o perfil desta resposta inibitória se mantinha quando essas amostras fossem submetidas a ensaios funcionais utilizando eritrócitos homólogos ou heterólogos. A **Figura 19** representa um esquema de como foram realizados estes ensaios.

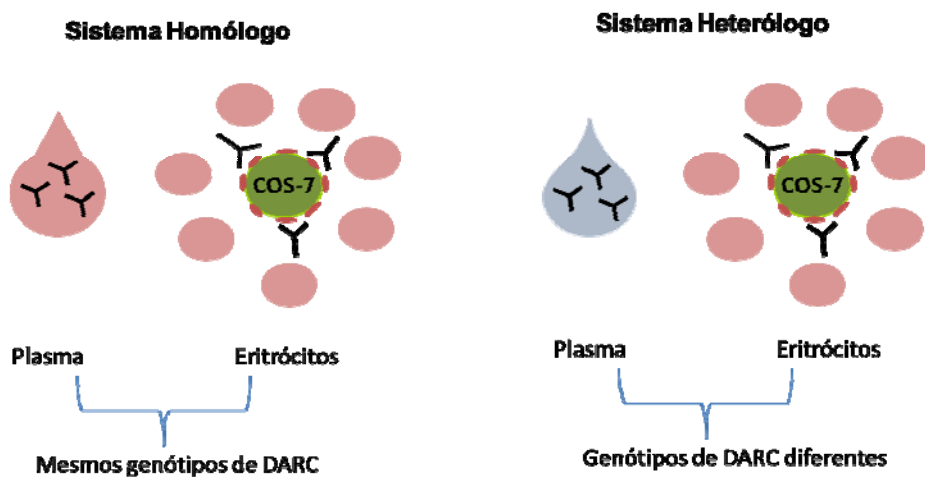


Figura 19 - Representação esquemática dos sistemas homólogo e heterólogo utilizados nos ensaios funcionais.

Para isso, foram selecionados plasmas de indivíduos por genótipo de DARC para serem submetidos aos ensaios funcionais utilizando-se eritrócitos homólogos ou heterólogos.

Os resultados mostraram que o perfil de resposta de anticorpos detectados nos ensaios funcionais se manteve o mesmo independentemente do genótipo de DARC do eritrócito utilizado no ensaio funcional, ou seja, indivíduos respondedores continuaram sendo respondedores independente do eritrócito utilizado. Por outro lado, indivíduos não respondedores continuaram com o mesmo perfil nos ensaios utilizando eritrócitos homólogos ou heterólogos. A **Figura 20** ilustra o resultado de experimentos com plasma de 5 a 6 indivíduos carreadores dos alelos FY^*B e FY^*A em homocigose ou heterocigose.

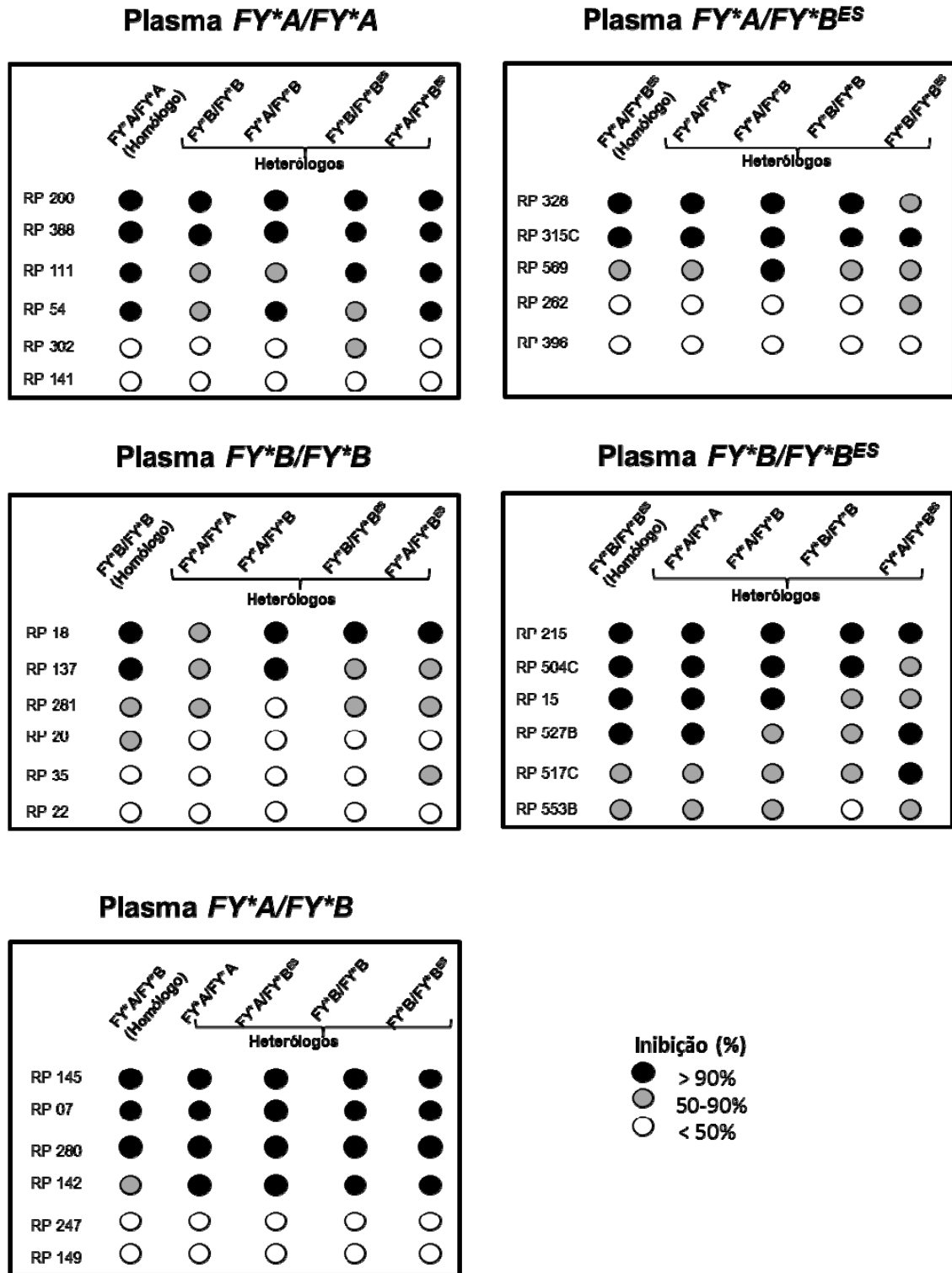


Figura 20 – Frequência de resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} em sistemas homólogos e heterólogos. Plasmas de indivíduos carreadores de diferentes genótipos de DARC (FY^*A/FY^*A , FY^*B/FY^*B , FY^*A/FY^*B , FY^*A/FY^*B^{ES} e FY^*B/FY^*B^{ES}) foram testados em ensaios funcionais utilizando eritrócitos que expressavam genótipos homólogos ou genótipos heterólogos. Os resultados estão expressos como porcentagem de inibição quando comparados com controles negativos (soro de indivíduos não expostos à malária com o mesmo genótipo de DARC da amostra testada). As amostras foram testadas na diluição de 1:40.

5.5 Distribuição de frequência dos alelos do Sistema HLA classe II na população estudada

As frequências alélicas do HLA de classe II da população de Rio Pardo estão sumarizadas na **Figura 21**. Como esperado, o HLA-DRB1 foi o *loci* mais polimórfico com 49 alelos encontrados. Neste *loci*, os alelos mais frequentes (acima de 2%) foram HLA-DRB1*07:01 (n = 70, 10,60%) seguido do alelo HLA-DRB1*03:01 (n = 38, 5,82%) (**Figura 21A**).

Em relação ao *loci* HLA-DQB1, foram encontrados 21 alelos, sendo que os alelos mais frequentes foram HLA-DQB1*03:01 (n = 146, 21,53%) e HLA-DQB1*03:02 (n = 100, 14,90%) respectivamente (**Figura 21 B**). Por outro lado, para o *loci* HLA-DQA1 os alelos HLA-DQA1*03:01 (n = 122, 18,14%) e HLA-DQA1*05:05 (n = 94, 13,72%) foram os mais frequentes entre os 13 alelos identificados (**Figura 21C**).

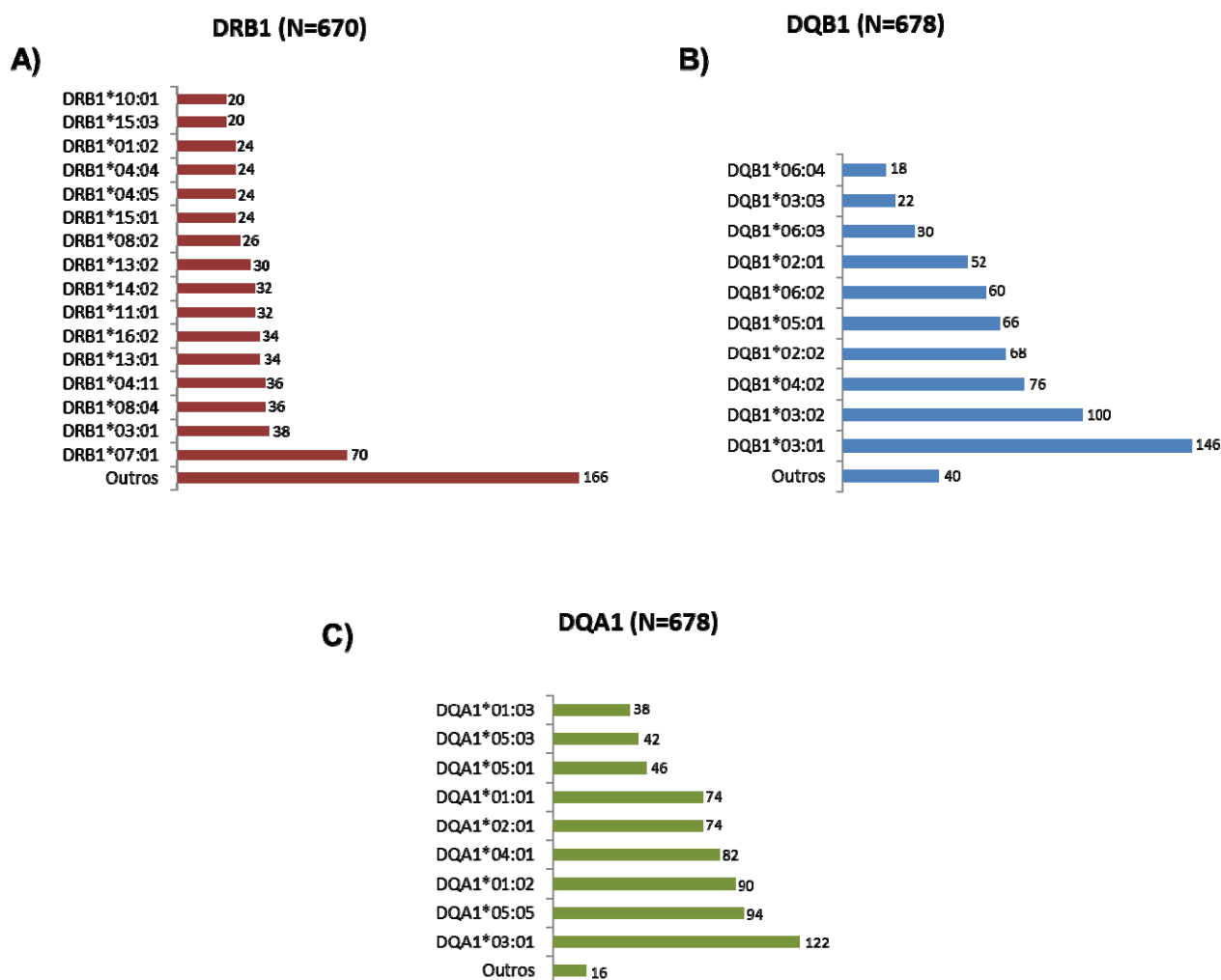


Figura 21 - Frequência alélica de HLA classe II na população estudada de Rio Pardo. Estão representados os alelos mais frequentes na população estudada (frequências acima de 2%). Frequência dos alelos referentes ao *loci* HLA-DRB1 (**A**); *loci* HLA-DQB1 (**B**) *loci* HLA-DQA1 (**C**). Nomenclatura apresentada segundo Marsh e colaboradores (2010).

5.6 Influência dos alelos de HLA classe II na resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados no ELISA.

Uma possível associação entre alelos de HLA de classe II com a resposta de anticorpos anti-PvDBP foi avaliada tanto para a região do ligante (região II - PvDBP_{II}), quanto para uma porção maior da proteína (região II-IV - PvDBP_{II-IV}).

Inicialmente, foi feita uma análise para avaliar se a probabilidade do indivíduo responder à PvDBP no ELISA estava associada a algum alelo específico de HLA classe II. Para tal, os indivíduos foram estratificados em dois grupos: indivíduos que não respondem à PvDBP e indivíduos que respondem a esta proteína. Foi observado uma maior chance de resposta de anticorpos contra a proteína PvDBP_{II} (**Tabela 3**) ou a qualquer uma das proteínas (PvDBP_{II} e PvDBP_{II-IV}) (**Tabela 4**) em indivíduos carreadores dos alelos HLA-DQB1*02:02 e HLA-DQA1*01:03. Em contrapartida, os indivíduos carreadores dos alelos HLA-DRB1*10:01 e HLA-DRB*14:02 tiveram uma chance reduzida de ter anticorpos contra a PvDBP_{II} (OR = 0.020 e 0,022, respectivamente) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} no ELISA

Alelos	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQB1*02:02	0.019	2.27	1.14-4.51
DQA1*01:03	0.026	2.83	1.14-7.06
DRB1*10:01	0.040	0.020	0.04-0.93
DRB1*14:02	0.022	0.022	0.06-0.080

OR: razão de chance (*odds ratio*); a OR foi calculada comparando indivíduos respondedores com indivíduos não respondedores, através da Regressão Logística (Transversal).

I.C.: Intervalo de confiança

Além destes, outros dois alelos de HLA classe II parecem influenciar positivamente na resposta de anticorpos contra pelo menos uma das proteínas (PvDBP_{II} e PvDBP_{II-IV}) em indivíduos carreadores dos alelos HLA-DQB1*03:02 e HLA-DRB1*13:02 (OR 1,81 e 1,93 respectivamente) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} e/ou anti-PvDBP_{II-IV} no ELISA

Alelos	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQB1*02:02	0,007	1.97	1.20-3.23
DQA1*01:03	0,007	2.44	1.27-4.69
DQB1*03:02	0,009	1.81	1.16-2.85
DRB1*13:02	0,054	1.93	0.99-3.77

OR: razão de chance (*odds ratio*); a OR foi calculada comparando indivíduos respondedores com indivíduos não respondedores, através da Regressão Logística (Transversal)

I.C.: Intervalo de confiança

Uma vez que foi observado que a resposta de anticorpos anti-PvDBP pode ser influenciada por determinados alelos de HLA classe II, em um segundo momento, avaliou-se se esses alelos influenciavam na persistência de resposta de anticorpos. Para tais análises, o grupo de respondedores foi subdividido em temporariamente respondedores (TR) e persistentemente respondedores (PR) (conforme definido no item 5.4.3).

Os dados confirmaram que os mesmos alelos de HLA previamente identificados (HLA-DQB1*02:02 e HLA-DQA1*01:03) estavam associados a uma maior chance de resposta de anticorpos, seja no grupo dos temporariamente respondedores (HLA-DQB1*02:02, OR = 3,09) ou dos persistentemente respondedores (HLA-DQA1*01:03, OR = 3,65) (**Tabela 5**). De relevância, em análises posteriores, onde comparou-se a resposta a qualquer uma das proteínas (PvDBP_{II} e PvDBP_{II-IV}), estes mesmos alelos também estavam associados à presença de resposta de anticorpos (**Tabela 6**).

Tabela 5. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} no ELISA

Alelos	TR			PR		
	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQA1*01:03	0,936	1,07	0,21-5,41	0,006	3,65	1,44-9,23
DQB1*02:02	0,014	3,09	1,26-7,60	0,085	1,95	0,91-4,15

OR: razão de chance (*odds ratio*); a OR foi calculada comparando os grupos temporariamente respondedores (TR) e persistentemente respondedores (PR) com aqueles não respondedores (NR), através da Regressão Multinomial Logística (Transversal) I.C.: Intervalo de confiança

Nessas análises, foi possível identificar mais três alelos de HLA classe II que influenciaram negativamente na resposta de anticorpos contra pelo menos uma das proteínas (PvDBP_{II} e PvDBP_{II-IV}) (HLA-DRB1*14:02, HLA-DQA1*05:01 e HLA-DRB1*10:01) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} e/ou anti-PvDBP_{II-IV} no ELISA.

