

Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de
Pós-Graduação em Biotecnologia

**Estudo das associações entre os sistemas ABO, Duffy,
antígenos RhD e a malária vivax em habitantes do Estado do
Amazonas, Brasil.**

SÉRGIO ROBERTO LOPES ALBUQUERQUE

Tese apresentada em 27/ 02/ 2009 ao
Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia-PPGBIOTEC da Universidade
Federal do Amazonas – UFAM, para
obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

Manaus, Fevereiro de 2009

Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de
Pós-Graduação em Biotecnologia

**Estudo das associações entre os sistemas ABO, Duffy,
antígenos RhD e a malária vivax em habitantes do Estado do
Amazonas, Brasil.**

Tese apresentada em 27/ 02/ 2009 ao
Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia-PPGBIOTEC da
Universidade Federal do Amazonas –
UFAM, para obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientadora:

Maria Cristina dos Santos. Biol. PhD.

Co-Orientadora:

Lilian Castilho. Biol. PhD

Manaus, fevereiro de 2009

A298a ALBUQUERQUE, Sérgio Roberto Lopes.

Estudo das associações entre os sistemas ABO, Duffy, antígenos RhD e a malária vivax em habitantes do Estado do Amazonas, Brasil: UFAM. 2009.

97 p. il.

Tese (Doutorado – Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

1. Sistema de Grupos Sanguíneos 2. Malária 3. Vivax 4. ABO 5. Rh 6. Duffy I. Sergio Roberto Lopes Albuquerque II. Título.

CDU: 616.15 (811.3)

Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de
Pós-Graduação em Biotecnologia.

Instituições Participantes neste estudo:

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM

Universidade de Campinas – UNICAMP

Ínicio: Março de 2005

Instituição Financiadora:

Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas- FAPEAM

Coordenador do Programa:

Professor Doutor José Odair Pereira

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família, a todo o corpo técnico e administrativo do Hemocentro do Amazonas e ainda a todo investigador que busca na ciência a esperança de um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Quero ser grato inicialmente ao Mestre de todos os Mestres, **Deus**, por ter me dado saúde e disposição para seguir neste tão precioso caminho da pesquisa; Aos meus Pais **Manoel Fernandes Albuquerque (In memoriam)**, **Maria Ilzimir Lopes Albuquerque**, à minha esposa **Andrea Queiroz**, minha filha **Mariah Albuquerque** e filho **Lucca Albuquerque**, por terem sempre me dado força e alegria para continuar a busca do conhecimento; ao **Dr. Nelson Abraham Fraiji**, por ter me colocado no caminho da Imunohematologia e da Pesquisa; a toda equipe técnica e administrativa do HEMOAM representada aqui por sua Presidente **Msc. Leny da Mota Passos**, pelos incentivos e pela disponibilização dos equipamentos e área física desta renomada instituição para a realização desta pesquisa; ao **Dr. Spartaco Astolfi Filho**, idealizador do programa de Pós Graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, tão bem sucedido em seus objetivos; à **Dra. Maria Cristina dos Santos** - UFAM, minha orientadora, a **Karina e Débora** da técnica do laboratório de biologia molecular do Hemocentro da Universidade de Campinas-UNICAMP, à **Dra Lillian Castilho**, minha co-orientadora, que com carinho me ajudou a fazer a transferência da tecnologia de genotipagem de grupos sanguíneos para o HEMOAM, aos componentes da banca de qualificação desta tese: **Dra. Maria das Graças Costa Alecrim** (Uniniltonlins), **Dra. Thania Vergínia Guaicurus** (Fiocruz-AM) e **Dr. Wanderley Pedro Tadei** (Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia-INPA), ao **Dr. Ricardo L.D. Machado** (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP) e **Msc Franklin Simões** (Hospital de Medicina Tropical de Manaus-HMTM), pelas pérolas presenteadas a esta tese durante a revisão da mesma, à equipe do HMTM, **Marli M. Marques**, **Msc Mônica Regina Costa Manso**, **Msc Márcia Araújo Alexandre**, pelo auxílio na obtenção das amostras utilizadas neste estudo, ao **Rommel Abel de Vasconcelos** (Expansão Diagnóstico), pelo auxílio para a execução técnica deste estudo, à minha incansável equipe técnica, composta por **Edalton Cesar Bezerra Sanguino**, **Luciana Correa Tezza**, **Laise Kelman Costa Magalhães** e **Fernanda Chacon**; Aos Estatísticos **Felician Gonçalves Vasques** (HEMOAM) e **Edson da Fonseca de Lira** (HEMOAM).

BANCA DA QUALIFICAÇÃO DO PROJETO

Doutora Maria das Graças Costa Alecrim (UNINILTON LINS-AM).

Doutora Thania Vergínia Guaicurus (Fiocruz-RJ).

Doutor Wanderley Pedro Tadei (INPA).

BANCA DA DEFESA DA TESE

Professora Doutora Maria Cristina dos Santos (Presidente da Banca – UFAM).

Doutor Paulo Afonso Nogueira (Fiocruz-AM).

Professor Doutor Ricardo Luiz Dantas Machado (Famerp, São José do Rio Preto, SP).

Doutora Flor Ernestina Martinez-Espinosa (IMTM-AM).

Professor Doutor Luiz Fernando de Souza Passos (UFAM).

SUMÁRIO

	Página
1. Resumo	09
2. Abstract	10
3. Introdução	11
4. Objetivos	33
5. Casuística e Métodos	34
5.1 Casuística	34
5.2 Métodos.....	36
5.2.1 Métodos laboratoriais.....	38
6. Resultados	43
7. Discussão	51
8. Conclusões	69
9. Referências Bibliográficas	70
10. Anexos	80
Protocolo 01 - Fenotipagens ABO, Rh e Duffy.....	81
Protocolo 02 - Genotipagem Duffy.....	83
Protocolo 03 - Imunofluorescência Indireta.....	90
Protocolo 04 - Ficha de Avaliação de Paciente (FAP).....	91
Protocolo 05 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	95

1. Resumo

Estudo das associações entre os sistemas ABO, Duffy, antígenos RhD e a malária vivax em habitantes do Estado do Amazonas, Brasil.

A malária é a mais importante doença parasitária do mundo, tendo exercido um forte efeito na evolução humana com um crescente corpo de evidências indicando que tanto o risco de adquirir esta infecção, quanto o de desenvolver severas complicações, tem sido determinado por fatores genéticos do hospedeiro e do parasito infectante. Isolados selvagens de parasitas de malária tem mostrado uma maior variabilidade para invadir hemácias humanas quando comparados com os cultivados em laboratórios, mostrando que em áreas endêmicas, estes podem ter desenvolvido diferentes habilidades para invadir particulares tipos de hemácias. Existem na literatura, resultados controversos quanto a associação entre o sistema ABO, antígenos Rh e a malária vivax, porém já foi bem demonstrada a importância da glicoproteína eritrocitária Duffy na invasão de hemácias humanas por merozoítos de *Plasmodium vivax*, entretanto ainda sendo pouco conhecido se mutações nesta glicoproteína podem estar associadas à frequência de infecção do *P. vivax* ou na densidade parasitária da malária vivax. Neste estudo investigamos associações entre o sistema sanguíneo ABO, antígeno RhD, as mutações da proteína Duffy (125 G>A (*FYA/FYB*) 265 C>T e 298 G>A (antígeno Fy^x) e do promotor GATA box, -33(T>C),) e a malária vivax, em habitantes do Estado do Amazonas, Brasil. Neste estudo, tanto a identificação do *P. vivax*, como a verificação das densidades parasitárias na malária vivax, foi determinada por testes microscópicos e leucometria em 497 pacientes infectados, nos quais foram realizadas fenotipagens dos sistemas ABO, Duffy antígeno RhD pela técnica da hemaglutinação, assim como as genotipagens do sistema sanguíneo Duffy pela técnica da PCR/RFLP. As possíveis associações entre as frequências encontradas dos sistemas sanguíneos citados e a malária vivax foram analisadas através do teste *qui* quadrado, assim como as possíveis associações das genotipagens Duffy com o nível de densidades parasitárias encontradas foram analisadas através do teste de kruskal wallis. Nossos dados mostraram, que a presença do antígeno A, genótipos *FYA/FYB-33* e *FYB/FYB-33* pode ser uma vantagem seletiva na população, reduzindo a taxa de infecção pelo *P. vivax* nesta região, porém sem estarem associados ao nível de densidade parasitária das infecções de malária. Não encontramos associação entre o antígeno RhD e a susceptibilidade ao *P. vivax*, no entanto os genótipos *FYA/FYB*, *FYA/FYA* mostraram-se associados ao aumento da frequência de infecção pelo *P. vivax* na região estudada. Os genótipos *FYB/FYX* e *FYA/FYX* não mostraram-se associados à frequência de infecção pelo *P. vivax*, mas sim aos baixos níveis de densidades parasitárias encontrada entre os pacientes infectados com este genótipo. Reportamos, ainda, neste estudo, indivíduos com o genótipo *FYB-33/FYB-33* com antecedentes de malária vivax. Estes resultados sugerem que, em regiões endêmicas de malária, pode estar havendo adaptações naturais tanto quanto ao surgimento de mecanismos parciais de defesa contra o *Plasmodium vivax* distintos dos já descritos em descendentes africanos como adaptações que podem estar também levando a um aumento a susceptibilidade a este tipo de malária.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, ABO, Rh, Duffy, hemácias, mutações, grupos sanguíneos, susceptibilidade.

2. Abstract

Study of associations between ABO, Duffy blood group system, Rh antigen and vivax malária in inhabitants of Amazonas State, Brazil

Malaria is the most significant infectious disease in the world, having displayed a strong impact on human evolution with a increase body of evidences indicating that the host's genetic factors and the infectant's parasite genotype have been associated with the risk of infection as well as the risk of developing severe complications due to malaria. Malaria parasite wild isolates have shown a higher capacity of invasion than those cultured in laboratories, showing that in endemic areas, malaria parasites can develop different abilities to invade particular red blood cells. There are, in the literature, controversies results regarding the association between the ABO system, RhD antigens and the malaria vivax frequency, otherwise, it has been demonstrated the importance of glycoprotein Duffy in the human red cells invasion process by *Plasmodium vivax* merozoites, Nevertheless, little is known if mutation on these glycoprotein can be associated with the either *P. vivax* infection frequency or with malaria vivax parasitic density. In this study we investigated the associations among ABO blood group, RhD antigen, Duffy protein mutations (125 G>A (*FYA/FYB*), 265 C>T, 298 G>A (*Fy^x* antigen) and the GATA box mutation 33(T>C),) and the vivax malária in inhabitants of Amazonas State, Brazil. Verifications of *P. vivax*, as well as, the definition of parasitism were determinate by standard screening tests in 497 patients in which we performed ABO, Rh and Duffy phenotypings, as well as, Duffy blood group genotypings with PCR / RFLP reactions. These results were compared through *qui* square test with previously published results of the same variables in blood donors from Brazilian Amazon, without malaria antecedents, as well as through Kruskal-Wallis test to compare the parasitism level among diferents Duffy blood goup genotypes, including some mutations already previoudy described. Our data showed that the presence of A antigen, *FYA/FYB-33* and *FYB/FYB-33* genotypes in the population, may be a selective advantage, reducing the frequency of *P. vivax* infection in the studied area, however without association with parasitism levels of malaria vivax infection We did not find associations between RhD antigen and *P. vivax* susceptibility, however the presence of *FYA/FYB* and *FYA/FYA* genotypes showed to be associated with the rise of the frequency of *P. vivax* infection in the studied area. The *FYB/FYX* and *FYA/FYX* did not show association with the frequency of *P. vivax* infection, but it showed to be associated with the low levels of parasitism found among the infected patients with these genotypes. In this study we reported two *FYB-33/FYB-33* individuals without previous history of malaria. These results suggest that natural adaptations, in malaria endemic regions, could be leading the arising of partial defense mechanisms against *Plasmodium vivax*, different of the previously described in Africans descents, as well as, adaptations that could be increasing the susceptibility of human been to this kind of malaria.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, ABO, Rh, Duffy, Red blood cells, mutations, Blood groups, susceptibility.