Alelos	TR			PR		
	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQA1*01:03	0,533	1,28	0,59-2,77	0,010	2,55	1,25-5,22
DQB1*02:02	0,274	1,38	0,78-2,44	0,006	2,22	1,25-3,93
DRB1*14:02	0,558	0,80	0,38-1,68	0,033	0,33	0,12-0,91
DQA1*05:01	0,118	0,58	0,29-1,15	0,012	0,35	0,15-0,79
DRB1*10:01	0,304	0,63	0,26-1,52	0,031	0,25	0,07-0,88

OR: Razão de chance (*odds ratio*); a OR foi calculada comparando os grupos TR e PR com aqueles não respondedores (NR), através da Regressão Multinomial Logística (Transversal)
I.C.: Intervalo de confiança

Como nas análises iniciais realizadas entre HLA e resposta de anticorpos (**Tabelas 4 a 6**), os indivíduos foram categorizados em grupos (delineamento transversal), fez-se necessário a análise longitudinal dos dados (regressão marginal logística). De acordo com os resultados destas análises, foi possível demonstrar, mais uma vez, que os dois alelos previamente identificados nas análises transversais estavam associados a uma maior tendência de adquirir anticorpos contra a PvDBP; seja contra a PvDBP_{II} (**Tabela 7**), seja contra a PvDBP_{II-IV} (**Tabela 8**) ou a qualquer uma das proteínas (**Tabela 9**).

Outros dois alelos de HLA de classe II influenciaram na resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II}, seja positivamente (HLA-DRB1*04:11), ou negativamente (HLA-DRB1*16:02) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Alelos de HLA de classe II que influenciam na aquisição ou não da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} no ELISA

Alelos	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQA1*01:03	0,004	2,82	1,38-5,76
DRB1*04:11	0,033	2,21	1,07-4,57
DRB1*16:02	0,025	0,38	0,16-0,88

OR: razão de chance (*odds ratio*); OR foi calculada comparando indivíduos respondedores com aqueles não respondedores (independente de terem uma ou mais de uma amostra coletada durante o estudo), através da Regressão Marginal Logística (Longitudinal).

I.C.: Intervalo de confiança

Em relação à PvDBP_{II-IV}, outros três alelos de HLA classe II estiveram associados positivamente a resposta de anticorpos contra essa proteína (HLA-DRB1*04:07, HLA-DRB1*04:04 e HLA-DQA1*06:01) (**Tabela 8**), ou contra qualquer uma das proteínas (HLA-DRB1*04:04 e HLA-DRB1*04:07) (**Tabela 9**). Por outro lado, foi observado que indivíduos carreadores do alelo HLA-DQB1*05:02 tiveram uma chance reduzida de ter anticorpos contra a PvDBP_{II-IV} (**Tabela 8**).

Tabela 8. Alelos de HLA de classe II que influenciam na aquisição ou não da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} no ELISA ao longo do estudo.

Alelos	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQB1*02:02	0,039	1,67	1,03-2,73
DRB1*04:07	0,005	16,1	2,4-10,0
DRB1*04:04	0,048	2,07	1,01-4,25
DQA1*06:01	0,001	4,99	1,99-12,5
DQB1*05:02	0,016	0,26	0,09-0,78

OR: razão de chance (*odds ratio*); OR foi calculada comparando indivíduos respondedores com aqueles não respondedores, classificados ao longo da coorte, através da Regressão Marginal Logística (Longitudinal).

I.C.: Intervalo de confiança

Além disso, outros dois alelos de HLA de classe II parecem influenciar na resposta de anticorpos a pelo menos uma das proteínas (PvDBP_{II} e PvDBP_{II-IV}) positivamente (HLA- DQA1*05:02) ou negativamente (HLA- DQA1*05:01) (**Tabela 9**). De interesse, este último alelo também esteve associado à resposta contra a PvDBP_{II-IV} ou a pelo menos uma das proteínas nos estudos transversais, reforçando a importância deste alelo na resposta imune contra a PvDBP.

Tabela 9. Alelos de HLA de classe II que influenciam na aquisição ou não da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} e anti-PvDBP_{II-IV} no ELISA ao longo do estudo

Alelos	Valor-p	OR	I.C. - 95%
DQA1*01:03	0,009	1,87	1,17-3,01
DQA1*05:02	0,002	14,6	2,60-82,4
DQB1*02:02	0,002	1,77	1,23-2,55
DRB1*04:07	0,013	4,27	1,35-13,5
DRB1*04:04	0,029	1,97	1,07-3,63
DQA1*05:01	0,033	0,59	0,36-0,96

OR: razão de chance (*odds ratio*); OR foi calculada comparando indivíduos respondedores com aqueles não respondedores (independente de terem uma ou mais de uma amostra coletada durante o estudo), através da Regressão Marginal Logística (Longitudinal).

I.C.: Intervalo de confiança

5.7 Influência dos alelos do HLA classe II na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}.

A próxima etapa do nosso estudo foi avaliar se a probabilidade do indivíduo apresentar anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} era maior ou menor em indivíduos carreadores de algum alelo específico de HLA classe II. Para isso, inicialmente foi realizada uma análise de tipo transversal comparando-se dois grupos: indivíduos que não apresentavam anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} e indivíduos que apresentavam esses anticorpos (respondedores).

Interessantemente, foi observado através da análise univariada que o alelo HLA-DQB1*02:02 parece influenciar positivamente na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}. Novamente, reforçando a importância deste alelo na resposta de anticorpos anti-PvDBP, visto que este alelo foi também associado à resposta de anticorpos no ELISA, tanto nas análises transversais quanto na longitudinal.

Por outro lado, quando os indivíduos respondedores foram estratificados em temporariamente ou persistentemente respondedores, novas associações foram identificadas. Foi observado que indivíduos que apresentam os alelos HLA-DQA1*02:01 e HLA-DRB1*07:01, tiveram uma probabilidade maior de apresentar anticorpos inibitórios, tanto de curta quanto de longa duração (temporariamente e

persistentemente respondedores, respectivamente), enquanto que o alelo HLA-DQB1*03:03 esteve associado a resposta de anticorpos inibitórios particularmente de curta duração (**Tabela 10**).

Tabela 10. Alelos que influenciam na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} comparando os grupos NR, TR e PR

Alelos	TR			PR		
	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DQA*02:01	0,010	2,01	1,18-3,42	0,014	1,71	1,11-2,62
DQB*03:03	0,050	4,70	1,00-22,1	0,551	1,62	0,33-7,88
DRB*07:01	0,010	2,01	1,18-3,42	0,014	1,71	1,11-2,62

OR: razão de chance (*odds ratio*); a OR foi calculada comparando-se os grupos TR e PR com aqueles não respondedores (NR), através da Regressão Multinomial Logística (Transversal)

I.C.: Intervalo de confiança

Finalmente foi realizada a análise do tipo longitudinal para avaliar se os alelos de HLA classe II estavam associados a uma maior ou menor tendência de aquisição de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} ao longo do tempo. Foi observado que o alelo HLA-DQA1*02:01 parece influenciar na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} positivamente (OR = 2,56) e o alelo HLA-DRB1*16:02, negativamente (OR = 0,09) (**Tabela 11**).

Tabela 11. Alelos que influenciam longitudinalmente na aquisição da resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}

Alelos	Valor- <i>p</i>	OR	I.C. - 95%
DRB*16:02	0,025	0,09	0,01-0,75
DQA*02:01	0,007	2,56	1,29-5,07

OR: razão de chance (*odds ratio*); OR foi calculada comparando-se indivíduos respondedores com aqueles não respondedores, através da Regressão Marginal Logística (Longitudinal).

I.C.: Intervalo de confiança

6 DISCUSSÃO

Em geral, as populações que vivem na Amazônia brasileira são consideradas susceptíveis a malária, embora possuam diferentes níveis de imunidade adquirida (da Silva-Nunes *et al.*, 2008; Ladeia-Andrade *et al.*, 2009). Estudos que investigam o reconhecimento da PvDBP por anticorpos naturalmente adquiridos têm sido conduzidos tanto em regiões altamente endêmicas (Michon *et al.*, 2000; King *et al.*, 2008) quanto em regiões de média a baixa endemicidade para malária (Cerávolo *et al.*, 2005; Cerávolo *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010). Estes estudos demonstraram que uma proporção significativa de indivíduos expostos à malária não desenvolve anticorpos IgG anti-PvDBP. Muitos fatores podem contribuir para a baixa imunogenicidade da PvDBP, dentre estes podemos considerar fatores do parasito, tais como exposição limitada da PvDBP ao sistema imune e polimorfismos genéticos (Souza-Silva *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011). Entretanto, essas características do parasito não explicam o fato de que a maioria dos indivíduos expostos a diferentes variantes do parasito, por um longo período de tempo, não são capazes de desenvolver anticorpos funcionais. Assim, fatores genéticos do hospedeiro também poderiam contribuir para essa diferença na resposta imune contra a PvDBP. Dentre estes fatores, o presente trabalho investigou se polimorfismos do receptor DARC e do sistema HLA poderiam influenciar nesta resposta imune específica.

6.1 Distribuição dos genótipos de DARC na população de estudo

A distribuição dos genótipos do DARC na população estudada, Rio Pardo/AM, foi consistente com a heterogeneidade da origem étnica da população amazônica brasileira, com uma mistura de nativos americanos (ameríndios), europeus e africanos (Perna *et al.*, 2007; Palha *et al.*, 2010). No presente estudo, o genótipo FY*A/FY*B foi o mais frequente. De fato, este genótipo tem sido descrito como o mais frequente na maior parte dos estudos realizados na Amazônia brasileira (Cavasini *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2010; King *et al.*, 2011) ainda que realizados em populações migrantes. Como esperado, o genótipo $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$, que caracteriza o fenótipo DARC negativo, estava frequente na população estudada, porém em baixa proporção. Esse achado é consistente com o que tem sido descrito para a população da Amazônia brasileira, e difere apenas do estudo realizado por Perna e colaboradores (2007), em comunidades amazônicas descendentes de escravos africanos; naquele estudo, a maior parte dos indivíduos carregavam o genótipo DARC negativo. Com relação à América Latina, basicamente dois estudos foram realizados a fim de descrever a distribuição do genótipo de DARC nesta região. Nestes estudos, realizados na Argentina e na Colômbia, a distribuição do genótipo DARC foi heterogênea e consistente com o perfil histórico de colonização dessas regiões. Na Argentina, o genótipo $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$ estava ausente, enquanto na Costa

Pacífica da Colômbia o genótipo $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$ foi o mais frequente. Esses achados corroboram com o *background* genético daquelas populações, onde os argentinos possuem componentes genéticos principalmente de europeus, já os colombianos (Costa pacífica) carregam componentes genéticos ligados à população africana (Michon *et al.*, 1998). De fato, estudos da distribuição geográfica mundial do receptor DARC demonstram que o alelo negativo tem origem no continente africano, já o alelo positivo de DARC tem origem no continente europeu e americano (Howes *et al.*, 2011). Em resumo, o presente estudo caracterizou a distribuição de DARC na população de estudo – área de assentamento agrícola - e esta distribuição foi consistente com outros estudos realizados em regiões semelhantes. Além disso, este estudo corrobora com os estudos de distribuição mundial deste receptor que caracteriza as Américas e a Europa com a presença principalmente dos genótipos positivos de DARC e o continente Africano com a presença principalmente de alelos negativos de DARC.

6.2 Avaliação longitudinal da resposta de anticorpos anti-PvDBP (ELISA) na população de Rio Pardo

A PvDBP é o ligante do parasito responsável pela interação com o receptor DARC dos eritrócitos. Devido à importância funcional desta proteína e o fato de que a associação entre a expressão de DARC e a resposta imune ser pouco explorada (Herrera *et al.*, 2005; Maestre *et al.*, 2010), avaliou-se aqui a influência do genótipo de DARC na resposta de anticorpos anti-PvDBP. O trabalho foi possível graças a um estudo inicial do nosso grupo que caracterizou a população de Rio Pardo/AM quanto a aspectos demográficos, epidemiológicos e de infecção malárica (Kano *et al.*, 2012). Inicialmente avaliou-se o perfil da resposta de anticorpos ao longo do estudo (12 meses de acompanhamento). Observou-se que na linha de base, 32% dos indivíduos incluídos no estudo apresentavam anticorpos IgG contra a região do ligante (PvDBP_{II}) detectados pela sorologia convencional (ELISA), e, como esperado, detectou-se uma maior frequência de anticorpos IgG (50%) quando se empregou uma proteína correspondente a região II-IV (PvDBP_{II-IV}). Apesar de observarmos uma maior frequência de anticorpos contra a PvDBP_{II-IV}, a magnitude da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} foi significativamente maior, sendo observados um maior número de indivíduos classificados como alto respondedores (IR > 4). Provavelmente isto pode ser explicado pela maior concentração de epítomos dominantes de células B sobre a região II (Xainli *et al.*, 2002; Cole-Tobian *et al.*, 2003).

No presente estudo, foi feito um acompanhamento da população por 12 meses, sendo observado que a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} flutuou de acordo com a estação do ano e o índice pluviométrico, enquanto que a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} se manteve estável durante todo o ano. Em um estudo anterior do nosso grupo realizado na Amazônia brasileira (Souza-Silva *et al.*, 2010), foi demonstrado que apenas cerca de 20% da população desenvolveu anticorpos anti-PvDBP_{II-IV} e além disso, essa resposta foi de

curta duração. Entretanto, a população incluída naquele estudo consistia, principalmente, de migrantes originados de áreas do Brasil onde a malária não é endêmica. Por outro lado, a população aqui estudada é nativa da Amazônia brasileira, o que justifica uma maior frequência de anticorpos (~50%). De fato, nesta área a idade corresponde ao tempo de exposição do indivíduo (Kano *et al.*, 2012). Resultados semelhantes ao estudo aqui realizado foram encontrados em crianças assintomáticas de áreas hiperendêmicas de malária (King *et al.*, 2008), onde a maior parte das crianças com até nove anos de idade já apresentavam anticorpos no ELISA.

6.3 Genótipos de DARC e a resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados pelo ELISA

Sabe-se que indivíduos DARC negativos são altamente resistentes à infecção pelo *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976), e, em geral estes indivíduos apresentam baixos níveis de anticorpos contra antígenos de fase eritrocítica do *P. vivax* (Herrera *et al.*, 2005). Diante disso, no presente estudo, estávamos interessados em avaliar a influência de alelos DARC positivos (FY^*A e FY^*B) na aquisição de resposta imune à PvDBP. A frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP detectada pela sorologia convencional foi muito semelhante nos indivíduos que apresentavam um (FY^*A/FY^*B^{ES} e FY^*B/FY^*B^{ES}) ou dois alelos DARC positivos (FY^*A/FY^*A , FY^*B/FY^*B e FY^*A/FY^*B). Apesar disso, foi observada uma tendência moderada de maiores níveis de anticorpos IgG anti-PvDBP_{II} entre os indivíduos carreadores de um único alelo DARC positivo. Entretanto, esta associação só foi significativa em um dos três cortes transversais.

Até o momento, dois estudos avaliaram polimorfismos de DARC na sorologia convencional contra a PvDBP (Maestre *et al.*, 2010; King *et al.*, 2011). Maestre e colaboradores (2010) sugeriram que os doadores colombianos carreadores de um único alelo DARC positivo eram mais propensos a desenvolver anticorpos anti-PvDBP_{II} do que aqueles indivíduos com dois alelos DARC positivos. Infelizmente, naquele estudo um número muito pequeno de indivíduos responderam à PvDBP_{II} (17 de 233 indivíduos, 7,3%); conseqüentemente, 17 respondedores foram estratificados pelos autores em 5 genótipos de DARC, o que torna o resultado inconclusivo. Além disso, o estudo de Maestre e colaboradores (2010) foi conduzido em uma região onde a população era, em sua grande maioria, afro-descendentes, portanto, altamente resistentes ao *P. vivax* (DARC negativos). No segundo estudo, King e colaboradores (2011) demonstraram que os genótipos de DARC não influenciavam na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} detectados pelo ELISA. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo. Portanto, o presente estudo permite concluir não haver uma associação clara entre os genótipos de DARC e a resposta imune anti-PvDBP detectados pelo ELISA.

Curiosamente, os resultados sorológicos realizados com a proteína PvDBP_{II-IV} demonstraram uma alta frequência de resposta de anticorpos em indivíduos com o genótipo $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$. O fato de ter sido usado uma proteína recombinante relativamente grande (região II-IV) pode ter contribuído para isso. Corroborando com este achado, quando se utilizou apenas a região do ligante (região II), a resposta de anticorpos foi baixa. Outros autores também verificaram elevada frequência de indivíduos DARC negativos respondedores à PvDBP (Herrera *et al.*, 2005). Até o momento, não existe uma explicação clara para o fato de indivíduos DARC negativos responderem à PvDBP. Entretanto, Herrera e colaboradores (2005) sugerem que indivíduos DARC negativos também estão expostos à infecção por esporozoítos; portanto, eles podem desenvolver a fase pré-eritrocítica do ciclo da malária. Desta forma, alguns merozoítos poderiam alcançar a corrente sanguínea e induzir o ciclo eritrocítico da doença (parasitemia subpatente). Reforça esta hipótese, os achados recentes que demonstraram que indivíduos DARC negativos podem se infectar com *P. vivax* (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2007; Menárd *et al.*, 2010). Embora em indivíduos DARC negativos o processo de invasão dos eritrócitos ainda seja desconhecido, esta segunda rota poderia ser também dependente da PvDBP, o que explicaria o fato de indivíduos DARC negativos desenvolverem resposta de anticorpos contra antígenos de estágio sanguíneo. Estudos futuros fazem-se necessários para esclarecer este mecanismo de resposta de anticorpos anti-PvDBP em indivíduos DARC negativos.

6.4 O genótipo de DARC e a resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP

Apesar da importância da PvDBP como um antígeno candidato a vacina antimalárica, estudos de resposta imune funcional em populações humanas ainda são escassos. Parte da dificuldade se deve a complexidade da realização de ensaios inibitórios, e a necessidade de quantidade significativa de plasma dos indivíduos (~1mL). Neste contexto, este estudo é o primeiro que avalia a influência do receptor DARC na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}.

No presente trabalho, foi possível demonstrar uma menor frequência e intensidade desses anticorpos em indivíduos carreadores de dois alelos funcionais de DARC, especialmente aqueles homocigotos para o alelo $FY*A$ ou alelo $FY*B$. Além disso, a frequência de indivíduos persistentemente respondedores nos ensaios funcionais foi duas vezes menor em indivíduos carreadores de dois alelos DARC positivos, quando comparados com indivíduos carreadores de um único alelo DARC positivo. Estes achados são importantes, já que este é o primeiro estudo que mostra que o polimorfismo de DARC pode influenciar na resposta imune funcional. Apesar disso, neste momento não há uma explicação clara para o fato de que indivíduos portadores de um único alelo DARC positivo apresentam maior frequência de anticorpos inibitórios. Em um estudo realizado anteriormente foi sugerido que o receptor DARC poderia modular a resposta de anticorpos

anti-PvDBP (Maestre *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento, não há nenhuma evidência de que o receptor DARC possa regular de forma indireta a resposta imune humoral contra proteínas de fase eritrocítica do *P. vivax*. Outra explicação poderia estar relacionada à quantidade de antígeno DARC na superfície dos eritrócitos. Neste caso, o baixo nível de expressão de DARC (observado em indivíduos carreadores de um único alelo DARC positivo) poderia dificultar o acesso do merozoíto do *P. vivax* ao receptor DARC, aumentando assim a exposição da PvDBP_{II} ao sistema imune do hospedeiro. Entretanto, o nível de expressão do receptor DARC na superfície do eritrócito não parece ser suficiente para explicar nossos resultados, pois foi descrito que a expressão de DARC é menor em indivíduos com o genótipo FY*B/FY*B do que em FY*A/FY*A (Woolley *et al.*, 2000) e, no nosso estudo, não foi encontrada diferenças significativas entre estes grupos. Portanto, estudos futuros fazem-se necessários para esclarecer o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na resposta imune diferencial entre indivíduos carreadores de diferentes genótipos DARC.

Por último, verificou-se que o perfil de resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} foi estável ao longo dos 12 meses de acompanhamento, independentemente de o indivíduo possuir um ou dois alelos funcionais de DARC. Assim, apesar de poucos indivíduos serem capazes de desenvolver anticorpos bloqueadores da interação PvDBP-DARC, essa resposta uma vez adquirida, permanece estável ao longo do tempo, independentemente do genótipo do receptor DARC. De fato, esta estabilidade da resposta já havia sido demonstrada pelo nosso grupo (Souza-Silva *et al.*, 2010)

Em conjunto, os resultados aqui apresentados demonstraram que apesar do polimorfismo do receptor DARC não influenciar na resposta de anticorpos detectados pela sorologia convencional este polimorfismo interfere na resposta de anticorpos inibitórios contra a PvDBP. Estes achados são relevantes do ponto de vista do desenvolvimento de uma vacina, já que a estabilidade da resposta imune é altamente desejada em ensaios vacinais.

6.5 Distribuição dos alelos de HLA classe II na população de estudo

No presente estudo, foram avaliadas as frequências de alelos do Sistema HLA classe II, mais especificamente dos *loci* HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1.

Com relação ao *loci* HLA-DRB1, nossos resultados revelaram que os alelos HLA-DRB1 07:01 e HLA-DRB1 03:01 foram os mais frequentes na população de estudo. Poucos estudos têm sido realizados para avaliar a frequência dos alelos de HLA no Brasil, e até o momento um único estudo realizado na região nordeste do Brasil demonstrou uma alta frequência destes mesmos alelos (Dellalibera, 2004).

Os alelos mais frequentes para *loci* HLA-DQB1 foram HLA-DQB1 03:01 e HLA-DQB1 03:02 respectivamente. Estes dois alelos já foram descritos como os mais comumente encontrados em populações ameríndias da América do Sul (Tsuneto *et al.*, 2003). Lázaro e colaboradores (1999) demonstraram que estes mesmos alelos eram os mais frequentes em tribos indígenas brasileiras residentes na América do Sul.

Com relação ao *loci* HLA-DQA1, os alelos mais frequentes foram HLA-DQA1 03:01 e HLA-DQA1 05:05. O alelo HLA-DQA1 03:01 já foi descrito como o mais frequente em tribos Venezuelanas (Layrisse *et al.*, 2001), sendo também altamente frequente em populações ameríndias da América do Sul, incluindo a região Amazônica (Yunis *et al.*, 2013). O alelo HLA-DQA1 05:05 apesar de muito frequente na nossa população de estudo, não tem sido descrito em outras populações brasileiras. Este alelo tem sido mais comumente encontrado em populações europeias (Freitas, 2005). O motivo pelo qual o alelo HLA-DQA1 05:05 não ter sido descrito como altamente frequente em outras populações brasileiras, se deve principalmente a necessidade de mais estudos referentes a este *loci* em diferentes populações do país. Além disso, a população brasileira é muito diversa devido ao grande tamanho territorial e diversidade de sua colonização.

Portanto, diante dos nossos resultados, podemos concluir que a nossa população incluída neste estudo é representativa da população brasileira, visto que os alelos mais encontrados são altamente frequentes em caucasianos, negros africanos e índios nativos, que justamente representa a miscigenação atual da população brasileira (Krieger *et al.*, 1965).

6.6 Alelos de HLA classe II influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP no ELISA.

Após a realização das análises para avaliar se algum alelo específico de HLA classe II estava associado à resposta de anticorpos anti-PvDBP detectados no ELISA, foi possível observar que vários alelos estavam associados a esta resposta (**Anexo 1**). Entretanto, em todas as análises (tanto transversais, quanto longitudinal) foram observados dois alelos que se destacaram: HLA-DQA1*01:03 e HLA-DQB1*02:02. Estes dois alelos estavam frequentemente associados a maior chance de resposta de anticorpos contra a proteína PvDBP, seja contra a região do ligante (região II) ou contra a região II-IV. Diante disso, é possível concluir que indivíduos que carregam estes alelos tem maior chance de desenvolver anticorpos anti-PvDBP.

De importância, o alelo HLA-DQA1*01:03, apesar de estar frequentemente associado a resposta de anticorpos anti-PvDBP, foi um dos alelos menos frequentes para o *loci* HLA-DQA na população de estudo (5,6%). De fato, este alelo também tem sido descrito como pouco frequente tanto em populações do Brasil (Tsuneto *et al.*, 2003, Dellalibera, 2004), quanto da América Central (Arnaiz-Villena *et al.*, 2000).

Entretanto, em outras localidades do mundo este alelo já foi descrito como altamente frequente, como por exemplo, na Europa (Sánchez-Velasco & Leyva-Cobián, 2001) e Ásia (Agrawal *et al.*, 2008). Diante disso, apesar desse alelo ser pouco frequente em populações das Américas, o mesmo pode ter um papel importante em uma resposta imune eficiente contra a PvDBP.

Por outro lado, o alelo HLA-DQB1*02:02 apresentou uma frequência de 10% na população de estudo; considerando o alto grau de polimorfismo do HLA classe II, este é um alelo relativamente frequente na população de estudo. Até o momento, uma única publicação recente descreveu a presença deste alelo na população brasileira (J. Temin *et al.*, *in press*), porém, os dados ainda não se encontram disponíveis para consulta. Entretanto, este alelo já foi descrito como altamente frequente em regiões da Europa (Spínola *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2004) e, de importância, em áreas de alta transmissão de malária na Ásia (Duggal *et al.*, 2004). Diante disso, sabe-se que este alelo parece ser de grande importância, mas precisa ser mais estudado em outras regiões do mundo, particularmente em área de transmissão de malária.

Os resultados do presente estudo permitiram descrever ainda que alguns alelos de HLA classe II foram associados a uma resposta proteína-específica, isto é, apenas contra a PvDBP_{II} ou apenas contra a PvDBP_{II-IV}. O motivo pelo qual isso aconteceu pode estar relacionado ao reconhecimento da PvDBP *in vivo* pelo sistema imune. Entretanto, uma limitação deste estudo é que a resposta de anticorpos contra essa proteína foi avaliada *in vitro*, sendo medida através de ensaios de ELISA nos quais se utiliza proteínas recombinantes. Portanto, não necessariamente, essa resposta reflete o que acontece *in vivo*. Desta forma, os dados aqui apresentados devem ser interpretados com cautela. Por outro lado, esta é uma limitação não só do presente estudo, mas de qualquer estudo que avalia a resposta biológica frente a proteínas recombinantes *in vitro*.

Pelos dados publicados na literatura, um único estudo avaliou a influência do polimorfismo do Sistema HLA na resposta de anticorpos anti-PvDBP (Storti-Melo *et al.*, 2012). Entretanto, naquele estudo, nenhuma associação foi encontrada, provavelmente, devido ao pequeno número de indivíduos estudados (n = 73) e a baixa frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP (~ 20%). Por outro lado, os dados aqui apresentados envolveram um grande número de indivíduos estudados (n = 620), e, de relevância, avaliou prospectivamente a aquisição de anticorpos anti-PvDBP. Diante disso, os resultados aqui apresentados são de grande relevância para entender os mecanismos envolvidos na aquisição da resposta imune contra a PvDBP.

Ressalta-se ainda que outros alelos tiveram associação negativa com a resposta de anticorpos anti-PvDBP (HLA-DRB1*10:01, HLA-DRB1*14:02, HLA-DRB1*16:02, HLA-DQB1*05:02 e HLA-DQA1*05:01). Entretanto, todos os alelos apresentaram uma baixa frequência na população de estudo

(variando de 0,88 a 6,7%). De fato, a baixa frequência desses alelos já foi descrita em estudos realizados no Brasil (Tsuneto *et al.*, 2003; Dellalibera 2004), em populações ameríndias das Américas (Parolín & Carnese 2009; Garavito *et al.*, 2004; Vargas-Alarcón *et al.*, 2010) e Europa (Freitas, 2005; Zúñiga *et al.*, 2013), com exceção do alelo HLA-DQA1*05:01 que tem sido descrito como altamente frequente em regiões brasileiras (Salzano 2002; Tsuneto *et al.*, 2003) e norte-americana (Vargas-Alarcón *et al.*, 2010; Salzano 2002). Apesar da maioria desses alelos apresentarem baixa frequência na população estudada e em outras regiões do mundo, estas associações necessitam ser melhor investigadas em outras populações.

6.7 Alelos de HLA classe II influenciam na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II} nos ensaios funcionais.

O presente estudo, foi o primeiro a avaliar a influência do polimorfismo do HLA classe II com a resposta de anticorpos inibitórios contra a PvDBP_{II}. Neste estudo, foi possível observar que três alelos parecem estar mais frequentemente associados a esta resposta: HLA-DQA1*02:01, HLA-DRB1*07:01 e HLA-DQB1*02:02. Interessantemente, o alelo HLA-DQB1*02:02 também foi associado à resposta de anticorpos detectados na sorologia convencional, reforçando portanto a importância deste alelo na resposta imune contra a PvDBP. Provavelmente, este achado está refletindo melhor a resposta de anticorpos que desenvolve *in vivo*, visto que os anticorpos funcionais têm sido associados com proteção clínica. De fato, Grimberg e colaboradores (2007) demonstraram que esses anticorpos funcionais detectados *in vitro*, são capazes de bloquear a invasão do parasito em ensaios realizados *in vivo*.

Em conjunto os dados aqui apresentados sugerem que pelo menos três alelos de HLA classe II possam estar associados a uma resposta imune protetora contra a PvDBP_{II} já que estes anticorpos estão associados à proteção. De fato, King e colaboradores (2008) demonstraram que crianças com até nove anos de idade residentes em áreas hiperendêmicas de malária, adquiriram proteção contra a malária causada pelo *P. vivax*, e que essa proteção está positivamente relacionada à presença desses anticorpos anti-PvDBP_{II} inibitórios.

Diante disso, o presente estudo demonstrou que alelos específicos de HLA classe II estão associados tanto positivamente, quanto negativamente na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}. Entretanto, faz-se necessários estudos desta natureza em populações de área endêmica de malária que possuem *background* genético diferente da população estudada, visto que este foi, até o momento, o único estudo que se propôs a investigar essa associação. Estes estudos são de extrema importância, visto que essa proteína é considerada uma forte candidata à vacina.

Por último, vale a pena ressaltar, que o presente trabalho foi um estudo preliminar servindo como ponto de partida para estudos posteriores referentes à influência dos alelos de HLA de classe II na resposta imune humoral contra a PvDBP. Neste contexto, análises futuras referentes à associação entre genótipo de HLA classe II e resposta de anticorpos anti-PvDBP estão em desenvolvimento.

7 CONCLUSÕES

- 1) Na população estudada o genótipo *FY*A/FY*B* de DARC foi o mais frequente, seguido dos genótipos *FY*A/FY*A* e *FY*A/FY*B^{ES}*;
- 2) Polimorfismos no receptor DARC não influenciam na resposta de anticorpos detectados pela sorologia convencional;
- 3) A resposta de anticorpos funcionais é influenciada pelo genótipo de DARC dos indivíduos, sendo a maior frequência detectada em indivíduos heterozigotos para o alelo DARC silenciado;
- 4) Poucos indivíduos desenvolvem anticorpos funcionais anti-PvDBP, entretanto quando estes são adquiridos, os mesmos tendem a se manter estáveis independentemente do genótipo de DARC do indivíduo;
- 5) Em relação ao HLA classe II, os alelos HLA-DRB1*07:01, HLA-DQB1*03:01 e HLA-DQA1*03:01 foram os mais frequentes na população de estudo;
- 6) Alelos de HLA classe II influenciam na resposta de anticorpos anti-PvDBP na sorologia convencional, com destaque para os alelos HLA-DQB1*02:02 e HLA-DQA1*01:03;
- 7) Os alelos HLA-DQA1*02:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DQB1*02:02 e HLA-DQA1*02:01 parecem influenciar positivamente na resposta de anticorpos inibitórios anti-PvDBP_{II}, enquanto que o alelo HLA-DRB1*16:02 influencia negativamente.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1

Alelos de HLA classe II mais frequentemente associados à resposta de anticorpos anti-PvDBP

<i>Loci</i>	Alelos	ELISA			Ac inibitório
		PvDBP _{II}	PvDBP _{II-IV}	PvDBP _{II} +PvDBP _{II-IV}	PvDBP _{II}
HLA-DRB1	DRB1*07:01				OR = 1.7 - 2.0
	DRB1*14:02	OR=0.22			OR=0.33
	DRB1*10:01	OR=0.20			OR=0.25
	DRB1*04:07		OR=16.1	OR=4.27	
	DRB1*16:02	OR=0.38			OR=0.09
	DRB1*13:02			OR=1.93	
	DRB1*04:11	OR=2.21			
	DRB1*04:04		OR=2.07	OR=1.97	
HLA-DQB1	DQB1*03:03				OR = 4.7
	DQB1*02:02	OR = 2.27- .09	OR=1.67	OR = 1.77-.22	p < 0.05*
	DQB1*03:02			OR=1.81	
	DQB1*05:02		OR=0.26		
HLA-DQA1	DQA1*02:01				OR = 1.71-2.5
	DQA1*01:03	OR = 2.82-3.6		OR = 1.8- 2.5	
	DQA1*05:01			OR=0.59	OR=0.35
	DQA1*03:01	OR=2.83			
	DQA1*05:02			OR=14.6	
	DQA1*06:01		OR=4.99		

OR: razão de chance (odds ratio); a OR foi calculada conforme descrito nas tabelas 3 a 11, comparando indivíduos respondedores (incluindo respondedores, temporariamente respondedores e persistentemente respondedores) com indivíduos não respondedores.

*Frequência alélica < 5% inviabilizou o cálculo da OR; portanto, apenas a análise univariada foi apresentada.