3.INTRODUÇÃO

A Malária

A malária é a mais importante doença parasitária do mundo, tendo exercido um forte efeito na evolução humana. As seleções para resistência contra esta doença têm liderado o surgimento e a persistência de um número de doenças hereditárias afetando as hemácias como as hemoglobinopatias que levam ao enrijecimento da membrana eritrocitária (OMS, 2008).

Um crescente corpo de evidências indica que tanto o risco de adquirir infecções, como o risco de desenvolver graves complicações, tem sido atribuído tanto aos fatores genéticos do hospedeiro quanto ao genótipo do parasito infectante (OMS, 2008).

A especificidade, dos parasitos da malária pelas hemácias, parece depender do número de interações entre os ligantes parasitários e os receptores eritrocitários, alguns dos quais foram recentemente definidos (OMS, 2008).

Isolados selvagens de parasitas de malária podem mostrar uma maior variabilidade de vias de invasão quando comparados com os cultivados em laboratório, cujas vias de penetração estão quase totalmente definidas, mostrando que, em áreas endêmicas, os parasitos de malária podem ter desenvolvido diferentes habilidades para invadir particulares tipos de hemácias com o objetivo de aumentar a variabilidade de vias de penetração em células hospedeiras (OMS, 2008).

Portanto, a variabilidade de sequência, assim como as expressões de diferentes membros das famílias de proteínas de ligantes parasitários, resulta em populações de parasitos com diferentes capacidades de invasão eritrocitária, o que é uma desvantagem para a raça humana, pois estes acontecem em uma maior rapidez em relação aos novos polimorfismos das moléculas da superfície eritrocitária e com a resposta imunológica que são importantes do ponto de vista da defesa inata contra a malária (OMS, 2008).

O risco de infecção malárica está ligado ao desmatamento de áreas rurais para empreendimentos tais como: construções de estradas, explorações de minérios, madeira para projetos de agricultura e irrigação, particularmente, em áreas de fronteiras como a da Amazônia e na região sudeste da Ásia (OMS, 2008).

Outras causas para o aumento de risco de malária incluem: mudanças climáticas globais e migração de pessoas para assentamentos na periferia das cidades (invasões, conglomerados habitacionais, etc). As cepas de parasitas emergentes que são resistentes às drogas utilizadas no tratamento, também exacerbam a situação (OMS, 2008).

A malária é uma doença curável, se prontamente diagnosticada e adequadamente tratada. Seus agentes causais, em humanos, são quatro espécies de Protozoa do gênero *Plasmodium* sp.: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Destes, mundialmente o *P. falciparum* é o agente responsável por maior mortalidade (OMS, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (ano), 109 países e territórios relataram ter áreas de risco de transmissão da malária onde 3,2 bilhões de pessoas estão

expostas a enfermidade.

Excetuando-se o continente africano (África Subsaareana), o *Plasmodium vivax* é responsável por 55% dos casos mundiais de malária, predominando no sudeste da Ásia, na Índia e nas Américas Central e do Sul. Setenta e cinco por cento (75%) das formas clínicas ocorrem na Ásia, incluindo o Oriente Médio, 15%-20% nas Américas Central e do Sul e 5%-15% na África (Miller et al., 2002; Pukrittayakamee et al., 2004).

Nas Américas, no ano de 2006, foram notificados 917.828 casos de malária, sendo que 59,7% no Brasil, 13,5% na Colômbia (OMS, 2008). No Brasil, a malária figura como uma das principais endemias parasitárias, sendo a Região Amazônica responsável por 99,8% dos casos notificados no país, cujas notificações registradas em 2007 foram de 457.466 casos (73,4 % pelo *P.vivax*), havendo uma redução de 16,6 % no total de casos em relação a 2006 (BRASIL, 2008).

Na maioria dos Estados amazônicos brasileiros, a maior incidência é no período de junho a setembro. Em 2007, a incidência parasitária anual da malária (IPA) do país foi de 18,7/1000 habitantes. No mesmo ano, entre 202.727 casos notificados no Estado do Amazonas, o *Plasmodium vivax* foi responsável pelo maior número de adoecimento - 197.147 (82,0 %) (BRASIL, 2008).

Na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM - foram observados em 2007, 14.249 adoecimentos com predomínio da malária vivax – está representando 88,15% do número total de casos (BRASIL, 2008).

Os Grupos Sanguíneos

Extensivo estudo de polimorfismos de grupos sanguíneos em diferentes regiões geográficas tem estimado que a contribuição africana para a população urbana americana é de 4% a 34% e a de origem Ameríndia de 0% a 27% (Sans et al., 2000). Estudos de frequências dos sistemas sanguíneos ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS na população brasileira diferem nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Norte (Novaretti et al., 2000; Castilho et al., 2004). Por exemplo, 3,39% dos doadores de sangue do Estado do Amazonas são Duffy negativo, segundo os dados do laboratório de Imunohematologia do HEMOAM, em 2008, diferente das frequências encontradas em outras regiões brasileiras e mundiais, que são de 0,1% a muito raro (Dvorak et al., 1975). O alto grau de combinações genéticas, devido à miscigenação racial em nosso país, facilita a geração de novos alelos. Castilho e colaboradores (2004) descobriram novos alelos para o sistema Duffy em índios e descendentes de africanos que vivem na Amazônia.

Sistema ABO

É o sistema sanguíneo mais importante do ponto de vista transfusional. Os glicoesfingolípídios carreando oligosacarídeos A e B fazem parte integral da membrana das hemácias, plaquetas e muitas proteínas circulantes. Como sistema de histocompatibilidade, os antígenos ABO também estão presentes em muitos tecidos incluindo endotélio, rins, coração, intestino, pâncreas e pulmão. Líquidos corporais tais como saliva contêm moléculas de glicoproteínas que podem, se a pessoa possuir o gene *Se* (*Secretor*), carrear oligosacarídeos idênticos. Os oligosacarídeos A e B não ligados a uma proteína carreadora ou moléculas lipídicas que são também encontradas no leite e

urina (Holgersson et al., 1992; Marionneau et al., 2001).

O sistema ABO contém quatro fenótipos principais: A, B, O e AB, sendo estes determinados pela presença ou ausência de dois antígenos (A e B) nas hemácias. Este sistema é também caracterizado pela presença ou ausência de anticorpos de ocorrência natural, chamados isoaglutininas: anti-A, anti-B e anti A,B; sendo sua presença inversalmente recíproca a ausência ou presença dos antígenos A e B. Por exemplo: indivíduos do grupo O, que não possuem os antígenos A e B nas hemácias, possuem os anticorpos anti-A e anti-B. Existem hipóteses que descrevem o ambiente bacteriano do intestino como a fonte da imunização para a ocorrência natural destas isoaglutininas (Springer, 1971).

O gene *ABO* está localizado no cromossoma 9q34, consistindo de 7 exons com 18 kb (Yamamoto, 2004; Kominato, 2004), estando o promotor localizado primariamente nos exons 6 e 7. A expressão do gene ABO é regulada por alguns mecanismos como metilação, transcrição do fator de ligação de proteínas em tecidos específicos e um minisatélite potencializador na região de 4 kb do exon 1 (Yamamoto, 2004; Kominato, 2004), gene *H*, o qual é responsável pela síntese do antígeno substrato H, que é o precursor dos antígenos A e B (Daniels, 2002).

O gene *ABO* codifica glicosiltransferases que produzem os antígenos A e B, respectivamente. O gene *O* não codifica uma enzima funcional. As hemácias de pessoas do grupo O não possuem antígenos A e B, mas carregam uma quantidade abundante de antígeno H (Daniels, 2002). O alelo ativo no locus *H*, produz uma glicosiltransferase que atua em nível celular formando o antígeno no qual A ou B é

construído. O alelo amorfo *h*, é muito raro (Daniels, 2002).

As cadeias de oligosacarídeos, nas quais os açúcares imunodominantes A ou B estão ligados, podem existir como simples repetições de algumas moléculas de açúcar ligadas em forma linear, ou como parte de estruturas mais complexas, com muitos resíduos de açúcar ligados em cadeias ramificadas (Daniels, 2002; Svensson et al., 2004).

Yamamoto, (2004) demonstrou que genes *A* e *B* diferem um do outro por sete substituições simples de bases, resultando em quatro possíveis substituições de aminoácidos (nas posições 176, 235, 266 e 268) na sequência protéica das transferases A e B. As substituições nas posições 266 e 268 são as mais significantes para a determinação de especificidade de açúcar, apesar de que as substituições na posição 235 também tem algum efeito.

Os alelos de *A* e *B* que resultam em subgrupos (Fenótipos de A e B que expressam baixos níveis de antígenos) podem ter mutações adicionais que resultam em enzimas com habilidades reduzidas para converter antígeno H. A deleção de um único nucleotídeo foi encontrada nos genes *A2* perto do terminal carboxil da sequência da transferase A. Como resultado da mudança de formato, a especificidade da glicosiltransferase pelo gene *A2*, esta possui um domínio extra de 21 aminoácidos. Este domínio parece ser responsável para a baixa atividade transferase e de reconhecimento de substrato desta enzima. Subsequentemente, um número de outras substituições no gene *A* tem sido demonstradas por resultados em fenótipos *A2* de diferentes amostras.

A sequência de base do gene *O* parece ser mais similar do que de *A*. Pelo menos três mecanismos tem sido mostrados levando a produtos inativos. A substituição de glicina por arginina no aminoácido 176 com ou sem substituição concomitante de arginina por glicina na posição 268 tem sido observado. Em um outro indivíduo, uma deleção de base no nucleotídeo 261 resultou em uma proteína truncada inativa. Todas as variações de fenótipos A e B tem sido demonstrado como mutações dos genes *A* ou *B*, resultando em uma transferase menos efetiva.

Apesar destes antígenos serem detectados em hemácias de embriões de 5 a 6 semanas, estes ainda não estão completamente desenvolvidos ao nascimento, provavelmente por que as estruturas ramificadas de oligosacaríde desenvolve-se gradualmente até dois ou quatro anos de idade. Quando a expressão dos antígenos A e B está completamente desenvolvida estes permanecem constantes por toda a vida(Klein & Anstee, 2005).

Sistema Duffy

O maior avanço no conhecimento do sistema de grupo sanguíneo Duffy foi alcançado com a clonagem do gene *FY*, localizado na região 1q22->q23 do cromossoma 1. O produto do gene *FY* é uma glicoproteína (gp-Fy), a qual atravessa a membrana da hemácia nove vezes, possuindo um domínio extracelular N-terminal e um domínio intracelular C-terminal (Pogo & Chaudhuri, 2000).

A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não eritróides como o rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cerebelo (Chaouduri et al., 1995; Hadley

et al., 1997; Hesselgersse et al., 1999). As células responsáveis pela expressão de Duffy nesses tecidos são as células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares, exceto no cérebro, onde a expressão Duffy está localizada nas células de Purkinje (Hadley et al., 1994; Piper et al., 1995; Neote et al., 1993).

O sistema consiste de quatro alelos, cinco fenótipos e cinco antígenos. Os alelos são: *FYA*, *FYB*, *FY0* e *FYB fraco*; os fenótipos: Fy(a+b-), Fy(a- b+), Fy(a+b+), Fy(a- b(+)) e Fy(a-b-) e os antígenos: Fy^a, Fy^b, Fy³, Fy⁵ e Fy⁶ (Pogo & Chaudhuri, 2000).

Indivíduos Duffy negativo Fy(a-b-) não possuem a proteína Duffy, na membrana das hemácias, sendo este fenótipo predominantemente encontrados em africanos e americanos negros. Em alguns casos de indivíduos Fy (a-b-) não negros, uma mutação “nonsense” evita a síntese da gp-Fy. Nas hemácias Fy (a-b(+)), o antígeno Fy^b é fracamente expresso devido a uma reduzida quantidade de proteína (Pogo & Chaudhuri, 2000).

Horuk e colaboradores (1993) mostraram, em um estudo sobre receptores de quimiocinas multiespecíficos em eritrócitos humanos, que a IL-8 (atualmente CXCL-8), liga-se minimamente a eritrócitos Duffy negativos, os anticorpos monoclonais para antígenos Duffy bloqueavam a ligação de IL-8 em eritrócitos Duffy positivo, e também a IL-8 impedia a ligação e a invasão por *Plasmodium knowlesi* em hemácias, levando a diversas linhas de evidências, indicando que os antígenos de grupo sanguíneo Duffy são receptores de quimiocinas.

Outros estudos estabeleceram a relação entre receptores de quimiocinas nos

eritrócitos humanos e antígenos Duffy, por alinhamento da sequência da proteína Duffy com outros membros da família de quimiocinas (Neote et al., 1994; Chauduri et al., 1994; Murphy, 1994).

Foi visto também que a organização dos dois exons *FY* é a mesma encontrada nos genes de outros receptores de quimiocinas. A partir de então, os antígenos eritrocitários Duffy foram denominados DARC (Duffy Antigen Receptor Chemokines), (Neote et al., 1994; Chauduri et al., 1994; Murphy, 1994).

A IL-8 é o ligante do DARC eritróide mais intensivamente estudado, é de baixo peso molecular, com aproximadamente 8kDa, e é produzida pela maioria das células do organismo, particularmente por macrófagos e células endoteliais, sendo envolvida na migração celular. A IL-8 (CXCL8) é conhecida por ser um potente indutor de quimiotaxia para neutrófilos. Após sua introdução na circulação, a IL-8 é rápida e eficientemente ligada ao DARC eritróide, ficando incapaz de ativar neutrófilos e, desse modo, o DARC eritróide pode funcionar como um "escoadouro" para a IL-8 lançada na circulação (Van der Laken et al., 1998; de Winter et al., 1997).

Assim, a absorção de IL-8 nos eritrócitos pelo DARC pode funcionar como uma limitante da estimulação de leucócitos pela diminuição da IL-8 sanguínea (Darbone et al., 1991).

A ausência do DARC eritróide em indivíduos Duffy negativo consequentemente reduz a capacidade de ligação da IL-8 aos eritrócitos (Horuk., 1993).

O significado biológico do DARC nos eritrócitos inicialmente pareceu questionável, devido à falta de associação entre doenças e fenótipo Duffy negativo (Pogo & Chauduri, 2000). Porém, a relação função-estrutura e a localização do DARC na fisiologia normal e patológica ainda permanecem um campo vasto para novas descobertas.

A localização do DARC nas células endoteliais das vênulas pós-capilares aliada a sua capacidade de fixar as quimiocinas sugere que essa proteína pode ter um papel na cascata inflamatória, participando na formação do gradiente de quimiocinas que permite lançar os leucócitos linfócitos na circulação para os sítios de inflamação (Tournamille, 2000).

A diminuição da função renal após transplante está mais associada à pacientes com fenótipo Fy(a-b-), que pode ser devido a ausência de receptores DARC, que faz o papel de atenuar os efeitos inflamatórios, agindo como um escoadouro de quimiocinas (Alkalin & Neylan, 2003).

Os antígenos Fy^a e Fy^b são codificados por duas formas alélicas do gene *FY*. Os alelos *FYA* e *FYB* diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo *FYA*, a base é guanina (G) e no alelo *FYB* a base é adenina (A), produzindo um códon, no alelo *FYA*, para glicina (aminoácido 42 da seqüência protéica), e um códon para o ácido aspártico, no alelo *FYB*. Essa substituição de um aminoácido no domínio aminoterminal da proteína é suficiente para definir os dois antígenos antitéticos (Chauduri et al., 1995; Mallinson et al., 1995). Essa variação leva à identificação dos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+) (Tournamille et al., 1995b).

Shimizu e colaboradores (2000) investigaram várias etnias de regiões da Tailândia e da Indonésia, verificando a alta incidência do alelo *FYA* (>0,9) e a presença do novo fenótipo Fy(a(+)-), dados similares aos encontrados em estudos fenotípicos anteriores, realizados na região do sudeste asiático e na Oceania. Chama a atenção que os indivíduos Fy(a(+)-) apresentaram genotipagem *FYA/FYA* e os Fy(a-b-) apresentaram genotipagem *FYA/FYA* ou *FYA/FYB*, por PCR-RFLP (do inglês Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Long Polymorfism) utilizando as enzimas de restrição *BanI* e *StyI*, porém os mecanismos genéticos que causam esses fenótipos não foram determinados. As implicações da presença desses fenótipos encontrados ainda são desconhecidas, mas sugerem que em regiões endêmicas de malária, também há mecanismos de defesa para a infecção do *Plasmodium vivax*, distintos dos encontrados em descendentes africanos.

Parasol e colaboradores (1998) descreveram uma nova mutação presente na sequência do código do gene *FY*B* (271C>T), que está associada com alguns fenótipos Fy(b-) entre os judeus de grupo não Ashkenazi e negros brasileiros. A mutação está presente em indivíduos Fy(b-) que apresentam a sequência GATA normal associada à outra mutação no gene *FYB* (304 G>A). A substituição 271 C>T, representa uma mudança considerável na estrutura química da molécula (Arg91>Cys), a qual pode afetar os determinantes antigênicos do sistema Duffy, assim como, sua significância clínica. Esta mutação pode ter implicações em alguns papéis fisiológicos do sistema Duffy e ser de interesse na pesquisa de malária e em estudos genéticos populacionais.

Segundo Castilho e colaboradores (2004), o polimorfismo de único nucleotídeo no promotor GATA box, na posição -33(T>C) do gene Duffy em negros, silencia a

expressão do gene *FY*B* em eritrócitos e a substituição 265 C>T, junto com 298 G>A, enfraquece o antígeno Fy^b , sendo este antígeno conhecido como Fy^x . Indivíduos com estes fenótipo/genótipos que recebem sangue $Fy(b+)$, não se aloimunizam para o Fy^b , porque na presença da mutação 265T, o antígeno Fy^b está expresso fracamente nas hemácias, e no caso da mutação -33C, outros tecidos expressam a proteína Duffy e provavelmente o antígeno Fy^b .

Langui & Bordin (2006) verificaram em amostras de sangue de habitantes do Estado do Amazonas, a mutação -33C associada ao gene *FYA* levando a um fenótipo $Fy(a-b-)$, o que é incomum, pois normalmente este fenótipo é devido à mutação -33C associada ao gene *FYB*.

Antígeno Rh

O sistema Rh é complexo, com 54 antígenos descobertos, certo aspecto de sua genética, nomenclatura e interações antigênicas ainda não são completamente entendidos. O termo RH(D) positivo ou RH(D) negativo refere-se à presença ou ausência do antígeno “D” nas hemácias. O fator Rh(D) foi primeiramente descoberto no macaco *Rhesus* (*Macaca mulata*), cujo sangue, quando injetado em coelhos, provocava a formação de anticorpos anti-RH(D), aglutinando o sangue destes. Posteriormente descobriu-se que numa certa porcentagem de humanos (mais ou menos em 85% dos brancos) havia a presença destes antígenos nas hemácias. Denominaram-se tais indivíduos de RH(D) positivos; os demais, que não apresentavam estes antígenos nas suas hemácias foram denominados de RH(D) negativos (Levine et al., 1941; Wagner et al., 1999).

Sabe-se que o fator Rh(D) é um caráter mendeliano dominante. Assim, indivíduos RH(D) positivo tem genótipo RR (homozigoto) ou Rr (heterozigoto dominante) e indivíduos RH(D) negativos tem genótipo rr (recessivo) (Levine et al., 1941; Wagner et al., 1999).

A importância clínica reside no fato de ser o antígeno eritrocitário mais importante na prática transfusional. Pessoas Rh(D) negativos nem sempre possuem o anticorpo correspondente. A formação do anticorpo anti-D ocorre devido à exposição ao antígeno Rh(D) através de transfusão de sangue, gravidez. O antígeno Rh(D) é muito imunogênico, aproximadamente 80% das pessoas Rh(D) negativo que receberam uma transfusão de sangue Rh(D) positivo desenvolvem anticorpo anti-Rh(D) (Levine et al., 1941).