8.2 ANEXO 2 – Artigo

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE



Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity

Flávia A. Souza-Silva^{1*}, Leticia M. Torres^{1*}, Jessica R. Santos-Alves¹, Michaelis Loren Tang¹, Bruno A. M. Sanchez², Tais N. Sousa¹, Cor J. F. Fontes³, Paulo A. Nogueira⁴, Roberto S. Rocha¹, Cristiana F. A. Brito¹, John H. Adams⁵, Flora S. Kano¹, Lúzia H. Carvalho^{1*}

1 Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, MG, Brazil, **2** Universidade Federal de Mato Grosso, campus Sinop, Sinop, MT, Brazil, **3** Júlio Müller University Hospital, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil, **4** Centro de Pesquisas Leônidas & Maria Duenas, FIOCRUZ Amazônia, Manaus, AM, Brazil, **5** Department of Global Health, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America

Abstract

The *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) and its erythrocytic receptor, the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC), are involved in the major *P. vivax* erythrocyte invasion pathway. An open cohort study to analyze DARC genotypes and their relationship to PvDBP immune responses was carried out in 620 volunteers in an agricultural settlement of the Brazilian Amazon. Three cross-sectional surveys were conducted at 6-month intervals, comprising 395, 410, and 407 subjects, respectively. The incidence rates of *P. vivax* infection was 2.32 malaria episodes per 100 person-months under survey (95% confidence interval [CI] of 1.92–2.80/100 person-month) and, of *P. falciparum*, 0.04 per 100 person-months (95% CI of 0.007–0.14/100 person-month). The distribution of DARC genotypes was consistent with the heterogeneous ethnic origins of the Amazon population, with a predominance of non-silent DARC alleles: $FY^*A > FY^*B$. The 12-month follow-up study demonstrated no association between DARC genotypes and total IgG antibodies as measured by ELISA targeting PvDBP (region II, DBPII or regions II–IV, DBPII–IV). The naturally acquired DBPII specific binding inhibitory antibodies (BIABs) tended to be more frequent in heterozygous individuals carrying a DARC-silent allele (FY^*B^{25}). These results provide evidence that DARC polymorphisms may influence the naturally acquired inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity.

Citation: Souza-Silva FA, Torres LM, Santos-Alves JR, Tang ML, Sanchez BAM, et al. (2014) Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. *PLoS ONE* 9(4): e93782. doi:10.1371/journal.pone.0093782

Editor: Kevin K.A. Tseth, London School of Hygiene and Tropical Medicine, United Kingdom

Received: November 27, 2013; **Accepted:** March 6, 2014; **Published:** April 7, 2014

Copyright: © 2014 Souza-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Research Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG), Research Foundation of Amazonas State (FAPEAM), The Brazilian National Research Council (CNPq), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, PARES VI) and Malaria Network/Support Program for Centers of Excellence - Projex Malaria/CNPq/DRCIT/MS, scholarships from CAPES (FAS, LMT), FIBIC/FIOCRUZ (JRE, MLT), CNPq (LHC, CRF, CFAB) are also acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Lúzia H. Carvalho is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

* Email: lhc.carvalho@pq.fiocruz.br

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Plasmodium vivax is the most widespread *Plasmodium* species and is a potential cause of morbidity and mortality among the 2.48 billion people living at risk of infection [1]. Recent evidence of multidrug-resistant *P. vivax* associated with severe and fatal disease elevates it to one of global health concern [2,3]. *Plasmodium vivax* infects human erythrocytes (RBCs) through a pathway that requires interaction between an apical parasite protein, the Duffy binding protein (PvDBP), and its receptor on reticulocytes, the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) [4–6]. The goal in developing PvDBP as a vaccine against blood stages of *P. vivax* is to elicit an antibody response that inhibits parasite adhesion to DARC-positive human reticulocytes, and thereby prevents merozoite invasion. The importance of the interaction between PvDBP (region II, DBPII) and DARC to *P. vivax* infection has stimulated a significant number of studies of PvDBP antibody

responses. Available data demonstrate that naturally occurring antibodies to PvDBP are prevalent in individuals living in *P. vivax* endemic areas [7–9], and these antibodies can block the DBPII/DARC interaction [10–12]. While inhibitory DBPII antibodies confer a degree of protection against blood stage infection [12], these antibodies are biased towards a specific allele [13]. Although anti-PvDBP immune responses have been well characterized, little is known about the association between this immune response and DARC host genotype [14,15].

Although most individuals lacking DARC on their RBCs are naturally resistant to *P. vivax* [4], some infections occur in DARC-negative persons living in *vivax* malaria endemic areas [16–18]. Beyond being receptors for *P. vivax* and various chemokines [19], DARC proteins have clinical and biological significance and have been reported to be associated with transfusion incompatibility and hemolytic disease of the newborn [20–22]. It is also implicated

in several inflammatory diseases, and cancer, and might play a role in HIV infection and AIDS [23–26]. Recently, a previously unreported function of this receptor has been described in *P. falciparum* infection, in which DARC proteins seem to be essential for platelet-mediated killing of *P. falciparum* parasites [27].

The two common DARC alleles in Caucasians, *FY*A* and *FY*B*, differ by a single base substitution (125 G>A) resulting in the replacement at residue 42 in the extracellular domain of a glycine (Fya antigen) for an aspartic acid (Fyb antigen) [28,29]. Another mutation in the DARC gene promoter region abolishes receptor expression on erythroid cells by disruption of a binding site for the GATA1 erythroid transcription factor, resulting in the absence of DARC antigens on RBCs (-33T>C; Fy⁰², erythrocyte-silent) [30]. Although most DARC negative individuals carry the GATA mutation in the *FY*B* allele (silent *FY*B* allele), the presence of a co-regulatory mutation within *FY*A* has been described [31]. The overall expression level of erythroid-specific DARC is co-dominant; therefore, DARC-null promoter heterozygosity reduces the DARC expression level by approximately 50 percent [31–33]. Similarly, the susceptibility to *P. vivax* in DARC-positive individuals varies among specific DARC genotypes [31,34–36].

In the current study, we present data of the first population-based study of the relationship between DARC genotypes and PvDBP inhibitory antibodies. The methodology included a community-based open cohort study in an agricultural settlement of the Amazon area of Brazil in which 620 individuals were genotyped for DARC, and their PvDBP immune responses were evaluated by conventional serology (recombinant proteins) and binding inhibitory antibodies (BIAb) targeting the DBPII ligand.

Material and Methods

Study area and population

The study was carried-out in the agricultural settlement of Rio Pardo (1°46'S-1°54'S, 60°22'W-60°10'W), Presidente Figueiredo municipality, northeast Amazonas State in the Brazilian Amazon area. Rio Pardo is located approximately 160 km from Manaus, the capital of Amazonas, along the main access to a paved road (BR-174) that connects Amazonas to Roraima State. The settlement was officially created in 1996 by the National Institute of Colonization and Agrarian Reform (INCRA) as part of a large scale colonization project focused on agriculture and wide-ranging human settlement in the Amazon area [37]. The mean annual temperature is 31°C with humid climate and average annual rainfall of the 2,000 mm per year. The rainy season extends from November-May and dry season from June-October. The settlement is composed of areas called 'ramais', which include households on both sides of unpaved roads, and a riverine population called Igarapé. A census in September-October 2008 identified 701 inhabitants, with 360 (51.4%) living in ramais areas and 341 (48.6%) in and around Igarapé. Inhabitants of the area live on subsistence farming and fishing along the small streams of the Rio Pardo River. The study site and malaria transmission patterns have been described in detail elsewhere [38]. Although *P. vivax* and *P. falciparum* are transmitted year round, *P. vivax* is responsible for about 90% of malaria cases [38]. Housing quality is poor, rendering indoor residual spraying ineffective. The availability of curative services is limited, and a government outpost provides free malaria diagnosis and treatment.

Study design and cross-sectional surveys

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

No. 007/2006 and No. 07/2009), according to the Resolution of the Brazilian Council on Health-CNS 196 / 96 after consultation with the community. In November of 2008, of 701 residents of the settlement invited to participate in the study, 541 (77.2%) accepted by giving written informed consent, which was also obtained from the next of kin, caregivers, or guardians on the behalf of participating minors. In addition to the consent form, separate assent forms were obtained from minors, in language appropriate for children ages 7–13 and adolescents from 14 to 17 years of age.

A population-based open cohort study was initiated in November of 2008, with the following procedures [38]: (i) administration of a structured questionnaire to all volunteers to obtain demographic, epidemiological, and clinical data; (ii) physical examination, including body temperature and spleen/liver size, recorded according to standard clinical protocols; (iii) venous blood collection in individuals aged five years or older (EDTA 10 ml), or blood spotted on filter paper (finger-prick) in those aged <5 years; and (iv) search for malaria parasites by light microscopy on Giemsa thick blood smears. Geographical location of each dwelling was recorded using a hand-held 12-channel global positioning system (GPS) (Garmin 12XL, Olathe, KS, USA) with a positional accuracy within 15 m. At initial enrollment, of 541 volunteers, genomic DNA was amplified to DARC polymorphisms and plasma samples screened to *P. vivax* antibodies in 395 (73%).

Six and twelve months following the initial survey, identical cross-sectional surveys were carried out. In total, 395 subjects were enrolled at baseline, 410 at the 2nd survey (June 2009), and 407 in the 3rd survey (October-November, 2009). A total of 620 volunteers contributed DNA and plasma samples, some of which participated in more than one cross-sectional survey. One hundred eighty-two (29.4%) and 205 (33%) subjects provided samples in two and three cross-sectional surveys, respectively.

Laboratory diagnosis of malaria

Malaria infection was diagnosed by microscopy of Giemsa-stained thick smears and real-time PCR amplification of a species-specific segment of the multicopy 18S rRNA gene of human malaria parasites. The Giemsa-stained smears were evaluated by experienced microscopists, according to the malaria diagnosis guidelines of the Brazilian Ministry of Health. For real-time PCR, genomic DNA was extracted from either EDTA whole-blood samples (adults and children ≥5 years old) or dried blood spots on filter paper (children <5 years) using the Puregene blood core kit B (Qiagen, Minneapolis, MN, USA) or the QIAmp DNA mini kit (Qiagen), respectively, according to manufacturers' instructions. Real-time PCR was performed as previously described [39] using a consensus pair of primers (PL1473F18 [5'- TAA CGA AC G A G A T C T T A A -3'] and PL1679R18 [5'- G T T C C T C T A A G A A G C T T T -3']).

DARC genotyping

Extracted genomic DNA was used to detect the three common alleles at the DARC locus, *FY*A*, *FY*B*, and *FY*02* (ES = erythroid silent), using real-time PCR with allele-specific primers, as previously described with minor modification [34]. Essentially, the original FGATA and RYA primers were replaced to FGATANEW (5' CCC GGG CCC GCC GCC CTCA TTA GTC CTT GGC TCT TGC 3') and RYANEW (5' AG CTG CTT CCA GGT TGG GGC 3'), respectively. Each 20 µl reaction mix contained 50–100 ng genomic DNA, 10 µl SYBR Green PCR master mix (Biosystems) and 0.1–1.0 pmoles/µL of each primer (Biosystems). The amplification and fluorescence were detected by ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied

Biosystems) using a cycle of 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. After amplification, melting curves were observed from the dissociation curve resulting from continuous measurements of fluorescence (F) at 530 nm during which the temperature was gradually increased from 60 to 95°C. Melting peaks of each amplified fragment were visualized by plotting the negative derivative of the fluorescence over temperature versus temperature ($-dF/dT$ vs. T). DNA samples from previously well-characterized Brazilian individuals carrying the most common DARC genotypes were included as positive controls. In addition, in c. 10% of samples, a 942-bp fragment of DARC, comprising polymorphic positions -31T>C and 125G>A, was amplified by PCR using the forward primer: 5'-TCAAAACAGGAAAGACCAAG-3' and reverse: 5'-AGAGG-TCTGAAAAGCATGAA-3' (Macrogen DNA sequencing services; <http://dna.macrogen.com/eng/>). No discordant results were obtained.

Recombinant protein and serological assay

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for total IgG antibodies to PvDBP was carried out using two recombinant proteins, covering the region II (DBPII) or regions II-IV (DBPII-IV). The recombinant DBPII, which includes amino acids 243–573 (region II), was expressed as a 6xHis fusion protein of 39 kDa, as previously described [40]. The recombinant DBPII-IV, amino acids 132–771 (regions II-IV), was expressed as a soluble glutathione S-transferase (GST) fusion protein of 140 kDa, as previously described [7,8]. To assess IgG antibodies to PvDBP, ELISA was carried out as previously described [8] with serum samples at 1:100 and recombinant proteins at a final concentration of 3 µg/mL (DBPII) or 1.25 µg/mL (DBPII-IV). For DBPII-IV protein, the final optical density (OD) at 492 nm was calculated by subtracting the OD obtained with GST (antigen control). The results were expressed as reactivity index: $RI = OD \text{ values of test sample} / \text{value of the cut-off}$. For each recombinant protein, cut-off points were set at three standard deviations above the mean OD of sera from 30 individuals who had never been exposed to malaria. Values of $RI > 1.0$ were considered positive. For statistical purposes, individuals were categorized as high responders ($RI > 4$) or low responders ($RI \leq 4$). This criterion was defined based on our previous findings that few individuals develop PvDBP antibody at $RI > 4$ [38].

COS cell transfection and erythrocyte-binding assays

COS7 (green monkey kidney epithelium, ATCC, Manassas, VA) cells were transfected with the plasmid pEGFP-DBPII, which coded for a common DBPII sequence circulating in the Amazon area [38]. This construct allows expression of DBPII as a fusion protein to the N-terminus of EGFP used as a transfection marker as previously described [10]. Transfections were realized with lipofectamine and PLUS-reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) according to manufacturer's protocols. Briefly, COS-7 cells in six-well culture plate (1.5×10^5 cells/well) were transfected with plasmid (0.5 µg/well)-liposome complexes (5% Plus-reagent and 3% lipofectamine) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO) without serum. After 6 h exposure to DNA-liposome complexes (37°C, 5% CO₂), transfection medium was replaced with DMEM with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). At 24 h post-transfection, culture medium was again replaced and efficiency of transfection was assessed by fluorescence. Forty-eight hours post-transfection, erythrocyte-binding assays were performed as previously described [11]. Briefly, plasma samples were added at 1:40, and plates were incubated for 1 hr at 37°C in 5% CO₂. Human

O⁺ DARC⁺ erythrocytes in a 10% suspension were added to each well (200 µL/well), and plates were incubated for 2 h at room temperature. Since DARC genotypes might influence *in situ* erythrocyte-binding assays [36], as was confirmed here (Figure S1), all *in situ* binding assays were carried-out with erythrocytes expressing both DARC antigens (Fya and Fyb, Fy^A/Fy^B genotype), which display intermediate binding and predominate in Brazil. After incubation, unbound erythrocytes were removed by washing the wells three times with phosphate buffered saline (PBS). Binding was quantified by counting rosettes observed in 10–20 fields of view (200×). Positive rosettes were defined as adherent erythrocytes covering more than 50% of the COS cell surface. For each assay, pooled plasma samples from Rio Pardo residents characterized as non-responders by ELISA were used as a negative control (100% binding). For this purpose, only plasma that did not inhibit erythrocyte binding, as opposed to samples from unexposed Brazilian donors, was pooled for the negative control (usually, 10 plasma samples/pool). A positive control included a pool of plasma from individuals with long-term exposure to malaria in the Amazon area. The percent inhibition was calculated as $100 \times (R_c - R_t) / R_c$, where R_c is the average number of rosettes in the control wells and R_t is the average number of rosettes in the test wells.

Statistical analysis

A database was created with Epidata software (<http://www.epidata.dk>). Linear correlations between two variables were determined by using the Pearson correlation coefficient. Comparisons of two independent proportions were realized by Z-test or chi-square test as appropriate. McNemar's test was used for analysis of correlated proportions. Differences in medians were assessed using Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test to identify differences between groups. The 95% Mid-P exact test was used to estimate incidence ratios (person-time of follow-up) and confidence intervals, considering variables such as duration of malaria-exposure, number of persons exposed, and previous malaria episodes. The level of significance of 5% was adopted. All analyses were performed on Stata software, v12 and OpenEpi (http://www.openepi.com/v37/Menu/OE_Menu.htm).

Results

Malarial infection, enrollment and follow-up, and PvDBP conventional serology

We investigated acute malaria infection in 620 subjects with a median of age 28 years and 1.4:1 male:female (Table 1). Age of subjects basically corresponded to the time of malaria exposure in the Amazon area ($r = 0.91$; $P < 0.0001$, Pearson's correlation test). Median time of residency in the Amazon area was 24 years. At the time of first blood collection, 19 (3%) subjects had positive blood-smears, with 17 (90%) of these infections caused by *P. vivax*. Real-time PCR confirmed all microscopically positive samples. In addition, PCR-based protocol identified 17 additional malaria infections, 15 *P. vivax* and two *P. falciparum*. The overall prevalence of malaria was 5.8%, with 32 of the 36 (89%) infections caused by *P. vivax*. No *P. malariae* or mixed *Plasmodium* infections were diagnosed by either microscopy or real-time PCR.

The 620 participants were followed up for an average of 7 months (10 days to 12 months), thus representing 4,546 person-months of follow-up. Based on parasitological-confirmed cases, the incidence rates of *P. vivax* malaria was 2.32 episodes per 100 person-months (95% confidence interval [CI] of 1.92–2.00/100 person-month) and, of *P. falciparum* 0.04 per 100 person-months (95% CI of 0.007–0.14/100 person-month). The temporal

Table 1. Demographic, epidemiological and genetic data of 620 subjects, Rio Pardo Settlement, Amazonas, Brazil

Characteristic	
Median age, years (IQR)	28 (14-47)
Gender, male:female	1:4.1
Acute malaria infection, n (%)	
Light Microscopy (LM)	39 (3.1)
PCR	17 (2.7)
Total	36 (5.8)
Years of malaria exposure, median (IQR)	34 (13-45)
Previous malaria episodes, median (IQR)	5 (1-11)
DARC genotypes, n (%)	
<i>FY*A</i> / <i>FY*B</i>	182* (29.4)
<i>FY*A</i> / <i>FY*A</i>	137 [†] (22.1)
<i>FY*A</i> / <i>FY*B²²</i>	125 [†] (20.2)
<i>FY*B</i> / <i>FY*B</i>	80 [†] (14.0)
<i>FY*B²²</i> / <i>FY*B²²</i>	69 [†] (11.1)
<i>FY*B²²</i> / <i>FY*B</i>	30 [†] (3.2)
DARC alleles, n (%)*	
<i>FY*A</i>	381 (46.8)
<i>FY*B</i>	425 (34.8)
<i>FY*B²²</i>	234 (18.8)

IQR = Interquartile range.