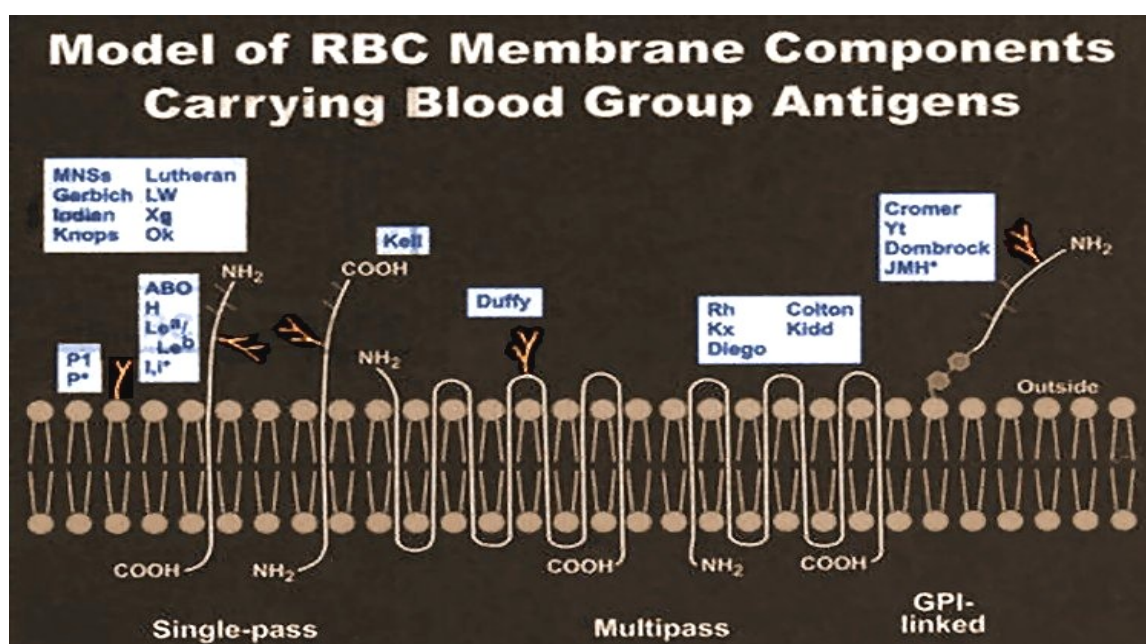
Dois genes homólogos no braço curto do cromossomo 1 codificam o polipeptídio não glicosilado, que expressa a atividade do antígeno Rh. Um, denominado RHD, expressa o antígeno D na membrana da hemácia. Indivíduos Rh(D) positivos possuem um ou dois exemplos desses genes. Indivíduos Rh(D) negativos não o possuem. A ausência de um alelo antitético explica por que, após décadas de procura nunca foi detectado o antígeno “d” (Tippet, 1986).

Em um outro locus adjacente, o gene RHCE determina os antígenos C,c,E e e. Seus alelos são RHCE, RHCE, RHcE e RHce. Estudos recentes sugerem que ambos C/e e E/e residem em um único produto polipeptídico (Tippet, 1986).

O produto de ambos *RHD* e *RHCE* são proteínas de 416 aminoácidos que atravessam a membrana da hemácia 12 vezes e expõem somente pequenas partes de aminoácidos no exterior. Os polipeptídeos não carregam resíduos de carboidratos. O estudo de hemácias Rn nulas (que não possuem antígenos Rh) revela que as proteínas Rh são partes de um largo complexo membranário, no qual a presença de proteínas Rh aparenta ser essencial para a expressão correta ou apresentação de outros constituintes (AABB Technical manual, 16^o ed,2008).

As glicoproteínas dos antígenos do sistema LW, Duffy e U todas necessitam da presença da proteína Rh para sua completa expressão. Células Rh nulas não possuem antígenos do sistema LW, são negativas para o F5 do sistema Duffy e possuem uma fraca expressão de antígenos carregados na glicoproteína B (S, s e U) (Blumenfeld; Patmaik, 2004).

Figura 1. Modelo dos componentes da membrana das hemácias carregando sistemas de grupos sanguíneos.



(ME Reid, 2004)

Grupos Sanguíneos e Malária

Após a evidência que hemácias dos grupos A, B ou AB, parasitadas com *Plasmodium falciparum*, formavam rosetas mais rapidamente em relação às hemácias do grupo O (Udomsangpetch et al. 1989, 1993, Carlson & Wahlgren 1992, Barragan et al. 2000), diversos estudos tem buscado associações entre o sistema ABO e o número de episódios de infecções pelo *P. falciparum*, apesar que, diversos estudos em diversas populações do mundo reportam a ausência de associações entre o sistema ABO e infecção de malária, sem especificar o tipo (Osisanyia 1983, Singh et al., 1986 Bayoumi et al. 1986, Montoya et al. 1994).

No Zimbawe, o grupo sanguíneo A foi associado tanto com baixos níveis de hemoglobina, como com severa malária falciparum, em nível de sistema nervoso central com coma (Fisher & Boone 1998) e, no Brasil, uma significativa associação entre o antígeno B e o número de episódios de malária (Santos et al. 1983).

Rowe e colaboradores (2007) observaram em 567 amostras de sangue de crianças com malária, causada pelo *Plasmodium falciparum*, que o grupo O estava presente apenas em 21% dos casos severos de malária comparados com as frequências de 44-45% dos casos controle com malária não complicada e indivíduos saudáveis, demonstrando assim, uma significativa evidência do efeito protetivo do grupo O na infecção de *Plasmodium falciparum*.

Em estudo realizado em Camarões (África), por Nkuo-Akenji e colaboradores (2004), no qual investigaram em 121 indivíduos o efeito dos sistemas sanguíneos ABO/

Rh, genótipos de hemoglobina e atividade de G-6-P-D na parasitemia e densidade parasitária da malária. O diagnóstico laboratorial da malária foi realizado por meio da gota espessa. A maior prevalência de malária, 74,5%, foi encontrada em indivíduos do grupo O e a mais baixa foi encontrada em indivíduos do grupo B, porém a média de densidade parasitária entre os diversos grupos sanguíneos não foi significativamente diferente. Os resultados sugeriram que indivíduos do grupo O, que possuem hemoglobina HbAA e mostram atividade enzimática de G-6-P-D podem ser mais susceptíveis à malária por ambos os plasmódios.

Beigelman e colaboradores (2003) analisaram os aspectos epidemiológicos da malária para 182 indivíduos ribeirinhos da Amazônia (Porto Velho, RO, Brazil). Trinta polimorfismos genéticos foram investigados, estando entre eles, os sistemas ABO, Rh e Duffy. Os resultados indicaram que o sistema Duffy está associado com a susceptibilidade à malária, como observado em outras áreas endêmicas. Além disto, houve a indicação de que o loci Rh pode estar significativamente associado com a resistência à malária.

A invasão de hemácias pelos parasitos da malária ocorre quando o merozóito se liga a superfície de hemácias não infectadas. Este rápido processo inclui fases de reconhecimento e ligação seguidos por reorientação e penetração (Bannistre; Mitchell, 2003), invadindo especificamente as hemácias.

A especificidade demonstrada dos parasitos de malária, pelas hemácias de particular tipo e idade, parece depender do número de interações entre ligantes e receptores. Algumas dessas interações foram recentemente definidas, como os antígenos

do sistema sanguíneo Duffy que são os receptores para os ligantes do *Plasmodium knowlesi* e do *Plasmodium vivax* os quais contêm os domínios DBL (Duffy Binding Ligand), em uma região caracterizada pela presença de 12 resíduos conservados de cisteína, com sequências ricas em triptofano e tirosina (Rajan & Chitnis et al., 1999).

Barnwell & Wartheimer (1989) concluíram que a glicoproteína eritrocitária carreando os determinantes Duffy é necessária, como ligante, para a invasão de hemácias humanas por merozoítos de *Plasmodium vivax* e que o bloqueio da invasão pelos fragmentos Fab de anticorpos monoclonais, anti-Fy⁶, sugere que este epítipo, ou domínio próximo, pode ser um sítio ativo na susceptibilidade ao *P. vivax*.

Singh e colaboradores (2001) expressaram a região II da proteína de ligação do *Plasmodium vivax* aos antígenos do sistema Duffy (PvRII) em *Escherichia coli*. Suas características biofísicas, bioquímicas e funcionais confirmam que esta região é ativa e liga-se especificamente as hemácias humanas Duffy positivas. A região PvRII é altamente imunogênica produzindo altos títulos de anticorpos, que podem inibir a ligação do *P. vivax* a hemácia Duffy positivo.

Em área endêmica de Papua Nova Guiné, foram identificados indivíduos heterozigotos para um novo alelo, que confere negatividade para o sistema Duffy. Nos eritrócitos, desses indivíduos, foram observados 50% menos de antígenos Duffy, assim como, aderência significativamente reduzida do *Plasmodium vivax*. Estes dados mostram que o surgimento desta nova forma alélica de negatividade para Duffy está correlacionado com a resistência à malária vivax (Michon et al., 2001).

Existem hipóteses de que talvez haja outra porta de entrada nas hemácias, além do sistema Duffy, para a penetração dos merozoítos de *Plasmodium vivax*. Albuquerque e colaboradores (2003) encontraram no Estado do Amazonas, Brasil, dois indivíduos Fy(a-b-) com evidências de antecedentes de malária vivax, indicando a possibilidade de haver uma possível via alternativa ao sistema Duffy para a invasão eritrocitária pelo *P. vivax*.

De acordo com Swardson-Olver e colaboradores (2002), os parasitos *Plasmodium vivax*, *Plasmodium yoelli* e *Plasmodium knowlesi*, que infectam hemácias humanas e murinas, utilizam a proteína Duffy para invasão de eritrócitos. Nesse estudo, porém, os autores verificaram que reticulócitos de camundongos com genes Duffy “knockout” foram invadidos por *P. yoelii* com a mesma taxa de invasão quando comparados com reticulócitos positivos para antígenos Duffy e concluíram que existe uma via de invasão de *P. yoelii*, em reticulócitos, independente da proteína Duffy.

Tournamille e colaboradores (1995b) verificaram em estudos de invasão parasitária, que o *Plasmodium knowlesi* utiliza a proteína Duffy, assim como outros receptores para invadir, por múltiplas vias, eritrócitos de macacos *Rhesus* (*Macaca mulata*). O mapeamento das regiões responsáveis pelo reconhecimento do receptor é um importante passo para compreender a base estrutural das interações destes ligantes parasitários com os receptores do hospedeiro.

Setenta e três casos de infecções de *Plasmodium vivax* adquiridas no Oeste ou Centro da África foram diagnosticados por critérios microscópicos em viajantes franceses de 1995 a 1998. Destes casos, uma das infecções foi diagnosticada em um

viajante Duffy negativo e confirmada por PCR, embora, que o *Plasmodium vivax* encontrado apresentasse uma morfologia atípica de *Plasmodium ovale*. Esta observação microscópica, junto com a evidência molecular de *P. vivax* sugere que este plasmódio é transmitido nessa área apesar da ausência do receptor Duffy na população (Gautret et al., 2001).

Ryan e colaboradores (2006) apresentaram evidências de que um parasito, com as características de *Plasmodium vivax*, está sendo transmitido entre os indivíduos habitantes do Kênia, negativos para o sistema Duffy. Trinta e dois (0,65%) de 4.901 *Anopheles gambiae* e *A. funestus* coletados na Província de Nyanza foram ELISA positivo para a proteína VK247 do circunsporozoíto de *P. vivax*. Eritrócitos de 31 crianças, incluindo nove microscopicamente diagnosticados como infectados por *P. vivax*, eram negativos por citometria de fluxo para os epítomos Fy3 e Fy6, os quais indicam a expressão do sistema sanguíneo Duffy.

Cavasini e colaboradores (2007a) descreveram os genótipos Duffy encontrados em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* de quatro diferentes áreas endêmica brasileiras, explorando significantes associações entre variantes deste grupo sanguíneo e susceptibilidade ou resistência à malária. Seus dados mostraram uma alta frequência do genótipo *FYA/FYB* seguido por *FYB/FYB*, *FYA/FYA*, *FYA/FYB-33C* e *FYB/FYB-33C*. O genótipo *FY* negativo (*FYB-33C/FYB-33C*) foi encontrado em indivíduos infectados e não infectados. Algumas frequências de genótipos mostraram diferença significativa entre doadores e pacientes com malária. Os dados obtidos ainda sugerem que indivíduos com o genótipo *FYA/FYB* possuem maior susceptibilidade à malária vivax e que a presença do alelo *FYB-33C* pode ser uma seletiva vantagem na população, reduzindo a

taxa de infecção por *P. vivax*, nestas regiões.

Cavasini e colaboradores (2007b) apresentaram evidências de infecção de *Plasmodium vivax* entre habitantes, do Brasil, negativos para o sistema sanguíneo Duffy. A identificação do *P. vivax* foi determinada por ambos os testes de “screening” genotípico e não genotípico. O sistema sanguíneo Duffy foi genotipado pela técnica de PCR/RFLP e fenotipados utilizando a técnica de gel centrifugação. Por meio destas técnicas foram detectados indivíduos homozigotos *FY*B-33C* infectados por *P. vivax*, cuja genotipagem da proteína do circunsporozoíto era VK210 e/ou *P. vivax* like. Esforços adicionais são necessários com objetivo de esclarecer a evidência de que o *P. vivax* está sendo transmitido entre pacientes da Região Amazônica brasileira com fenótipo Duffy negativo.

Pasvol (2007) verificou evidências de infecção de *Plasmodium vivax* em indivíduos Duffy negativo na Amazônia e na África, mostrando evidências de adaptações naturais do *P. vivax* em áreas endêmicas de malária.

Estudos associados à Parasitemia e Densidade Parasitária da Malária vivax.

Cole-Tobian e colaboradores (2007) observaram que certos polimorfismos de *Plasmodium vivax*, como o PvDBPII, ligavam-se melhor a eritrócitos *in vitro* e examinaram a hipótese destas variantes estarem relacionadas a uma maior parasitemia. Acompanharam 206 crianças de Papua Nova Guiné por seis meses e genotiparam um total de 713 amostras de *P. vivax*, não encontrando, porém uma associação significativa

entre os alelos PvDBPII, ou diversos haplótipos encontrados, com a parasitemia.

Kasehagen e colaboradores (2007) verificaram que, enquanto é conhecido que indivíduos Duffy negativos são altamente resistentes à infecção eritrocitária pelo *Plasmodium vivax*, pouco se conhece sobre a susceptibilidade ao *P. vivax* entre os indivíduos Duffy negativo, com alelos heterozigotos (+/-). Este estudo foi realizado em Papua Nova Guiné, onde foi previamente identificado um novo alelo Duffy negativo, entre os indivíduos que viviam em região endêmica para todas as quatro espécies de parasitas humanos da malária. Em conclusão, este estudo mostra a primeira evidência de que eritrócito Duffy negativo heterozigoto reduz à susceptibilidade a infecção pelo *P. vivax*, evidenciando que medidas de controle do alvo do *P. vivax* podem ser desenvolvidas.

Alguns estudos sobre a parasitemia da malária reportam associações com os mais diversos fatores. Por exemplo, no estudo de Bruce e Day (2003) com crianças co-infectadas com duas espécies de diferentes plasmódios, em Papua Nova Guiné, propuseram um possível mecanismo de controle da densidade parasitária quando duas espécies de plasmódios infectavam uma mesma criança.

A ativação policlonal de células B, que ocorre na infecção da malária, foi o alvo do estudo de Fesel e colaboradores (2005) que com o objetivo de elucidar o papel desta ativação na patogênese ou proteção à malária, estudaram indivíduos infectados sintomáticos, assintomáticos e indivíduos não infectados expostos e não expostos a malária. Os autores verificaram que a produção policlonal de anticorpos contra *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, parece estar mais associada com o estado intrínseco

de ativação de indivíduos infectados, do que com a resposta imunológica específica aos antígenos parasitários. Observaram, ainda, que esta ativação pode estar sendo influenciada por estímulos prévios, porém sem estar associada ao nível de parasitemia em infecções sucessivas.

McQueen e McKenzie, (2006) concluíram que a competição pelas hemácias em uma co infecção entre *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* causará a supressão de uma das duas espécies, dependendo de suas taxas relativas de reprodução e tempo de inoculação, influenciando diretamente na parasitemia dos parasitas.

Desta forma, conforme os estudos aqui colocados, verificamos a importância da glicoproteína eritrocitária Duffy na invasão de hemácias humanas por merozoítos de *Plasmodium vivax*, porém pouco ainda é conhecido, se mutações nesta glicoproteína, ou a frequência do sistema ABO e antígenos RhD, em habitantes da Amazônia brasileira, pode influenciar na frequência de infecção pelo *P. vivax* ou na densidade parasitária na malária vivax. Contudo buscamos verificar se na região endêmica de malária estudada, podem estar havendo adaptações naturais que levem tanto ao surgimento de mecanismos parciais de defesa contra o *Plasmodium vivax*, distintos dos já descritos em descendentes africanos, quanto a adaptações que podem levar a um aumento a susceptibilidade a este tipo de malária.

4. OBJETIVOS

Geral

Investigar possíveis associações entre os sistema ABO, Duffy, antígenos RhD e a malária causada pelo *Plasmodium vivax*, em habitantes de uma área endêmica de malária da Amazônia Brasileira.

Específicos

Investigar se os sistemas sanguíneos ABO, Duffy e antígeno RhD estão associados à frequência de infecção do *Plasmodium vivax* nos pacientes estudados.

Investigar se os genótipos Duffy, estão associados à densidade parasitária do *Plasmodium vivax* nos pacientes estudados.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas CEP/FMT-AM, em 23 de fevereiro de 2006 sob o processo n° 0285/2006, obtendo aprovação n° 1792/2006, em 17 de maio de 2006.

5.1 Casuística

Área de estudo

Estado do Amazonas.

Indivíduos do estudo

Uma população do Estado do Amazonas, atendidos no ambulatório de malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) e residentes em áreas de alto índice de malária e infectados com o *Plasmodium vivax*.

Critérios de inclusão:

1. Idade de 10 anos até 65 anos;
2. Exame de gota espessa positivo para *P. vivax* (monoinfecção), primoinfectados ou com infecções prévias, independente da densidade parasitária;
3. Se do sexo feminino, podendo apresentar evidência de gestação;
4. Não ser portador de doenças crônicas associadas (cardiopatias,

nefropatias, hepatopatias, AIDS, desnutrição severa, etc.).

5. Não estar fazendo tratamento de malária ou ter feito nos último 6 meses.

Critérios de exclusão:

1. Pacientes com idade de 1 a 9 anos;
2. Ser portador de doenças crônicas associadas (cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, AIDS, desnutrição severa, diabetes *mellitus*, etc.);
3. Ter exame de gota espessa positiva para *Plasmodium falciparum*.
4. Ser de etnias indígenas
5. Estar fazendo tratamento de malária ou ter feito nos último 6 meses.

Cálculo amostral

A amostra estudada foi calculada baseada na prevalência do fenótipo Duffy negativo de 3,39%, encontrada em doadores de sangue do Estado do Amazonas, de acordo com os dados do Hemocentro do Amazonas, utilizando população infinita (acima de 10.000) para estima-los em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*, com erro amostral de 1,7% e nível de confiabilidade de 95%, totalizando 497 indivíduos.

Foi utilizado o teste de *qui* quadrado de Fisher para verificar possíveis associações entre a frequência dos sistemas sanguíneos ABO, antígenos Rh e a frequência de infecção de *Plasmodium vivax* nos pacientes estudados, comparando, com as frequências dos referidos sistemas em doadores de sangue sem antecedentes de malária e o teste *qui* quadrado de Pearson (Fleiss, 1981) comparando na discussão deste trabalho, os genótipos Duffy em três populações, sendo estas os pacientes deste estudo,

um grupo de outros pacientes e doadores sem antecedentes de malária em tabelas de contingência. O valor crítico do nível de significância por nós preestabelecido foi de 0,05. Sempre que em um teste de comparação entre mais de dois grupos fornecia um resultado correspondentes a pelo menos essa probabilidade, dava-se continuidade a análise, através da partição da tabela de contingência inicial, com a finalidade de se tentar localizar quais dos grupos diferiam entre si. Utilizamos também o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para verificar possíveis associações entre os genótipos Duffy e a densidade parasitária (DP) dos pacientes estudados, em razão da distribuição das DP não apresentarem normalidade ($p < 0,001$; Bartlett's).

Ambos os testes foram realizados utilizando o programa Epi-Info versão 6,04 d.

5.2 Métodos

Realizamos este estudo descritivo observacional do tipo corte transversal, onde realizamos a fenotipagem eritrocitária do sistema ABO, antígenos Rh, assim como a fenotipagem e genotipagem do sistema Duffy nas amostras de indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*.

Método de inclusão dos indivíduos no estudo

Os indivíduos, que possuíam os critérios de inclusão, foram convidados, durante o 1º atendimento médico, a participar do estudo, preenchendo naquele momento, a Ficha de Acompanhamento do Pacientes (FAP) com os dados epidemiológicos, (endereço residencial detalhado com referência), parasitemia, sintomas clínicos no ato do

atendimento médico e casos anteriores de malária.

Para evitar um possível viés na definição da parasitemia, tomamos o cuidado de perguntar aos pacientes a serem incluídos no estudo, se os mesmos estavam sob tratamento de malária ou se tinham feito o tratamento durante os últimos 6 meses.

A cada participante foram explicados os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, a duração esperada do estudo, assim como, a possibilidade de sair da pesquisa a qualquer tempo sem nenhuma penalidade ou alteração no atendimento de saúde prestado.

O consentimento dos pais ou responsáveis foi solicitado para os menores de idade. Os participantes maiores de idade, assinaram o TCLE antes da coleta das amostras, o qual também foi assinado pelo pesquisador principal.