LM: 17 *P. vivax*, two *P. falciparum*; Real-Time PCR: 15 *P. vivax*, two *P. falciparum*.* Significant difference ($P < 0.05$, Z-test).† Proportions differ significantly, $FY*A > FY*B > FY*B^{22}$, $P < 0.0001$, Z-test.

doi:10.1371/journal.pone.0093782.t001

distribution of vivax malaria episodes according to rainfall and season is illustrated in Figure 1A.

Among the 620 recruited volunteers, 395 were enrolled at the baseline, 410 during the 2nd survey (6 months) and 407 during the 3rd survey (12 months). At the baseline, ELISA IgG antibodies to the main variant of PvDBP circulating in the area (Sal-1) were detected in 32% (region II, DBPII) to 50% (region II-IV, DBPII-IV) of the studied population (Figure 1B). The profile of DBPII antibody response was relatively stable over the course of the cross-sectional studies, and was not associated with the malaria transmission season (Figure 1B). On the other hand, DBPII-IV antibodies fluctuated according to malaria transmission (50% vs. 29% vs. 36% at baseline, 6, and 12 months, respectively; $P < 0.05$ by Z-test). Consecutive serological surveys demonstrated that, while 50% of DBPII responders could be classified as high responders (RI > 4), the majority of DBPII-IV responders were low responders (70 to 85%, RI ≤ 4). In this area, presence of PvDBP antibodies seemed not to be influenced by acute malaria infection, as the frequency of responders was similar in infected and non-infected groups ($P > 0.05$; Figure S2). However, the low numbers of acute infections identified in the study preclude conclusions about the association between infection and PvDBP antibody response. Acute infections were not explored in the further analyses.

DARC polymorphisms and generation of *P. vivax* specific antibodies

Three DARC genotypes, *FY*A*/*FY*B*, *FY*A*/*FY*A* and *FY*A*/*FY*B²²*, were frequently observed (Table 1), with heterozygous *FY*A*/*FY*B* being the most prevalent (182 out of 620, 29.4%). The DARC negative genotype (*FY*B²²*/*FY*B²²*) was present at low

frequency (3.2%, 20 of 620). Accordingly, we found a significant predominance of non-silent DARC alleles in the study area, with $FY*A > FY*B > FY*B^{22}$ ($p < 0.0001$ by Z-test). Individuals carrying the different DARC genotypes were equally distributed among the demographical and epidemiological variables associated with the risk of malaria infection, such as age, sex, and dwelling location (data not shown).

Anti-PvDBP IgG antibodies by conventional serology

To determine whether DARC polymorphisms influence the PvDBP antibody responses, we initially analyzed PvDBP antibodies as detected by ELISA. DBPII antibodies were analyzed at baseline and after 6 and 12 months, with individuals stratified according to DARC alleles, i.e., those carrying two (*FY*A*/*FY*A*, *FY*A*/*FY*B*, *FY*B*/*FY*B*), one (*FY*A*/*FY*B²²*, *FY*B*/*FY*B²²*), or no (*FY*B²²*/*FY*B²²*) DARC-positive allele (Figure 2). The frequency of responders among DARC negative individuals (*FY*B²²*/*FY*B²²*) was low, and their pattern of response remained the same at all survey times (Figure 2A). In DARC positive individuals, DBPII antibodies were detected in 29–36%, with no difference between individuals carrying one or two DARC-positive alleles (Figure 2A). A similar profile of response was detected for DBPII-IV antibodies (data not shown).

Since 205 of 620 individuals provided plasma samples at all three surveys (paired-samples), we analyzed this sub-group for differences in their anti-DBPII serological responses (Figure 2B). In general, the profiles of the DBPII antibody responses were similar between paired and non-paired samples (Figure 2). However, in the paired sub-group, it was possible to detect a slight trend toward a more intense response to DBPII among DARC positives carrying a single positive allele (high responder, RI > 4.0) (Figure 2B). However, the difference was significant only at 12 months (Z-test = 3.2; $P = 0.0014$), with 35% and 47% responders detected among double and single positive carriers, respectively. This tendency was not associated with any particular genotype and was not detected by using another recombinant (DBPII-IV) (data not shown).

DBPII binding inhibitory antibodies (BIABs)

Further experiments investigated whether DARC polymorphisms altered the functional properties of DBPII antibodies. Due to the methodology constraints of performing functional assays, the three cross-sectional measures of DBPII BIABs responses were performed on a subset of the study population comprising 270 samples corresponding to 90 DARC positive individuals (paired-samples) matched for age, sex, and malaria exposure (16 to 23 volunteer per DARC-positive genotype). Plasma samples from DARC negative individuals ($n = 21$) were used as a negative control, and no DBPII BIABs could be detected in this group (data not shown). DBPII BIABs were significantly more frequent in single DARC-positive allele carriers than in double positive carriers (Figure 3A). This pattern of acquired immune response was similar in all cross-sectional measures of DBPII BIABs. Beyond the frequency and levels of inhibitory antibodies, the persistence of response was also higher in the group carrying a single DARC-positive allele (Z-test = 3.002; $P = 0.0027$) (Figure 3B), a result that was not detected by conventional serology (data not shown).

The tendency towards an increased DBPII inhibitory antibody response among single DARC-positive allele carriers led us to investigate whether a particular DARC genotype or allele could be associated with this response. Persons homozygous for either *FY*A* or *FY*B* alleles were associated with lower DBPII BIABs; whereas the presence of these alleles in heterozygosis for the GATA mutation (*FY*A*/*FY*B²²* or *FY*B*/*FY*B²²*) was associated with a

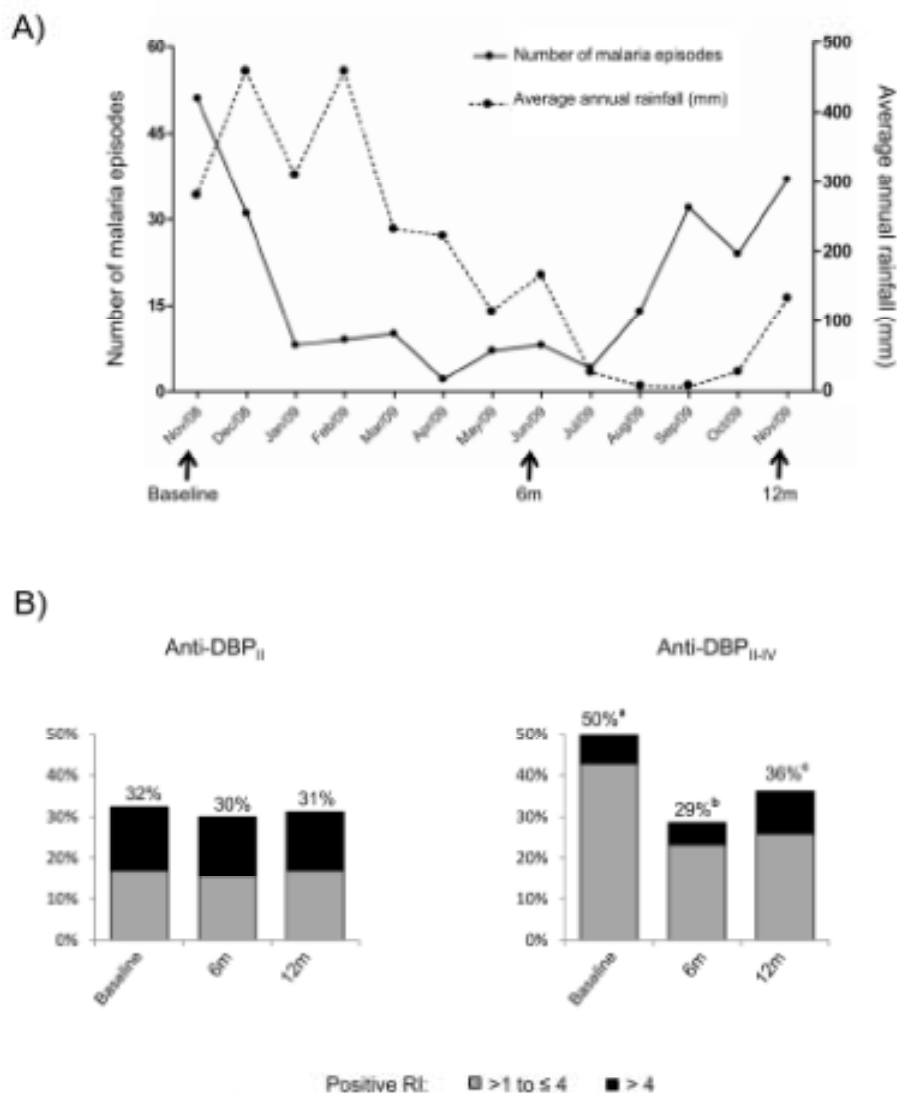


Figure 1. Temporal distribution of *P. vivax* malaria episodes and serological evaluation of ELISA-detected IgG antibodies targeting PvDBP, Amazonas, Brazil (Nov 2008–Nov 2009). (A) Episodes of malaria, as detected by conventional microscopy, varied according to rainfall and season; (B) DBPII-IV antibodies fluctuate with season while anti-DBPII remains stable. ELISA-detected antibody responses were evaluated November 2008, June 2009, and November 2009. Results are expressed as frequency (%) of responders, with Reactivity Index (RI) >1.0 considered positive; different superscripts (a–c) indicate significant differences ($P < 0.05$ by Z-test) doi:10.1371/journal.pone.0093782.g001

much higher inhibitory response, and these profiles were consistent in all three surveys (Figure 4). Individuals heterozygous for *DARC*-positive alleles (*FT*A/FT*B*) developed an intermediate level of DBPII IIAbs (c. 38%). These results demonstrated that *DARC* genotype influences the frequency and stability of human DBPII inhibitory antibody response.

Discussion

An important goal of PvDBP vaccine efforts is to inhibit parasite invasion of *DARC* positive reticulocytes. Since *DARC* polymorphisms are suspected to affect the ability of PvDBP antibodies to block parasite invasion [36], we carried-out the first follow-up

population-based study of the relationship between *DARC* polymorphisms and DBP antibodies. In the study area, incidence rates for *P. vivax* and *P. falciparum* malaria were 2.32/100 and 0.04/100 person-months, respectively, allowing the classification of the area as hypo- to meso-endemic, consistent with the general profile of malaria transmission in the Amazon region [41]. At enrollment, 32% of the studied individuals showed ELISA-detected IgG antibodies to the ligand region II (DBPII), while a higher seroprevalence (50%) was found by using a recombinant protein covering regions II to IV (DBPII-IV). Although DBPII antibodies were less frequent than DBPII-IV antibodies, the magnitude of the DBPII immune response was significantly higher and included a significant number of high responders (RI > 4), possibly because

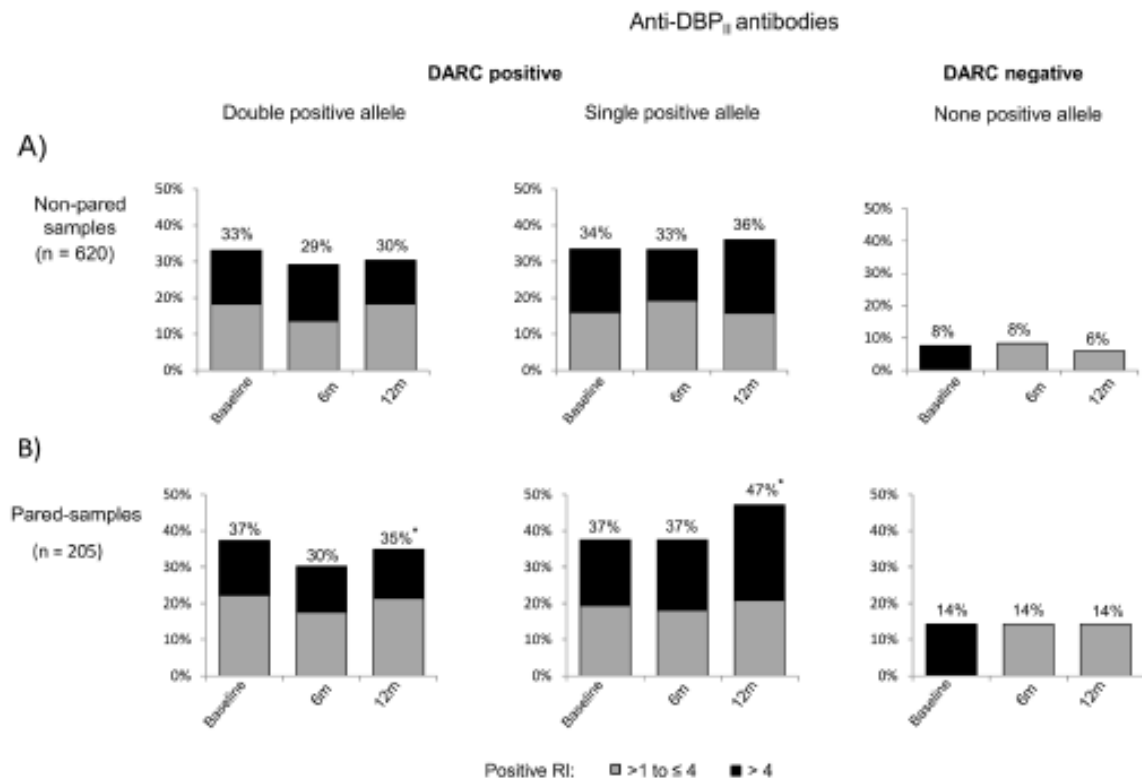


Figure 2. Frequencies of DBP_{II} IgG ELISA-detected antibodies are similar in individuals carrying one or two *DARC* positive alleles. DBP_{II} antibody responses were evaluated in plasma samples from individuals who participated in (A) at least one cross-sectional survey (non-paired samples, n = 620) or (B) in three consecutive surveys (paired-samples, n = 205). *DARC* positive individuals were categorized as carrying double positive alleles (*FY*A/FY*A*, *FY*A/FY*B*, *FY*B/FY*B*) or a single positive allele (*FY*A/FY*B²⁵*, *FY*B/FY*B²⁵*). *DARC*-negatives do not express *DARC* antigens on erythrocyte surface (*FY*B²⁵/FY*B²⁵*). ELISA results were expressed as frequency of responders (percentages on the top of the figures), with Reactivity Index (RI) > 1.0 considered positive. For all frequency comparisons, significant differences were found only between *DARC* negative and *DARC* positive groups ($P < 0.05$ by chi-square test). doi:10.1371/journal.pone.0093782.g002

dominant B-cell epitopes lie on region II [42–44]. Accordingly, the analysis of consecutive serological surveys demonstrates that, while DBP_{II}-IV antibodies fluctuate with season, DBP_{II} antibodies were stable throughout the study period.

It is well known that *DARC*-negative individuals are highly resistant to *P. vivax* infection [4] and, in general, present only low levels of antibodies to *P. vivax* blood stages [14]. Therefore, we were particularly interested in investigating the influence of *DARC*-positive alleles on the acquisition of anti-PvDBP immunity. Among *DARC*-positive allele carriers, the frequencies of ELISA-detected IgG antibodies were similar in single (*FY*A/FY*B²⁵* and *FY*B/FY*B²⁵*) and double positive (*FY*A/FY*A*, *FY*B/FY*B* and *FY*A/FY*B*) allele carriers. We observed a weak trend toward increased DBP_{II} IgG antibodies among single positive allele carriers, although this association was not significant in two of the three cross-sectional surveys.

Few studies have investigated the influence of *DARC*-positive alleles on the presence of conventional PvDBP antibodies acquired post-infection [15,36]. Using the recombinant DBP_{II} expression construct used in the present study, but ELISA assays with plasma samples twice more concentrated, Maestre et al. [15] reported that Colombian subjects with one positive allele were more likely to show DBP_{II} antibodies than were those with two positive alleles.

Unfortunately, the low number of ELISA-positive individuals in the Colombian study (DBP_{II} IgG sera, n = 17) precludes solid conclusions with respect to an association between PvDBP antibodies and the *DARC*-positive allele. In accordance with our findings, King et al. [36] reported that *DARC* genotypes were not associated with significant differences in DBP_{II} ELISA-specific antibody responses. In conclusion, we found no clear association between *DARC*-positive alleles and conventional anti-PvDBP immune responses, as detected by ELISA using different recombinant proteins.