Coletamos de cada participante, uma amostra de cinco mililitros (mL) de sangue total com o anticoagulante EDTA e uma amostra de cinco mL sem anticoagulante. As confidencialidades de seus nomes e informações foram mantidas sob códigos numéricos.

As fenotipagens do sistema ABO, antígeno Rh, assim como as fenotipagens e genotipagens e sistema Duffy foram realizadas no laboratório de Imuno-hematologia do HEMOAM. As FAP e os TCLE foram arquivados no HEMOAM em pastas por ordem alfabéticas de A a Z.

5.2.1 Métodos laboratoriais.

5.2.1.1 Determinação da parasitemia e densidade parasitária.

Realizamos a determinação da parasitemia de acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório de Malária do Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTAM), utilizando como teste parasitológico o método da gota espessa (GE), que consiste na coleta de uma amostra de sangue da polpa digital em lâmina, sendo em seguida desmembrada e corada com Giemsa. A quantidade de parasitos é expressa em cruzes como o descrito método de Walker. As gotas espessas coletadas, no momento da inclusão dos pacientes possuíam uma padronização de tamanho para aumentar a precisão da contagem dos parasitos.

A determinação da parasitemia teve como base a contagem de parasitos assexuados por 200 leucócitos e, no caso de menos de 10 parasitos identificados na leitura, a contagem dos mesmos prosseguia até 500 leucócitos. A determinação da densidade parasitária levou em conta a quantidade de leucócitos de cada paciente (leucograma). O cálculo da densidade parasitária foi realizado utilizando a seguinte fórmula (OPAS,2004).

$$\text{Densidade parasitária}/\mu\text{L} = \frac{\text{Número de parasitos contados} \times \text{leucometria}}{\text{Número de leucócitos contados}}$$

As contagens microscópicas maiores que 500 parasitos, foram interrompidas após a leitura do último campo (no qual ocorreu o número 500), mesmo antes de atingir 200

leucócitos, e o cálculo da densidade parasitária foi feito com o auxílio da fórmula acima descrita.

O diagnóstico microscópico com resultado negativo foi definido quando, em no mínimo 300 campos da lâmina, não foram encontradas formas assexuadas de *Plasmodium vivax*. A realização da gota espessa, assim como as definições das parasitemias e Densidades Parasitárias, foram realizadas de acordo como os protocolos do projeto da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogras Anti-maláricas - RAVREDA (OPAS,2004).

Foi utilizada a classificação descrita por Alecrim, 2000 para a divisão da densidade parasitária em faixas baixa, média e alta, definida contando parasitos em 100 leucócitos, como descrito abaixo:

- **Baixa densidade parasitária:** contagem de até 7.000 trofozoítas por mm^3
- **Média densidade parasitária:** contagem de trofozoítas entre 7.001 e 15.000 por mm^3
- **Alta densidade parasitária:** número de trofozoítas igual ou superior a 15.001 por mm^3

Determinação do Hemograma, Fenotipagem e Genotipagem de grupos sanguíneos.

Estes testes foram realizados com uma amostra de cinco mL de sangue venoso

com anticoagulante Ácido Etileno Tetra acético – EDTA, colhida pelo método à vácuo (Vacuntainer® BD, EUA) por punção venosa.

Testes de hemaglutinação para a determinação dos fenótipos ABO, Rh e Duffy.

Os fenótipos ABO e RhD foram determinados pelo método da Hemaglutinação na técnica em cartões de gel (Diamed AG, Morat, **Suíça**) com prova direta utilizando suspensão de hemácias dos pacientes a 3% em solução de LISS (**Do inglês** Low Ionic Strength Solution) e reagentes (Diamed AG, Morat, **Suíça**) contendo anticorpos monoclonais anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, Controle de Rh e prova reversa utilizando plasma do paciente e hemácias reagentes A e B (Diamed AG, Morat, **Suíça**). Técnica descrita no Protocolo n° 1 dos anexos.

Os fenótipos do sistema Duffy foram determinados pelo método clássico de hemaglutinação em cartões de gel (Diamed AG, Morat, Switzerland), utilizando anticorpos padronizados pela mesma empresa. Nestes testes foram utilizados os seguintes reagentes: Cartão Duffy (Diamed SA) e reagentes contendo anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b (Diamed). Técnica descrita no Protocolo n° 2 dos anexos.

Os testes de hemaglutinação foram rigorosamente padronizados com a utilização de amostra controle positiva e negativa, validados no Hemocentro do Amazonas-HEMOAM, com o objetivo de garantir que a única variável nestes testes fosse a expressão antigênica dos sistemas sanguíneos, e assim obter um resultado confiável quanto à especificidade e sensibilidade.

Genotipagem do sistema sanguíneo Duffy.

O DNA foi extraído das amostras de sangue total utilizando os “Kits” de extração NeoIsoColumn (NeoScience[®] , EUA) de acordo com os protocolos descritos nas bulas dos “kits”.

No protocolo da PCR, descrito por Castilho et al, 2004, foram utilizados; 100-200 ng de DNA, 50 pmole de cada oligo nucleotídeo iniciador, 2 nmole de cada dNTP, 1.0 U *Taq* polymerase e tampão em um volume total de 60 µl como condição padrão para as análises dos genes variantes por PCR.

A genotipagem Duffy foi realizada utilizando os oligo nucleotídeo iniciador sense 5' TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC 3' e anti-sense 5' AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC 3'. Os produtos da PCR Duffy foram aplicados em gel de agarose a 1% e visualizados com brometo de etídio, os quais apresentaram uma banda de 392 pb. Após verificação da amplificação, o produto da PCR Duffy foi tratado com a enzima de restrição *BanI* e observado, em gel de agarose 2%, visualizado com brometo de etídio. Os genótipos *FYA/FYB* apresentaram duas bandas de 210 e 306 pb, respectivamente. O gene *FYA* apresenta apenas a banda de 210 pb e o *FYB*, a banda de 306 pb. (Protocolo n° 02 do anexo)

Uma alíquota do DNA, extraído de cada paciente, foi congelada para a

realização de uma contraprova (Quando necessário).

A técnica de PCR para verificação do polimorfismo -33 T>C no promotor GATA box (Anexo nº 4) foi realizada em todos os indivíduos que tiverem resultados de fenotipagem Fy (a-b-) e genotipagem *FYB/FYB*, assim como nos fenótipos Fy(a+b-) com genótipo *FYA/FYB* e nos fenótipos Fy(a-b+) com genótipo *FYB/FYB*. Para isso foram utilizados os oligo nucleotídeo iniciadores sense 5' CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA 3' e anti-sense 5' CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG 3' . Os produtos da PCR GATA foram aplicados em gel de agarose a 1% e visualizados com brometo de etídio, o qual apresentou uma banda de 189 pb. Após verificação da amplificação, os produtos dos PCR GATA foram tratados com enzima de restrição *StyI* e observados em gel de poliacrilamida a 8%. Os genótipos GATA MUTADO apresentam as bandas com 108 e 61 pb e os GATA NORMAL tipo selvagem, apresentam as bandas com 108 e 81 pb.(Protocolo nº2 do anexo).

A PCR foi realizada para verificação do SNP (Do inglês Single Nucleotide Polymorphism) 265 C>T e 298 G>A da cadeia, que originam o antígeno Fy^x em todas as amostras que apresentaram fenotipagem Fy (a+b-) com genotipagem *FYA/FYB* e GATA Normal (-33T) para a determinação do genótipo *FYA/FYX*, assim como as fenotipagens Fy (a-b+) com genotipagem *FYB/FYB* para a determinação do genótipo *FYB/FYX* . A PCR foi realizada com os mesmos oligo nucleotídeos iniciadores utilizados para a genotipagem Duffy, sendo o produto do PCR tratado com enzima de restrição *MspAI* para verificar a presença do SNP 265 C>T, observando-se uma banda anormal de 161pb e com a enzima *MWO* para o SNP 298G>A observando-se uma banda anormal de 343pb. O produto da digestão foi visualizado em gel de poliacrilamida a 8%. (Protocolos nº 2 do anexo).

Os testes de Biologia Molecular foram realizados no HEMOAM após transferência de tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), laboratório de Biologia Molecular, do setor de Pesquisa do Hemocentro da UNICAMP, sob responsabilidade da Doutora Lilian Castilho.

6. RESULTADOS

Foram coletadas 497 amostras de pacientes infectados com *Plasmodium vivax*, admitidos na Fundação de Medicina Tropical de Manaus, assim como nos serviços da Fundação de Vigilância Sanitária dos assentamentos do Inkra: Rumo Certo, Novo Rumo, Canoas, São José e São Jorge no município de Presidente Figueiredo.

6.1 SISTEMA ABO E ANTÍGENO RhD.

Para verificar a possibilidade de associação entre as frequências do sistema ABO e antígenos RhD nos pacientes estudados e a frequência de infecções pelo *Plasmodium vivax*, foram utilizados os dados de doadores de sangue de repetição, nascidos no Estado do Amazonas, sem antecedentes de malária (Afirmação comprovada através das triagens clínicas e testes de triagem para malária de acordo com local de procedência do mesmo), os quais foram obtidos nos setores de Triagem Clínica e do laboratório de Imunohematologia Eritrocitária do Hemocentro do Amazonas-HEMOAM.

Tabela 1. Frequência do sistema ABO em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e doadores de sangue sem antecedentes de malária.

Sistema ABO	Pacientes infectados		Doadores de Sangue		p *
	n	%	n	%	
O	321	64,6	3091	59,6	0,9
A	115	23,1	1527	29,4	0,02
B	50	10	460	8,8	0,5
AB	11	2,2	103	1,9	0,6
Total	497	100	5181	100	

*Teste exato de Fisher (qui quadrado).

Nesta tabela comparamos as frequências ABO dos pacientes deste estudo com as de doadores de sangue de repetição, sem antecedentes de malária, conforme informações coletadas na entrevista antes da doação de sangue, sendo estes procedentes das mesmas áreas de Manaus que pacientes deste estudo.

Tabela 2. Frequência do antígeno RhD em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e doadores de sangue sem antecedentes de malária.

Antígeno Rh	Pacientes infectados		Doadores de Sangue		p*
	n	%	n	%	
RhD+	471	94,7	4850	93,6	0,4
RhD-	26	5,2	331	6,4	0,4
Total	497	100	5181	100	

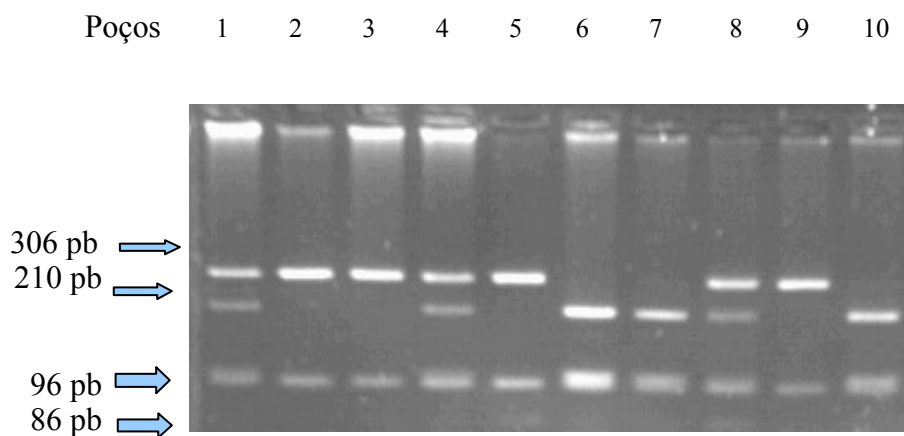
* Teste exato de Fisher (Qui quadrado)

Nesta tabela comparamos as frequências Rh dos pacientes deste estudo com as de doadores de sangue de repetição, sem antecedentes de malária, conforme informações coletadas na entrevista antes da doação de sangue, sendo estes procedentes das mesmas áreas de Manaus que pacientes deste estudo.

6.2 SISTEMA DUFFY

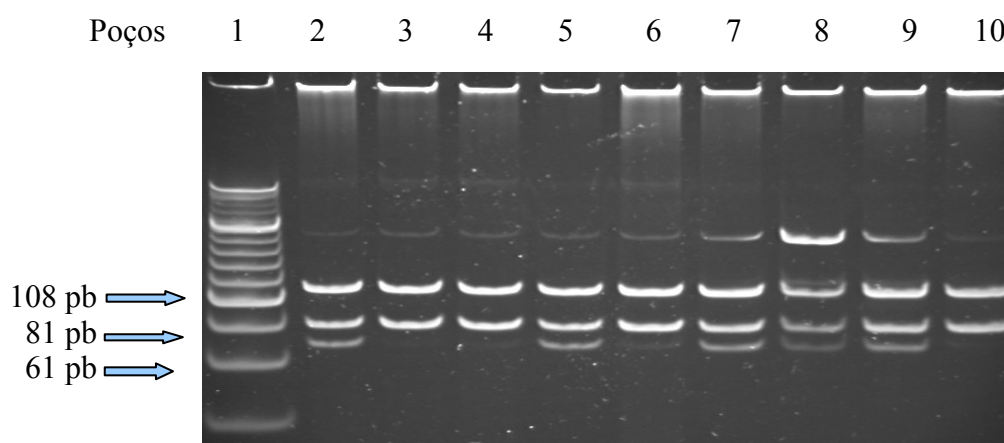
Realizamos as genotipagens Duffy nos pacientes infectados, pela técnica de PCR-RFLP, observando nas figuras abaixo, uma amostra de cada resultado das diferentes análises realizadas.

Figura 2: Análise RFLP de produtos de PCR amplificados com oligo nucleotídeos iniciadores *FYAB1/FYAB2* utilizando enzima de restrição *Ban I* após eletroforese em gel de agarose 2%.



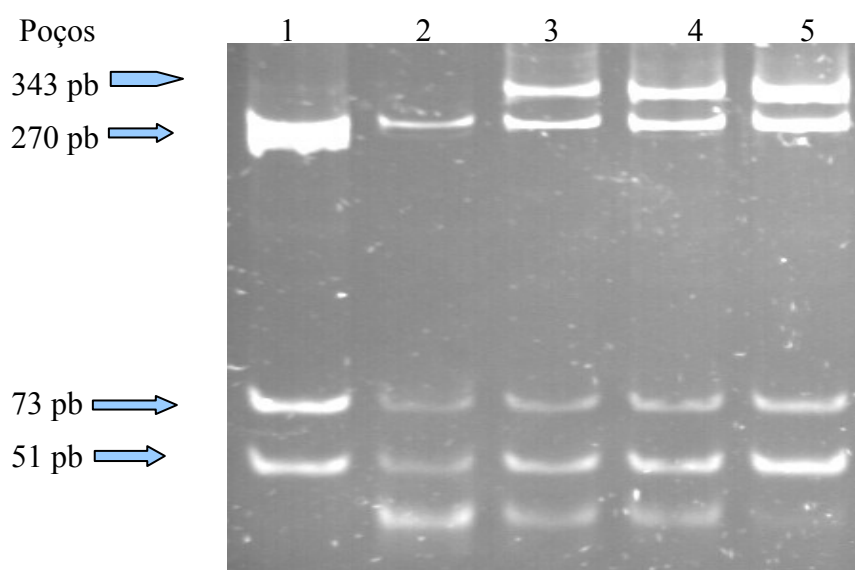
Na figura 02 podemos observar que os poços 1, 4, 8 contém amostra heterozigotas com o genótipo *FYA/FYB*, os poços 2, 3, 5, 9, contém amostras homozigotas com o genótipo *FYB/FYB*, e os poços 6, 7, 10 contém amostras homozigotas com o genótipo *FYA/FYA*.

Figura 3: Análise por RFLP de produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores *FYN1/FYN2* utilizando a enzima de restrição *StyI* após eletroforese em gel de acrilamida a 8% para a detecção de mutação na posição -33 T>C do GATA box.



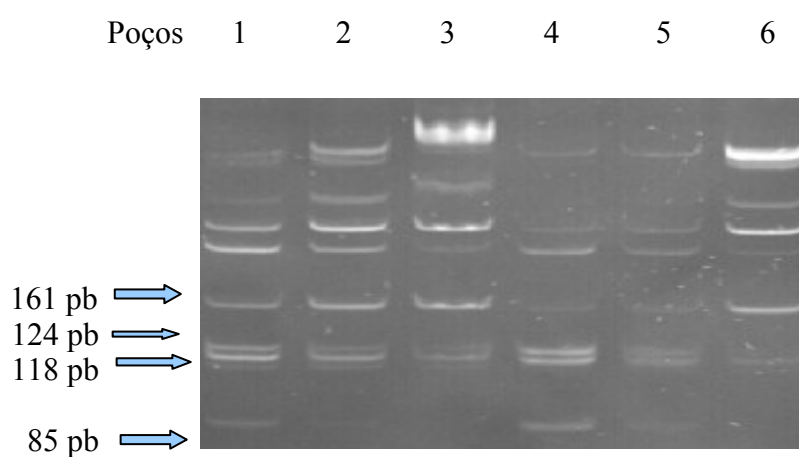
Na figura 03 podemos observar que o Poço 1 contém o ladder de 20 bp, enquanto os poços 2, 5, 7, 8, 9 contêm amostras heterozigotas para mutação GATA e os poços 3, 4, 6, 10, amostras homozigotas tipo selvagem.

Figura 4: Eletroforese em gel de acrilamida a 8% de produtos de PCR amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores *FYAB1/FYAB2* após digestão pela enzima de restrição *MWO* para pesquisa do SNP 298 G>A da cadeia de DNA.



Na figura 04, observamos no poços 1,2, amostras homozigotas tipo selvagem 298 G/ 298 G, ao passo que nos poços 3, 4, 5, amostras heterozigotas 298 G/ 298A.

Figura 5: Eletroforese em gel de acrilamida a 8% de produtos de PCR amplificado com os oligo nucleotideos iniciadores *FYAB1/FYAB2* após digestão pela enzima de restrição *Msp*I para pesquisa do SNP 265 C>T da cadeia de DNA.



Na figura 05, observamos nos poços 1, 2, 3, 6, amostras heterozigotas 265 C / 265 T, enquanto nos poços 4,5, amostras homozigotas tipo selvagem 265 C/ 265 C.

Abaixo observamos as tabelas com a frequência dos genótipos Duffy encontrados assim como sua comparação com as medianas de densidade parasitária encontrada.

Tabela 3. Frequência das fenotipagens e genotipagens Duffy dos pacientes estudados .

Fenótipo Duffy	Genótipo Duffy	Pacientes Estudados	
		n	%
Fy(a+b+)	<i>FYA/FYB</i>	201	40,4
Fy(a+b-)	<i>FYA/FYA</i>	139	28
	<i>FYA/FYX</i>	1	0,2
	<i>FYA/FYB-33C</i>	36	7,2
Fy(a-b+)	<i>FYB/FYB</i>	80	16,1
	<i>FYB/FYX</i>	8	1,6
	<i>FYB/FYB-33C</i>	32	6,4
Total		497	100

Na tabela 3 observamos a frequência de fenotipagem e genotipagem do sistema Duffy, onde não encontramos nenhum paciente infectado com o *Plasmodium vivax* com o fenótipo Fy(a-b-) e encontramos uma baixa frequência de genes mutados *FY/FYB-33C* (13, 6%) e *FY/FYX* (1,8%).

Tabela 4. Comparação da mediana de Densidade Parasitária por genótipo Duffy encontrados nos pacientes estudados.

Genótipo Duffy	n	Mínima DP	Q1 25%	Mediana 50%	Q3 75%	Máxima DP
<i>FYA/FYA</i>	120	15	411	1195	5000	15725
<i>FYA/FYB</i>	173	5	445	1812	5000	16128
<i>FYA/FYB-33C</i>	32	75	307	1000	5000	11058
<i>FYA/FYX</i>	1	591	591	591	591	591
<i>FYB/FYB</i>	64	21	639	1229	4240	11264
<i>FYB/FYB-33C</i>	26	125	468	2500	5000	14185
<i>FYB/FYX</i>	7	125	256	277	2088	2500
<i>FYB/FYB 298C>T</i>	10	277	759	1000	2500	7900
<i>Total</i>	433					

Valor de p: 0,480 Q1: Primeiro quartil Q3: Terceiro quartil (75%)

Metodologia Estatística: Como a distribuição da densidade parasitaria não apresentou normalidade ($p < 0,001$; Bartlett's), utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Nas tabelas 4 e 5, observamos um total de 433 pacientes, diferente do universo estudado de 497. Isto porque não obtivemos a leucometria de 64 pacientes, devido a problemas técnicos, sendo este um dado necessário para a definição da densidade parasitária dos pacientes estudados.

Tabela 5: Cortes de Densidades Parasitárias, segundo Alecrim et al, 2000 encontradas nos genótipos dos pacientes estudados.

Genótipo Duffy	Densidade Parasitária						TOTAL
	≤ 7000		7000 \mid 15000		≥ 15000		
	parasitos / uL		parasitos / uL		parasitos / uL		
	n	%	n	%	n	%	
<i>FYA/FYA</i>	110	91,7	07	5,8	03	2,5	120
<i>FYA/FYB</i>	162	93,6	10	5,8	01	0,6	173
<i>FYA/FYB-33C</i>	31	96,9	01	3,1	0		32
<i>FYA/FYX</i>	01	100,0		0	0		1
<i>FYB/FYB</i>	70	94,6	04	5,4	0		74
<i>FYB/FYB-33C</i>	23	88,5	03	11,5	0		26
<i>FYB/FYX</i>	07	100,0		0	0		7
TOTAL	404	93,1	25	5,9	04	0,9	433

7. DISCUSSÃO

FREQUÊNCIAS DO SISTEMA ABO, ANTÍGENO RhD E MALÁRIA VIVAX

Na tabela 01 comparamos a frequência do sistema ABO entre pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e doadores de sangue sem antecedente de malária, onde encontramos diferença em relação à frequência do grupo A ($p>0,05$), sendo esta significante menor em pacientes infectados.