In contrast to conventional serology, the present study demonstrated that the frequency and magnitude of DBP_{II} inhibitory antibody responses were significantly lower in adults carrying two *DARC*-positive alleles, especially in individuals homozygous for either the *FY*A* or the *FY*B* allele. Twelve months later, the frequency of persistent DBP_{II} BIAb responders among those bearing double-positive alleles was half that of single-positive carriers. These results suggested that, while individuals with a high level of *DARC* expression (double positive carriers) exhibited low BIAbs responses, those with a lower level of expression (single positive carriers) exhibited a higher inhibitory response. There is no clear explanation for why individuals carrying a single *DARC*-positive allele exhibit a greater level of

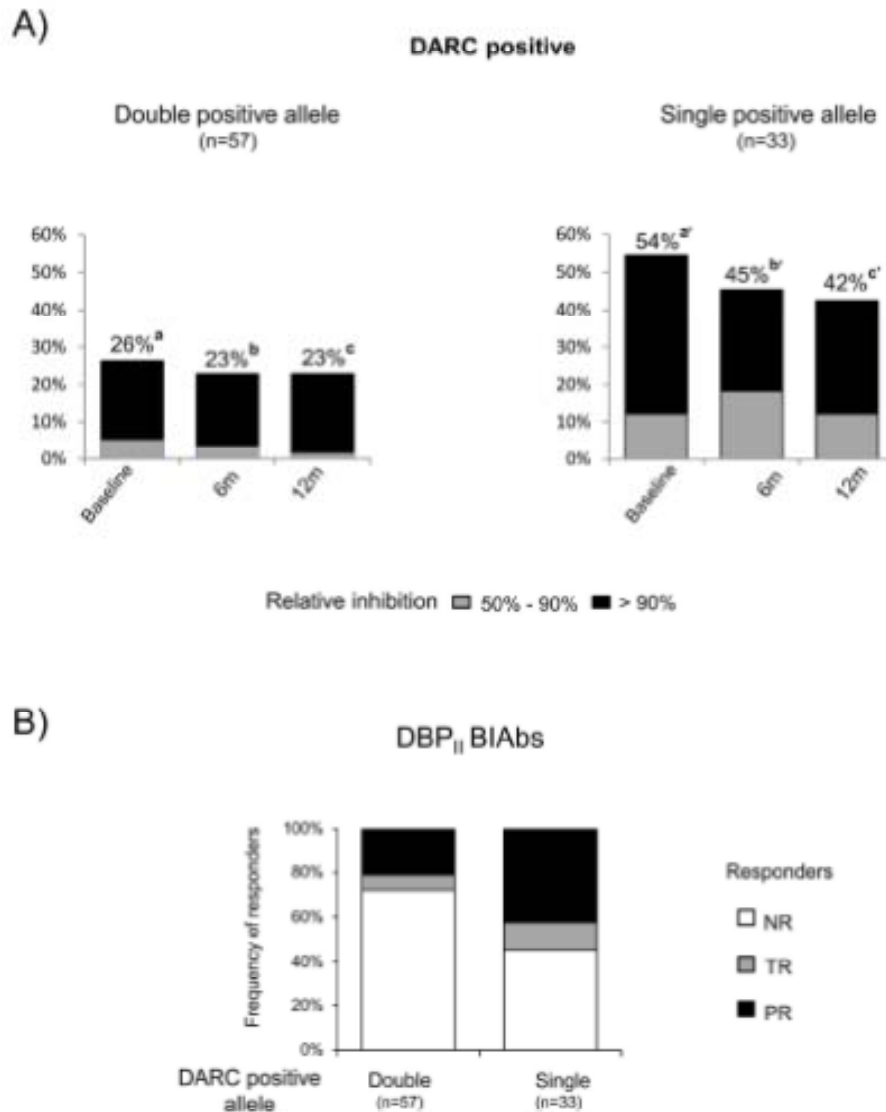


Figure 3. DARC polymorphisms affect the functional properties of DBP_{II} antibodies. DBP_{II} binding inhibitory antibodies (BIABs) were evaluated in plasma from individuals stratified according to DARC alleles, as carrying double positive alleles (*FY*A/FY*A*, *FY*A/FY*B*, *FY*B/FY*B*) or a single positive allele (*FY*A/FY*B²*, *FY*B/FY*B²*). A) Frequencies of BIABs (top of the columns) at three consecutive surveys showed DBP_{II} BIABs to be significantly more frequent in single positive allele carriers than in double positive carriers (significant differences between a vs. a'; b vs. b' and c vs. c', as determined by Z-test, $P < 0.05$). B) After 12-months, the BIABs response was more persistent in the group carrying a single DARC-positive allele (Z-test = 3.002; $P = 0.0027$). NR = non-responder, no inhibitory antibody response detected at any time-point of the study; TR = temporary responder, inhibitory antibodies in at least one cross-sectional survey; PR = persistent responder; inhibitory antibodies detected in all surveys. BIABs were evaluated by COS-7 cyto-adherence assay, with plasma samples at 1:40 and positive results as DBP_{II}-DARC binding inhibition $\geq 50\%$. doi:10.1371/journal.pone.0093782.g003

inhibitory antibodies that those with two positive alleles, especially as there is no evidence that DARC indirectly down-regulates humoral immune responses against the *P. vivax* blood stage, as has been proposed [15]. Because we and others have shown that low DARC erythrocyte expression reduces the risk of *P. vivax* blood-stage infection [34,35], it can be speculated that limiting access of the *P. vivax* merozoite to the DARC antigen might increase DBP_{II}

exposure to the immune system. Considering the quickness of the invasion process [45,46], and that PvDBP appears to be a poor immunogen that remains sequestered in the micronemes until invasion begins [5], it seems to be a feasible mechanism. Despite this, the levels of erythrocyte-DARC expression per se might not explain our findings, because, while DARC expression has been found to be lower in persons with *FY*B/FY*B* than in *FY*A/FY*A*

DBP_{II} BIAbs

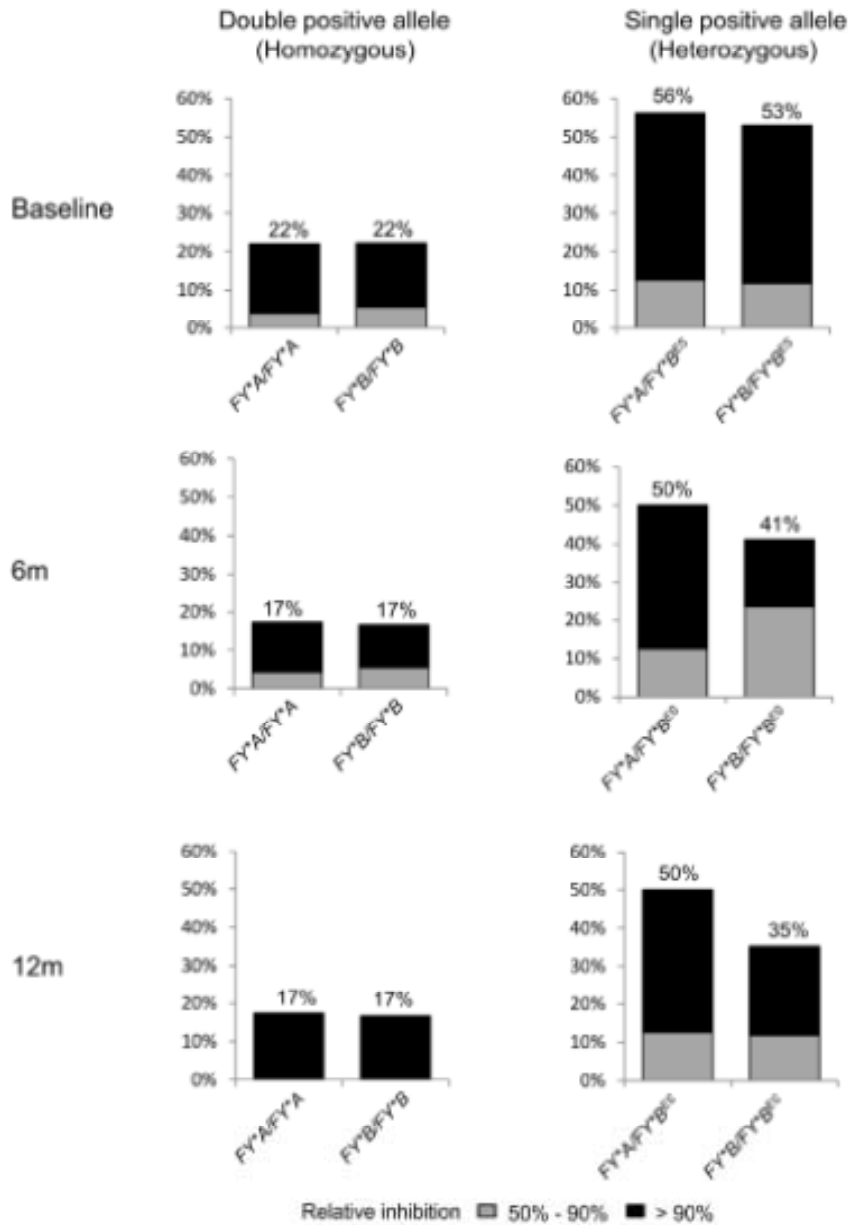


Figure 4. Homozygosis for either the *FY*A* or *FY*B* allele is associated with low frequency of DBP_{II} BIAbs. Plasma samples were grouped according to DARC genotype, as described in legend of Figure 3. DBP_{II} BIAbs were evaluated at three consecutive surveys by COS-7 cyto-adherence assay, with plasma at 1:40 and DBP_{II}-DARC binding inhibition \geq 50% considered positive inhibition. doi:10.1371/journal.pone.0093782.g004

[47], we found no difference in the inhibitory responses between the *FY*A* and *FY*B* homozygotes. Recent evidence suggests that *FY*A* allelic polymorphism affects the ability of PvDBP antibodies

to block parasite invasion [36]. Here, the DBP_{II}/DARC interaction was assessed by using the established COS-7 cyto-adherence assay based upon a multivalent interaction between

DBPII on the surface of COS-7 cells and DARC expressed in RBCs [40]. Because, in the COS-7 assay, antibodies are challenged to inhibit a cell interaction that is likely to be highly multivalent [49], it is possible that small differences in antibody activity might be not detected. Studies to assess the BIAbs through an interaction assay of limited valency, such as the recently described flow cytometry based antibody-inhibition assay in which DBPII expressed on the yeast surface interacts with a dimeric recombinant DARC, would be of interest [49]. Although the inhibitory response in the yeast assay seems to be more amenable to high-throughput analysis, the clinical relevance of an assay with low valency interaction remains to be determined. Although these *in vitro* biological assays have made great contributions to the study of the interaction between DBPII and DARC, it is expected that the successful establishment of a long-term culture of *P. vivax* would lead to insights that could improve our understanding of the role of DARC genotypes in invasion and immune response processes. Time-lapse microscopy of live *P. vivax* merozoites grown in the presence of inhibitory anti-sera could shed light on this topic.

Through a 12-month follow-up study in the Amazon area, we demonstrated that DBPII inhibitory antibody responses were approximately 50% lower in *FY*A/FY*A* and *FY*B/FY*B* double-positive individuals when compared with individuals heterozygous for *FY*A* or *FY*B* alleles, suggesting a gene-dosage effect. It is not yet clear if this finding has implications for the acquisition of protection against malaria. Due to the relevance of these findings for vaccine development, it would be pertinent to investigate whether such an association exists in other *vivax* malaria endemic countries.

Supporting Information

Figure S1 The DBPII binding to erythrocytes is influenced by DARC genotype. COS-7 cells, transfected with

plasmid expressing the gene encoding DBPII, were incubated with erythrocytes from individuals bearing different DARC genotypes. The results were expressed as the median of the number of rosettes (5 to 10 samples per genotype) in erythrocyte-binding assays, as described in material and methods. *Box-plots*: solid line across the box is the median, and the bottom and the top of each box represent the 25th and 75th percentiles, respectively; vertical lines represent the range. DARC-negative erythrocytes were used as a negative control. Significant differences were detected between *FY*B/FY*B* and *FY*B/FY*B²³* and *FY*A/FY*B* and *FY*B/FY*B²³* ($P < 0.01$ by Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test). (TIF)

Figure S2 The PvDBP antibody response was not shown to be influenced by acute malaria infection. The of DBPII and DBPII-IV ELISA-detected antibodies were evaluated at 0, 6, and 12 months, and individuals were grouped according to the presence (yes) or absence (no) of malaria infection at the time of blood collection. The results are shown as frequency (%) of responders (RI > 1.0). (TIF)

Acknowledgments

We thank the inhabitants of Rio Pardo for enthusiastic participation in the study; the local malaria control team in Presidente Papeleto for their logistic support; and the scientific units of Oswaldo Cruz Foundation in Manaus, AM (FioCruz-AM) and Belo Horizonte, MG (FioCruz-Minas) for overall support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LHC FAS LMT FSK JHA. Performed the experiments: FAS LMT JRS MLT TNS BAMS. Analyzed the data: CJFF FSK CFAR. Contributed reagents/materials/analysis tools: PAN CFAR JHA RSR. Wrote the paper: LHC FAS LMT FSK CFAR.

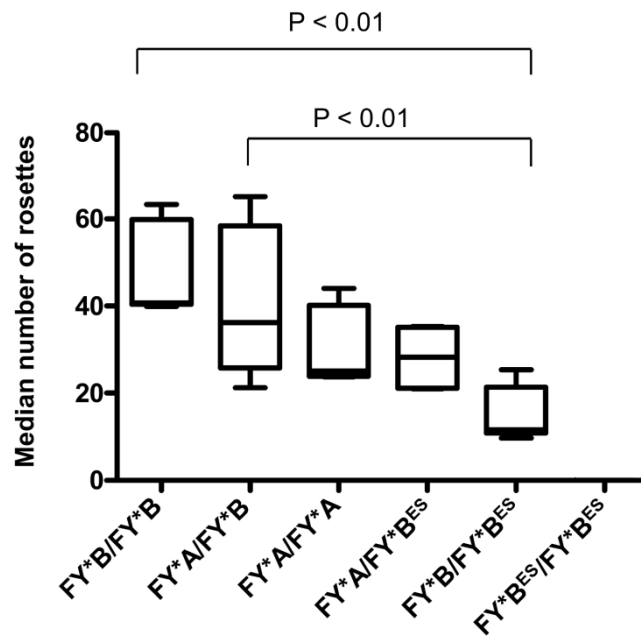
References

1. Gething PW, Haynes JR, Moysa GI, Smith DL, Barth KE, et al. (2012) A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1814.
2. Tjara F, Anony NM, Sugiarto P, Wicakar N, Kusnigum E, et al. (2008) Multiresistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: A prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Medicine* 5: 890–899.
3. Genton B, D'Acremont V, Bain L, Baca K, Reuter JC, et al. (2008) *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: A prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine* 5: 881–889.
4. Miller L, Mason S, Clyde D, McGinnis M (2002) The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: The Duffy-blood-group genotype, *FyFy⁻*. *N Engl J Med* 347: 302–304.
5. Adams JH, Hualon DE, Tori M, West GE, Wellens TE, et al. (1990) THE DUFFY RECEPTOR FAMILY OF PLASMODIUM-KNOWLESI IS LOCATED WITHIN THE MICRONEMES OF INVASIVE MALARIA MEROZOITES. *Cell* 63: 141–153.
6. Fang XD, Kaufow DC, Adams JH, Miller LH (1991) CLONING OF THE PLASMODIUM-VIVAX DUFFY RECEPTOR. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44: 125–132.
7. Finner T, Michon P, Berrueto I JW, New AR, Aiyemsa F, et al. (1997) Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity* 65: 2772–2777.
8. Geratzki IP, Braun-Romanos C, Braga EM, Fenton CJF, Brito CFA, et al. (2005) Anti-*Plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 673–681.
9. Souza-Silva FA, de Silva-Nunes M, Sanchez BA, Geratzki IP, Malafreite RS, et al. (2010) Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 82: 185–193.
10. Michon P, Finner T, Adams JH (2002) Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity* 68: 3164–3171.
11. Geratzki IP, Souza-Silva FA, Fenton CJF, Braga EM, Malufira AP, et al. (2008) Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scandinavian Journal of Immunology* 67: 270–278.
12. King CL, Michon P, Shales AR, Maroney A, Soutter D, et al. (2008) Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8363–8368.
13. Geratzki I, Sanchez B, Souza T, Gomes B, Soares I, et al. (2009) Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Glia Exp Immunol* 156: 302–310.
14. Herrera S, Gomez A, Ven O, Vergara J, Valdecrana-Aguirre A, et al. (2005) Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in Fy-negative individuals from the Colombian pacific coast. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 44–49.
15. Macete A, Medina C, Dupuy V, Aguilero O, Liu P, et al. (2010) Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *PLoS One* 5: e11437.
16. Geratzki GE, Martins LG, Gesto AA, Bonini-Domingos GR, Valencia SH, et al. (2007) *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 1042–1044.
17. Ryan JB, Strain JA, Anon J, Denton RE, Mwalili K, et al. (2006) Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75: 375–381.
18. Mitaud D, Bernadine C, Bouchier C, Henry-Halbin C, Gray LR, et al. (2010) *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5967–5971.
19. Hunk R, Chittim GF, Darbonne WC, Colby TJ, Rychnicki A, et al. (1998) A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 281: 1182–1184.
20. Bahadure SS, Bhutta HM (1970) A fatal transfusion reaction due to anti-Duffy (Fya) Case report. *Indian J Med Sci* 24: 562–564.
21. Weinman I, Taylor ES (1973) Hemolytic disease of the newborn secondary to anti-Fya. *Am J Obstet Gynecol* 121: 643–645.

DARC Polymorphisms Involved in Inhibitory DBPI Immunity

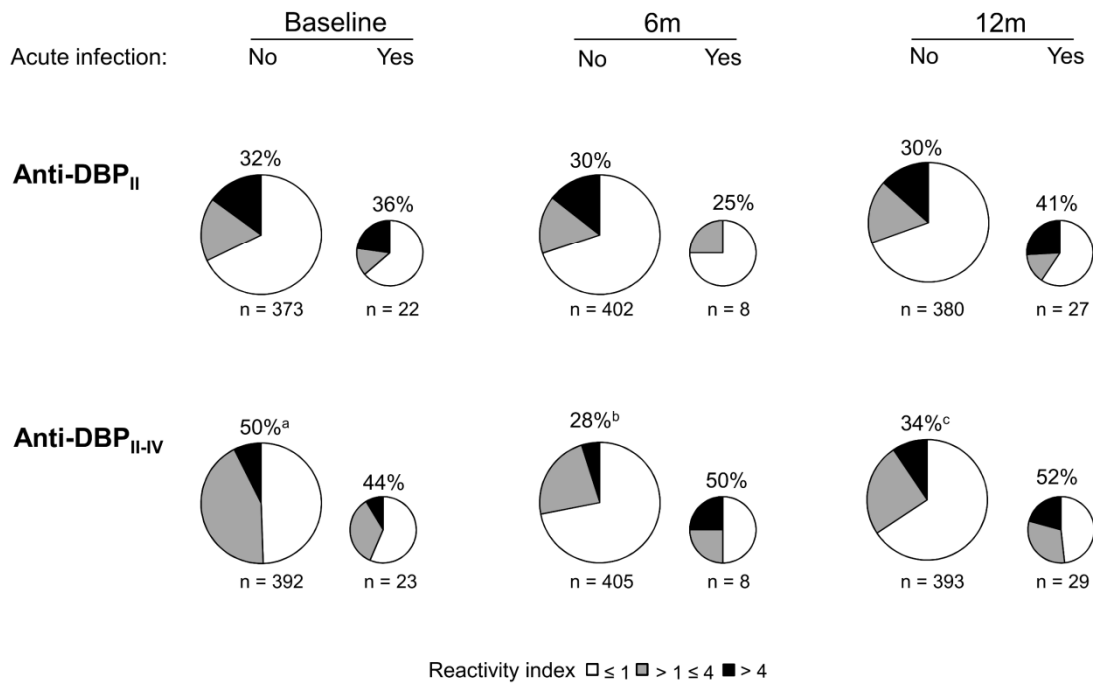
22. Moise KJ (2000) Non-aeti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 75-81.
23. Walton RT, Rowland-Jones R (2008) HIV and chemokine binding to red blood cells—DARC matters. *Cell Host Microbe* 4: 3-5.
24. Reich D, Nalls MA, Kao WH, Skyllakou EI, Tandon A, et al. (2009) Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet* 5: e1000360.
25. Afeyi-Annan A, Kall M, Gambo MR, Oringie EP, Akhly-Koch A, et al. (2008) Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. *Transfusion* 48: 917-924.
26. Szusterek D, Bertrand O, Gerswiler M, Colin Y, Enchev G, et al. (2010) Multiple insertions in structural models of DARC transmembrane protein. *Transfus Clin Biol* 17: 184-196.
27. McMoran BJ, Winczorek L, Drysdale KE, Chan JA, Huang HM, et al. (2012) Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science* 338: 1546-1551.
28. Iwamoto S, Ohi T, Kaji E, Iwamoto S (1995) Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb allelotype system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 85: 622-626.
29. McKinnon G, See KS, Schall TJ, Pasacka M, Anzures DJ (1995) Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fya(-) phenotype. *Br J Haematol* 90: 823-829.
30. Toumazou C, Colin Y, Caumont JP, Le Van Kim C (1995) Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 10: 224-228.
31. Zimmerman PA, Woolley J, Mainick GL, Miller SM, McNamara DT, et al. (1999) Emergence of FY*(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13973-13977.
32. Woolley J, Hutchings P, Reeder JC, Kazan JW, Corlett A (2000) Southeast Asian ovalocytosis is associated with increased expression of Duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *Immunohematology* 25: 65-66.
33. Michon P, Woolley J, Ward EM, Kattam W, Zimmerman PA, et al. (2001) Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the P-190 ligand required for blood-stage infection. *Vox Sanguis* 81: 111-114.
34. Souza T, Sanchez R, Gerisole I, Caraballo I, Brito C (2007) Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. *Vox Sang* 92: 373-380.
35. Kanchagun LJ, Mueller I, Kitchers R, Rockswold MJ, Reeder JC, et al. (2007) Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes. *PLoS One* 2: e336.
36. King GI, Adams JH, Nairli J, Grimborg BT, McHenry AM, et al. (2011) Fya(-)/Fyb(-) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 20113-20118.
37. de Castro MC, Motta-Mir RL, Sawyer DO, Singer BH (2006) Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2452-2457.
38. Kato FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang M, Saikou J, et al. (2012) *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health* 17: 989-1000.
39. Mangili K, Manson R, Keay E, Stephens L, Regner M, et al. (2005) Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol* 43: 2435-2440.
40. Nuroaga FR, Schlegel J, Ramon SJ, McHenry AM, Singh S, et al. (2012) Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. *Infect Immun* 80: 1205-1208.
41. da Silva-Nunes M, Galvão C, Malafante R, da Silva N, Jansen C, et al. (2008) Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg* 79: 624-633.
42. Nairli JI, Baker M, Kattam W, Rockswold M, Adams JH, et al. (2002) Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *Journal of Immunology* 169: 3200-3207.
43. Nairli J, Cole-Tobian JL, Baker M, Kattam W, Rockswold M, et al. (2003) Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity* 71: 2508-2515.
44. Cole-Tobian J, King GI (2005) Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127: 121-132.
45. Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T (1975) Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 187: 748-750.
46. Glenn FR, Crabb BS (2005) Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Int J Parasitol* 35: 91-96.
47. Woolley J, Henneke KA, Szusterek DM, Zimmerman PA, Kazan JW (2000) Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion* 40: 949-953.
48. Chinn C, Miller L (1994) Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 180: 497-506.
49. Suspathy S, Garcia G, Jones J, Gomonzothy A, Glenn C, et al. (2013) Glycan mapping of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein for probing protein binding function and vaccine development. *PLoS Pathog* 9: e1003420.

Souza-Silva et al Fig. S1



The DBPII binding to erythrocytes is influenced by DARC genotype. COS-7 cells, transfected with plasmid expressing the gene encoding DBPII, were incubated with erythrocytes from individuals bearing different DARC genotypes. The results were expressed as the median of the number of rosettes (5 to 10 samples per genotype) in erythrocyte-binding assays, as described in material and methods. Box-plots: solid line across the box is the median, and the bottom and the top of each box represent the 25th and 75th percentiles, respectively; vertical lines represent the range. DARC-negative erythrocytes were used as a negative control. Significant differences were detected between FY*B/FY*B and FY*B/FY*BES and FY*A/FY*B and FY*B/FY*BES ($P < 0.01$ by Kruskal–Wallis with Dunn's post hoc test).

Souza-Silva et al Fig. S2



The PvDBP antibody response was not shown to be influenced by acute malaria infection. The of DBP_{II} and DBP_{II-IV} ELISA-detected antibodies were evaluated at 0, 6, and 12 months, and individuals were grouped according to the presence (yes) or absence (no) of malaria infection at the time of blood collection. The results are shown as frequency (%) of responders (RI>1.0).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams JH, Hudson DE, Tornii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, et. al. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*, 1990, Oct 5;63 (1):141-53.
- Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, .89: 7.085-7.089.
- Agrawal S, Srivastava SK, Borkar M, Chaudhuri TK. Genetic affinities of north and northeastern populations of India: inference from HLA-based study. *Tissue Antigens*. 2008 Aug;72(2):120-30.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et. al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*; 2006, 12(2): 220-224.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, et. al. Severe *Plasmodium vivax* malária exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria J*. 2010, 13;9;13.
- Albuquerque SR, Cavalcante FO, Sanguino EC, Tezza L, Chacon F, Castilho L, et al. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitol Res.*, 2010. Apr; 106(5):1049-53.
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, et al. Severe *Plasmodium vivax* malária, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2010, 16:1611-1614.
- Ampudia E, Patarroyo MA, Patarroyo ME, Murillo LA. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1996; 78(1-2), 269-272.
- Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gómez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M, et. al. HLA genes in Mexican Mazatecos, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens*. 2000 Nov;56(5):405-16.
- Badakere, S. S. & Bhatia, H.M. A fatal transfusion reaction due to anti-Duffy (Fya). *Case report. Indian J Med Sci*, 1970, 24, 562-4.
- Banic DM. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop*.2004, 92 163–9.
- Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MCS, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et. al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007. v.102:335-339.
- Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell. Microbiol*. 2005; 7: 1.539-1.345.
- Barnwell JW, Galinski MR. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In IW Sherman, *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM PRESS. Washington, 1998; DC: Cap.7, p. 93-120.
- Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med*. 1989; 169: 1.795-1.802.

- Barnwell JW, Wertheimer SP. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989; 313: 1-11.
- Batchelor, DT, Zahm, JA; Nirah H T. Dimerization of *Plasmodium vivax* DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. *Nature Structural e Molecular Biology.* 2011, 10.1038, 908-915.
- Bicalho MG, Ruiz TM, Costa SMC, Zacarias FR. Haplótipos HLA mais frequentes em doadores voluntários de medula óssea de Curitiba, Paraná. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24 (4): 306-309.
- Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Human Mutation*, 2004, 23(1): 8-16.
- Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DC, Nicholls A & Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. *The Lancet*, 1973, v.1, n.7809, p.904-907.
- Carosella, E.D.; Dausset, J.; Kirschbaum, M., HLA-G revised. *Immunology Today*, Amsterdam, 1996, v. 17, n. 9, p. 407-409.
- Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC, et al. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007, 101(10):1042-4.
- Cavasini CE, Prereira, FJT, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU. Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2001, Nov-Dec;34(6):591- 5.
- Cerávolo I, Sanchez B, Sousa T, Guerra B, Soares I, Braga E, et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009; 156: 502–510.
- Cerávolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJ, Braga EM, Madureira AP, Krettli AU, et. al. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand. J. Immunol*, 2008, 67, 270-8.
- Cerávolo IP, Romero OB, Braga EM, Fontes CJ, Brito CFA, Souza JM, et. al. Anti-*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005; 72: 675-681.
- Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo A. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood*, 1995, 85, 615-621.
- Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo A. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 10793-10797.
- CHOO, S.Y. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*, v.48, n.1, p.11-23, 2007

- Chootong P; Panichakul T; Permmongkol C; Barnes SJ; Udomsangpetch R; Adams JH. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: approach to *Plasmodium vivax* vaccine development in Thailand. Plos One; 2012, 7(4): e35769.
- Cifuentes G, Salazar LM, Vargas LE, Parra CA, Vanegas M, Cortes J, et. al. Evidence supporting the hypothesis that specifically modifying a malaria peptide to fit into HLA-DRbeta1*03 molecules induces antibody production and protection. Vaccine, 2005, 23,1579–1587.
- Cogneta, C. Farnarierd, C. Gauthiere L., Frassatii, C. Andrée, P., Magérus-Chatinetf,A. et. al. Expression of the HLA-C2-specific activating killer-cell Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells. Clinical Immunology, 2010, v. 135, Issue 1, April, p. 26–32
- Cole-Tobian J, King CL Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. Molecular and Biochemical Parasitology, 2003,127: 121-132.
- Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, Richards JS, Beeson JG, Mueller I, et. al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. Infect Immun. 2009, Sep;77(9):4009-17.
- Cowman B, Crabb A. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell 2006; 124: 755-766.
- Crosnier, C., Bustamante, L.Y. Bartholdson, A. J. Bei, A. K. Theron, M. Mboup,M. U. S. et. al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. Nature, 2011, v. 480: 22/29 p. 534-538.
- Crouau-Roy, B., Amadou, C. Bouissou, C. Clayton, J., Verenet, C., Ribouchon, M.T., et. al. Localization of the OTF3 Gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. Genomics, 1994, San Diego, n. 21, p.241-243.
- Cserti-Gazdewich CM, Mayr WR, Dzik WH. *Plasmodium falciparum* malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV) Vox Sang. 2011 Jan;100(1):99-111.
- da Silva-Nunes, M., C. Codeço, R. Malafronte, N. da Silva, C. Juncansen, P. Muniz & M. Ferreira. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. Am J Trop Med Hyg, 2008, 79, 624- 35.
- Diakite M, Clark TG, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A, et. al. A genetic association study in the Gambia using tagging polymorphisms in the major histocompatibility complex class III region implicates a HLA-B associated transcript 2 polymorphism in severe malaria susceptibility. Hum Genet. 2009 Feb;125(1):105-9.
- Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. Medicina (Ribeirão Preto) 2000;33:7-18.
- De Castro MC, Monte-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon frontier. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, Feb 14;103(7):2452-7.

- Dellalibera, 2004. Polimorfismo de Genes de HLA Classe II (DRB1, DQA1 e DQB1) e Associação com Doenças Parasitárias na População do Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 98p.
- Doolan, D. L. Dobaño, C. Baird J. K., Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol Rev.* 2009, v. 22 (1):p. 13-36.
- Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, Farr BM, et. al. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. *J Infect Dis.* 2004 Feb 1;189(3):520-6.
- Dunham I.Sargent, C.A., Trowsdale, J., Campbell, R. D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, Washington, 1987, v. 84, p. 7235.*
- Oliveira E.A. & Sell A.M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. *Acta Scientiarum Maringá*, 2002 v. 24, n. 3, p. 731-736.
- Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 44: 125-132.
- Fainardi, E.; Rizzo, R.; Melchiorri, L.; Vaghi, L., Castellazzi, M., Marzola, A., et. al. Presence of detectable levels os soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis; relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. *Journal of Neuroimmunology, Amsterdam, 2003, v. 142, n, 1-2, p. 149-158.*
- Ferreira AP & Teixeira HC. Complexo de histocompatibilidade principal. In: Ferreira AP & Teixeira HC eds. *Tópicos de Imunologia Básica. 1aed. Juiz de Fora: Central Formulários 2005: 41-50.*
- Fraser T, Michon P, Barnwell JW, Noe AR, Al-Yaman F, Kaslow DC, et. al. Expression and serological activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect. Immun.* 1997; 65: 2.772-2.777.
- Freitas H.S. Diversidade Genética do Sistema HLA em Portugal, Cabo Verde e Guiné-Bissau Tese de Doutorado em Citogenética e Biologia, Funchal, Universidade da Madeira, 2005, 241p.
- Frevert U, Engelman S, Zougbede S, Strange J, Ng B, Matuschewski K, et. al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* 2005; 3:192- 204.
- Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell* 1992; 69: 1.213-1.226.
- Garavito G, Yunis EJ, Egea E, Ramirez LA, Malagon C, Iglesias A, et. al. HLA-DRB1 alleles and HLA-DRB1 shared epitopes are markers for juvenile rheumatoid arthritis subgroups in Colombian mestizos. *Hum Immunol* 2004; 65(4): 359-65.
- Gaur, D.; Mayer, D. C.; Miller, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int. J. Parasitol*, 2004,v. 34, p. 1.413- 1.429.

- Genton B, D'acremont V, Rare L, Baea K, Reeder J, Alpers M. et. al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. Plos Med. 2008; 5: e127
- Germain RN. Antigen processing and presentation, in fundamental immunology. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1999, 287–340.
- Germain RN, Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 467–522.
- Guerra, G.H. Haplotipos de HLA asociada al grado de severidad clínica de la infección de malaria por *P. falciparum* en la cuenca amazónica del Perú. Centro Nacional de Salud Publica, 2003.
- Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. Current opinion in Microbiology. 2009., v. 2, n. 4, p. 394-400.
- Gonzalez-Galarza F.F, Christmas S, Middleton D, Jones A.R. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39.
- Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, et. al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. PLoS Med. 2007; 4: 1940–1948.
- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et. al. The 68 international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. Plos Negl Trop Dis 2010 Aug 3; 4(8): e774.
- Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. Trends Parasitol, 2006, 22: 353–358.
- Guo Z., Zhang, H. Rao, H., Jiang, D. Cong, X., Feng, B. et. al. Pulsed with Novel HLA-A2-Restricted CTL Epitopes against Hepatitis C Virus Induced a Broadly Reactive Anti-HCV-Specific T Lymphocyte Response. Plos One, 2012 jun. v.7, Issue 6 e38390.
- Hadley T, Peiper S. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. Blood, 1997, 89, 3077-3091.
- Han, Y.N. Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV infected patients. World Journal of Gastroenterology, 2005, v.11, n.36, p.5721-5724.
- Harney SM, Vilariño-Güell C, Adamopoulos IE, Sims AM, Lawrence RW, Cardon LR, et. al. Fine mapping of the MHC Class III region demonstrates association of AIF1 and rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2008 Dec;47(12):1761-7.
- Herrera, S., A. Gomez, O. Vera, J. Vergara, A. Valderrama-Aguirre, A. Maestre, et. al. Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in Fy-negative individuals from the Colombian pacific coast. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2005, 73, 44-49.

- Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Hananantachai H, Naka I, Ogawa A, et. al. Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathog.* 2012;8 (3):e1002565.
- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, et. al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*, 1993; 261: 1.182-1.184.
- Howes, R. E.; Patil, A. P.; Piel, F. B.; Nyangiri, O. A.; Kabaria, C. W.; Gething, P. W.; et. al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nature*, 2011. v. 2, p. 266.
- Iwamoto, S., T. Omi, E. Kajii & S. Ikemoto Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood*, 1995, 85, 622-6.
- Johnson A, Leke R, Harun L, Ginsberg C, Ngogang J, Stowers A, et. al. Interaction of HLA and age on levels of antibody to *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated proteins 1 and 2. *Infect. Immun.*, 2000, 68: 2231–6.
- Johnson AH, Leke RG, Mendell NR, Shon D, Suh YJ, Bomba-Nkolo D, et. al. Human leukocyte antigen class II alleles influence levels of antibodies to the *Plasmodium falciparum* asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.*, 2004, 72, 2762–71.
- Kano, F.S. Sanchez, B.A.M., Sousa, T.N., Tang, M. L. Saliba, J. Oliveira, F. M., et. al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Tropical Medicine and International Health*, 2012, v.17, Issue 8, p.989–1000.
- Kaslow, RA., Carrinton M., Apple R., Park L., Munoz A., Saah AJ. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 1996; 2:405-11
- King C. L., Adams, J.H. Xianli J. Grimberg, B. T., McHenry, A.M Greenberg, L. et. al. Fy a /Fy b antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malária. *PNAS*, 2011, v. 108, n° 50, p. 20113–20118.
- King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et. al. Naturally acquired Duffy-binding protein protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 8363-8.
- Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-9
- Korbluth, A.; Sacher, D. B.; Salomon, P. Crohn's disease. In: Feldman, M.; Scharschmidt, B. F.; Sleisenger, M. *Gastrointestinal and liver diseases*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Company, 1998. cap. 101, p.1708-1734.
- Krieger, H., Morton, N. E., MR, M. P., Azevedo E. S., Freire-Maia, N. and Yasuda, N. Racial admixture in Northeastern Brazil. *Ann. Hum. Genet.*, 1965, Lond. 29, 113,.

- Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et. al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. Am J Trop Med Hyg. 1982, Nov;31(6):1291-3.
- Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, et. al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. Malar J. 2012 Jan 9;11:12.
- Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, De Carvalho ME, Curado I & Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2009, 80, 452–459.
- Lara, M.L., Layrisse, Z., Scorza, J.V., Garcia, E., Stoikow, Z., Granados, J. et. al. W. Immunogenetics of human american Cutaneous Leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. Hum. Immunol.1991, 30, 129-135.
- Lázaro, A.M., Moraes ME, Marcos CY, Moraes JR, Fernández-Viña MA, Stastny P. Evolution of HLA-Class I compared to HLA-Class II polymorphism in Terena, a South-American Indian Tribe. Hum. Immunol., New York, 1999, v.60, p.1138-1149.
- Layrisse, Z., Guedes, Y., Dominguez, E., Paz, N., Montagnani, S., Matos, M., et. al. A. Extended HLA haplotypes in a Carib Amerindian population: the Yucpa of the Perija Range. Hum. Immunol.,2001, 62: 992-1000.
- Le Bouteiller P.HLA-G: on the track of immunological functions. Eur J Immunogenet 1997, 24:397-408.
- López C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo M.A. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. Gene 2010, 467, 1–12.
- Liu B. ,Fu Y., Wang, Z., Zhou, S., Sun Y., Wu, et. al. HLA-DRB1 May Be Antagonistically Regulated by the Coordinately Evolved Promoter and 39-UTR under Stabilizing Selection, Plos One, 2011, v.6, issue 10, e25794.
- Maestre A, Muskus C, Duque V, Agudelo O, Liu P, Takagi A, et. al. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). Plos One. 2010, Jul 15;5(7):e11437.
- Maggioli E, Boiocchi C, Zorzetto M, Sinforiani E, Cereda C, Ricevuti G, et. al. The Human Leukocyte Antigen Class III Haplotype Approach: New Insight in Alzheimer's Disease Inflammation Hypothesis. Curr Alzheimer Res. 2013 Oct 23.
- Marsh, S. G. E. Parsham P, Barber LD. The organization of the HLA genes within the HLA complex. In: MARSH, S. G. E. et al. (Ed.). The HLA Facts Book. Great Britain: Academic Press, 2000. cap.3, p.7-13.
- Marsh,S.G.E, 2013 Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2012. Tissue Antigens, 81 (4), 253-7.
- Marsh S.G. E. Albert E.D, Bodmer W. F,Bontrop, R.E, Dupont, B, Erlich, H. A.,et. al. Nomenclature for factors of the HLA system, Tissue Antigens, 2010,75, 291–455.

- McFarland BJ, Beeson C. Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex. *Med. Res. Rev.* 2002, 22:168–203.
- Mchenry AM, Adams JH. The crystal structure of *P. knowlesi* DBPalpha DBL domain and its implications for immune evasion. *Trends Biochem Sci.* 2006, Sep;31(9):487-91.
- McMorran BJ, Wicczorski L, Drysdale KE, Chan JA, Huang HM, Smith C, et. al. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science.* 2012 Dec 7;338(6112):1348-51.
- Mcmanus, D. P., Ross, A. G. P., Williams, G. M., Sleight, A. C., Wiest, P., Erlich, H., et. al. HLA class II antigens positively and negatively associated with hepatosplenic schistosomiasis in a Chinese population. *Int. J. Parasit.*, 2001,31: 674-680.
- Menárd D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbao A, et. al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, Mar 30;107(13):5967-71.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 64: 97-106.
- Meny GM. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*, 2010, 26(2): 51-56.
- Mickelson E & Petersdorf EW. Histocompatibility. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Malden: Blackwell Publishing 2004: 31-42.
- Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammor M, et. al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2000; 61 (10): 1048-1052.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinnis MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy blood group genotype FyFy. *New England Journal of Medicine*, 1976; 295: 302-304.
- Michon PA, Arevalo-Herrera M, Fraser T, Herrera S, Adams JH. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 59, 597-599.
- Michon PA, Fraser T, Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*, 2000; 68: 3.164-3.171.
- Moise, K. J. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000, 92, 75-81.
- Moore S, Woodrow CF, McClelland DB. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy. *Nature*; 1982, 295:529–531.
- Mota M, Pradel G, Vanderberg J, Hafalla J, Frevert U, Nussenzweig R, et. al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*, 2001; 291:141-144.
- Michon P, Woolley I, Wood E, Kastens W, Zimmerman P, Adams JH. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett*, 2001, 495, 111-114.

- Middleton, D, Manavalan, JS, Fernandez- Vina, MA, eds. Human Immunology 2004: 65: 855–1272.
- Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Castro ZR, Nussenzweig RS, Schmeckpeper B, et. al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. J Infect Dis. 2000 Nov;182(5):1486-96.
- Nardin EH, Calvo-Calle JM, Oliveira GA, Nussenzweig RS, Schneider M, Tiercy JM, et. al. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. J Immunol. 2001 Jan 1;166(1):481-9.
- Nishimura W.E, Costallat L.T.L, Fernandes S.R.M, Conde R.A, Bertolo M. B. Associação do HLA-DRB5*01 com proteção contra manifestação cutânea da vasculite reumatoide em pacientes brasileiros, Rev Bras Reumatol, 2012;52(3):366-374.
- Ntumngia FB, Schloegel J, Barnes SJ, McHenry AM, Singh S. Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. Infect Immun. 2012, 80: 1203-1208.
- Oh, S. & Chishti, A. Host receptors in malaria merozoite invasion. Curr. Top. Microbiol. Immunol, 2005; 295: 203-232.
- Oliveira-Ferreira J. Pratt-Riccio L.R., Arruda M., Santos F., Ribeiro C.T.D, Golberg A. C, Banic D.M. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malária; Acta Tropica, 2004 92, 63–69.
- Oliveira-Ferreira, J, Lacerda, M.V.G., Brasil, P., Ladislau, J.L., Tauiu, P.L., Daniel-Ribeira, C.T., Malaria in Brazil: na overview., Malaria Journal, 2010, p. 1-15.
- Oon TN, Eng EO, Cheng CL, Piao JL, Lee CN, Pei SW, et. al. Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection, Singapore, Emerging Infectious Diseases, 2008; 14: 814-816.
- Palha TD, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos A, Guerreiro JF, De Moura LS, Santos S. Male ancestry structure and interethnic admixture in African-descent communities from the Amazon as revealed by Y-chromosome Strs. Am J Phys Anthropol. 2010, 144(3):471-8.
- Parolín M.L. and Carnese F.R. HLA-DRB1 alleles in four Amerindian populations from Argentina and Paraguay Genet Mol Biol. 2009 Apr-Jun; 32(2): 212–219.
- Patarroyo ME, Vinasco J, Amador R, Espejo F, Silva Y, Moreno A, et al. Genetic control of the immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum*. Parasite Immunol. 1991 Sep;13(5):509-16.
- Pena SD. Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine. Hist Cienc Saude Manguinhos 2005; 12(2): 321-46
- Perna SJ, Cardoso GL, Guerreiro JF. Duffy blood group genotypes among African-Brazilian communities of the Amazon region. Genet Mol Res, 2007, 6, 166- 72.

- Person KE. Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop.*2010, 114:138-143.
- Peter VE, Hong NV, Chantal VO, Indra V, Thang ND, Le XH, et. al. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malaria Journal*, 2009, 8:249 – 253.
- Petersdorf, E.W.; Anasetti, C.; Martin, P.J.; Hansen, J.A. Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens*, 2003, v.61, p.1- 11.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et.al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with Forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006; 62(4): 190-5.
- Prudêncio M, Rodriguez A, Mota M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 2006; 4, 849-856.
- Ranjan A. & Cnitis C. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96: 14067-14072.
- Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews | Microbiology*, 2013, v.11 oct,701-713.
- Robinson, J.; Waller, M. J.; Parham, P.; Bodmer, J.G.; Marsch, S. G. E. IMGT/HLA database – a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Nucleic Acid Research*, 2001, 29(1): 210-213.
- Ryan, J. R.; Stoute, J. A.; Amon, J.; Dunton, R. F.; Mtalib, R.; Koros, J.; et. al. Evidence for Transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy Antigen Negative Population in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75: 575-581.
- Salzano FM. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc.* 2002 Jun;74(2):223-63.
- Sánchez-Velasco P, Leyva-Cobián F. The HLA class I and class II allele frequencies studied at the DNA level in the Svanetian population (Upper Caucasus) and their relationships to Western European populations. *Tissue Antigens.* 2001 Oct;58(4):223-33.
- Senger, G., Ragoussis, J., Trowsdale, J. and Sheer, D. Fine mapping of the MHC class II region within 6p21 and evaluation of probe ordering interphase fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.*1993, 61, 49-53.
- Singh SK, Singh AP, Pandey S, Yazdani SS, Chitnis CE, Sharma A. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* Duffy binding domains necessary for erythrocyte invasion. *Biochem. J.* 2003; 374: 193–198.
- Sousa TN, Cerávolo IP, Fernandes Fontes CJ, Couto A, Carvalho LH, Brito CF. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006; 146(2): 251-254.

- Sousa T, Sanchez B, Cerávolo I, Carvalho L, Brito C. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. *Vox Sang*, 2007, 92: 373-380.
- Sousa, Taís Nóbrega. Duffy Binding Protein: análise da diversidade genética em isolados do *Plasmodium vivax* da Amazônia Brasileira. 2009. 141f. Tese (Doutorado) Centro de Pesquisa René Racho, Belo Horizonte.
- Sousa TN, Tarazona-Santos EM, Wilson DJ, Madureira AP, Falcão PR, Fontes CJ, et. al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J*. 2010 Nov 22;9:334.
- Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA, Cerávolo IP, Malafronte RS, Brito CF, et. al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2010 Feb; 82(2): 185-93.
- Sousa, T.N. Carvalho, L.H., Brito. C.F.A. Worldwide Genetic Variability of the Duffy Binding Protein: Insights into *Plasmodium vivax* Vaccine Development., *Plos One*, 2011, v.6, issue 8, p.e22944.
- Smolarek D, Bertrand O, Czerwinski M, Colin Y, Etchebest C, de Brevern AG . Multiple interests in structural models of DARC transmembrane protein. *Transfus Clin Biol*. 2010, Sep;17(3):184-96.
- Spínola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J. HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens*. 2005 Sep;66 (3):217-30.
- Srinivasana P., Beattyb W.L., Dioufa A., Herrerc R., Ambroggi X., J. Moche K.,et. al. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion PNAS | August 9, 2011, vol. 108, no. 32,13275–13280.
- Stephens H.A. Brown A.E., Chandanayingyong D., Webster H.K., Longta P., Vangseratthana R., et. al. The presence of the HLA class II allele DPB1*0501 in ethnic Thais correlates with an enhanced vaccine-induced antibody response to a malaria sporozoite antigen. *Eur J Immunol*. 1995 Nov; 25(11):3142-7.
- Storti-Melo L.M., da Costa D.R, Souza-Neiras W.C, Cassiano G.C., Couto V.S.C.D, Póvoa M. M., et. al. Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1,AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. *Acta Tropica*, 2012, 121 152– 155.
- Sturm A, Amino R, Van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et. al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, 2006; 313(5791): 1287-1290.
- Tadeu, L.M. F. Pathogenesis of dengue virus infections *Medicina*, Ribeirão Preto, Simpósio: virologia médica, 1999, 32: 15-20, Capítulo I.
- Tavares, J. *et al.* Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J. Exp. Med*. 2013, 210, 905–915.
- Temin J.,Marques G.D, Morgun A., Shulzhenko N., Rampim G.F.,Gerbase-DeLima M. Unpublished

- Thorsby E. Invited anniversary review: HLA Associated diseases. *Human Immunology*, 1997, 53: 1-11.
- Tjitra E, Anstey N, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et. al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *Plos Med*, 2008; 5: e128.
- Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Levankim C. Disruption of a gata motif in the duffy gene promoter abolishes erythroid gene-expression in duffy negative individuals. *Nature Genetics*, 1995a, 10, 224-228.
- Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartro J, Colin Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum Genet*, 1995b, 95, 407-410.
- Torres, Margareth Afonso. *Human leukocyte antigens (HLA): informações básicas para um hematologista*. In: HAMERSCHLAK, Nelson (Org.). *Manual de hematologia*, Barueri: Manole, 2010. cap. 55, p. 425- 430.
- Tran TM, Oliveira-Ferreira J, Moreno A. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:244–255.
- Trivedi, V.B.; Dave, A.P.; Dave; J.M.; Patel; B.C. Human Leukocyte Antigen and its Role in Transplantation Biology. *Transplantation Proceedings*, 2007, v.39, p. 688- 693.
- Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, Salzano FM, Rodriguez-Delfin LA, Zago MA, et. al. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Ache. *Tissue Antigens*, 2003, 62:512-526.
- Vanbuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M, Sevova ES, Bockarie M, King CL, et. al. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J. Infect. Dis.* 2004a; 190: 1556-1562.
- VanBuskirk KM, Sevova E, Adams JH. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004b; 101: 15.754-15.759.
- Vargas-Alarcón G, Granados J, Rodríguez-Pérez JM, Parga C, Pérez-Hernández N, Rey D, et. al. A. Distribution of HLA class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizo population: comparison with other populations. *Immunol Invest.* 2010 Jan;39(3):268-83.
- Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006; 16(4): 384-391.
- Xainli JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Adams JH. Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *Journal of Immunology*, 2002, 169: 3200-3207.
- Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, et. al. Analysis of the dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res.* 2003,13: 2621–2636.
- Yamauchi L, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 2007; 9: 1215-1222.
- Yannis Michalakis & François Renaud., *Malaria: Evolution in vector control*. *Nature*, 2009, 462, 298-300.

Yunis J.J. Yunis E.J., Yunis E.; MHC Class II haplotypes of Colombian Amerindian tribes; *Genetics and Molecular Biology*, 2013, 36, 2, 158-166

White NJ. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite *Clin. Infect. Dis.* 2008; 15:46(2): 172-73.

World Health Organization, World Malaria Report 2011. Ed. Who Press, W. H. O., Geneva, 2012. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/ Acesso em: 5 Dez 2013.

Woolley I, Hotmire K, Sramkoski R, Zimmerman P, Kazura J. Differential expression of the duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion*, 2000, 40, 949-953.

Zimmerman P, Woolley I, Masinde G, Miller S, Mcnamara D, Hazlett F, et. al. Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax* - endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 13973-13977.

Zúñiga J, Yu N, Barquera R, Alosco S, Ohashi M, Lebedeva T, et. al. HLA class I and class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations. *PLoS One*. 2013 Sep 23;8(9):e74442.