Apesar dos doadores de sangue, que compõe o grupo de comparação, possuírem pelo menos 10 doações com teste de triagem negativo para malária, afirmando nunca terem se infectado com esta doença e ainda sendo estes da mesma região urbana de moradia dos pacientes, ainda poderíamos estar incorrendo em um erro tipo I nesta análise, ou seja, afirmando casualmente uma diferença que na verdade não existe. Para tanto, verificamos na literatura, a frequência do sistema ABO em habitantes da Cidade de São Paulo e doadores de sangue daquela mesma cidade (Novaretti et al, 200; Mattos et al, 2001), que não é área endêmica de malária e que o serviço de Hemoterapia inabilita definitivamente indivíduos procedentes de regiões endêmicas de malária para doação de sangue, independentemente dos mesmo nunca terem se infectado com malária.

Novaretti e colaboradores (2000) encontraram em 834 caucasóides, 46,5% (O), 39,4% (A), 11,5% (B) e 9,5% (AB), em 827 mulatos, 53,2% (O), 29,6% (A), 13,8% (B) e 3,4% (AB), em 801 negros, 47,9% (O), 31,9% (A), 16,6% (B) e 3,5% (AB), ao passo

que Mattos e colaboradores, (2001) encontraram em 324 doadores de sangue de São Paulo, 46,3% (O), 36,4% (A), 9,8% (B) e 7,5% (AB). Comparando com nossos dados na tabela 01, onde em 5.181 doadores de sangue do Estado do Amazonas, encontramos 59,6% (O), 29,4% (A), 8,8% (B) e 1,9% (AB) e nos 497 pacientes infectados 64,6% (O), 23,1% (A), 10,0% (B) e 2,2% (AB), podemos observar claras diferenças étnicas entre as populações estudadas nos Estados de São Paulo e Amazonas, principalmente em relação à grande frequência de indivíduos do grupo O e a discreta frequência de indivíduos do grupo AB. Em relação à frequência do grupo A, observamos que a significância estatística encontrada em nossos resultados, aumenta quando confrontamos os dados dos pacientes infectados pela malária vivax (23,1%) com doadores de sangue de São Paulo (36,4%). Desta forma, habitantes de área endêmica de malária que pertencem ao grupo A, parecem ter a vantagem de serem menos infectados pelo *Plasmodium vivax*.

Existem evidências em diversos estudos mostrando que hemácias dos grupos A, B ou AB, parasitadas com *Plasmodium falciparum*, formam rosetas mais rapidamente em relação às hemácias do grupo O (Udomsangpetch et al., 1989, 1993; Carlson; Wahlgren, 1992; Barragan et al., 2000). Diferentes estudos têm buscado associações entre o sistema ABO e o número de episódios de infecções pelo *P. falciparum*, embora que alguns estudos em diversas populações do mundo reportaram a ausência de associações entre o sistema ABO e infecção de malária, sem especificar o tipo (Osisanyia, 1983; Singh et al., 1986; Bayoumi et al., 1986; Montoya et al., 1994) apesar de que no Zimbawe, o grupo sanguíneo A foi associado tanto com baixos níveis de hemoglobina, como com severa malária falciparum em nível de sistema nervoso central com coma (Fisher & Boone 1998).

Santos e colaboradores (1983) detectaram no Brasil uma significativa associação entre o antígeno B e o número de episódios de malária.

Em 2007, Rowe e colaboradores observaram em 567 amostras de sangue de crianças com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, que o grupo O estava presente apenas em 21% dos casos severos de malária comparado com a frequência de 45% dos casos controle com malária não complicada e indivíduos saudáveis, demonstrando assim uma significativa evidência do efeito protetivo do grupo O na infecção de *P. falciparum*.

A especificidade da ligação entre o *Plasmodium falciparum* e a membrana eritrocitária, pode influenciar a capacidade de penetração deste parasita nas hemácias. Ligações altamente específicas entre o PfEMP-1 e N-acetil galactosamina (antígeno A) podem explicar os frequentes casos graves de malária falciparum, ao passo que a baixíssima especificidade entre ligantes parasitários e a L-fucose (antígeno H), abundante no grupo O, pode explicar a baixa força na formação de rosetas e os frequentes casos de malária falciparum não complicada em indivíduos do grupo O (Christine & Walter, 2008).

Albuquerque,(2003) encontrou em 74 pacientes com antecedentes de malária vivax, 75,6% (O), 12,2% (A), 8,1%(B) e 4,1% (AB) e em 35 pacientes com antecedentes de malária falciparum, 51,4% (O), 28,6% (A), 8,6%(B) e 11,4% (AB), ou seja, reforçando os resultados encontrados neste estudo em relação a alta frequência do grupo O e a baixa frequência do grupo A em pacientes com antecedentes de malária

vivax, e exatamente o inverso em relação aos indivíduos com antecedentes de malária falciparum, com frequência relativamente baixa de grupo O e alta do grupo A. A não captação de indivíduos doentes, para se verificar a gravidade da malária falciparum, assim como a densidade parasitária constituiu uma limitação naquele estudo

O valor de p igual a 0,02, considerado por nossa avaliação estatística como, apenas relativamente importante em relação à frequência do grupo A entre pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e doadores de sangue sem antecedentes de malária, nos levou a não realizarmos testes suplementares como: pesquisa molecular para a detecção de possíveis mutações na enzima n-acetil-galactosaminil transferase, que pudessem estar associadas à redução da susceptibilidade dos pacientes de determinado subgrupo A ao *P. vivax*. No entanto, o dado encontrado neste estudo, pode ser objeto de futuras pesquisas envolvendo o sistema ABO e a susceptibilidade à malária causada pelo *P. vivax*. Novos estudos podem investigar a possibilidade de hospedeiros estarem desenvolvendo novos mecanismos de defesa contra o *P. vivax*, por adaptação natural.

Os dados encontrados na tabela 01 concordam parcialmente com os dados descritos por Nkuo-Akenji e colaboradores (2004) que observaram a maior prevalência de malária vivax, 74,5%, em indivíduos do grupo O e a mais baixa em indivíduos do grupo B, porém sem estar associados à densidade parasitária encontrada. Devido a este achado de Nkuo-Akenji e colaboradores (2004) e ainda devido ao fato de que publicações como os estudos de Rajan & Chitnis, 1999, tem associado à susceptibilidade à malária vivax tão somente a proteína Duffy, que neste estudo, não buscamos associar a densidade parasitária dos pacientes infectados com a frequência do sistema ABO.

Em relação à tabela 2, que mostra a frequência do antígeno RhD em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e doadores sem antecedentes de malária, observamos a não associação da frequência deste antígeno nas duas populações estudadas, diferentemente do resultado do estudo de Beigelman e colaboradores (2003), que analisando 182 indivíduos ribeirinhos da Amazônia (Porto Velho, RO, Brazil), encontraram a indicação de que o loci *RH* pode estar significativamente associado com a resistência à malária; resultados que podem ser comparados apenas parcialmente, pois estudamos apenas o antígeno RhD, ao passo que o loci *RH* possui 52 antígenos identificados.

Em 2000, Novaretti e colaboradores, em seu estudo de frequência de sistemas de grupos sanguíneos, encontraram em 834 caucasóides, 89,2% (RhD +) e 10,8% (RhD -), em 827 mulatos, 92,2% (RhD +) e 7,8% (RhD -) e em 801 negros 94,4% (RhD +) e 5,6% (RhD -), demonstrando uma diferença importante apenas quando confrontamos a frequência em caucasóides com os resultados encontrados em indivíduos infectados e não infectados do Estado do Amazonas, 94,7% (RhD +) e 5,2 (RhD -) e 93,6% (RhD +) e 6,3 (RhD -) respectivamente, o que é esperado devido às diferentes ascendências genéticas destas populações.

FREQUÊNCIA DO SISTEMA DUFFY E A MALÁRIA VIVAX

Para realizarmos uma análise comparativa da frequência dos genótipos Duffy encontrados nos pacientes estudados do Estado do Amazonas, utilizamos os dados previamente publicados no estudo tipo caso controle, de doadores de sangue da

Amazônia Brasileira (Macapá / Estado do Amapá, Belém / Estado do Pará, Porto Velho / Estado de Rondônia e Rio Branco/ Estado do Acre) sem antecedentes de malária, assim como de indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax* também residentes em Estados da Amazônia Brasileira, sendo ambos os dados reportados por Cavasini e colaboradores (2007a).

A semelhança metodológica entre ambos os estudos, relacionado à definição dos genótipos Duffy, identificação do *Plasmodium vivax*, critérios de inclusão e exclusão dos indivíduos do estudo, área de estudo, foi determinante para concluirmos que os dados publicados por Cavasini e colaboradores (2007a) poderiam ser utilizados para compararmos aos resultados encontrados neste estudo.

Entre os mecanismos inatos de resistência à malária em humanos, verifica-se em diversas publicações a importância do polimorfismo do sistema sanguíneo Duffy em áreas onde o *Plasmodium vivax* predomina, pela razão de que esta molécula atua como receptor para este parasita, na superfície das hemácias (Miller, 1994). Observações descritas para o Oeste da África e Etiópia têm estabelecido uma forte correlação entre a ausência ou baixa endemicidade de malária vivax e a grande prevalência do genótipo Duffy negativo (Mathews; Armstrong, 1981). Porém pouco ainda é conhecido sobre os polimorfismos dos antígenos eritrocitários que confere tanto proteção parcial ou completa contra a malária.

Como demonstrado abaixo na tabela 6, a frequência do genótipo *FYA/FYB* foi significativamente maior em ambos os grupos de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* em relação ao grupo de doadores de sangue sem antecedentes de malária,

mostrando uma associação com o aumento a susceptibilidade à malária causada pelo *Plasmodium vivax* ($p < 0,001$). Este dado parece indicar que o genótipo heterozigoto com os genes *FYA* e *FYB* favorece a infecção pelo *P. vivax*.

Tabela 6. Comparação dos dados das genotipagens Duffy dos grupos de pacientes deste estudo, com os de doadores de sangue e com os pacientes do estudo de Cavasini et al., 2007a.

Fenótipo Duffy	Genótipos Duffy	Pacientes Estudo		Doadores de sangue sem antecedentes de malária.		Pac. Cavasini 2007a		p*
		n	%	n	%	n	%	
Fy(a+b+)	<i>FYA/FYB</i>	201	40,4 a	90	27,3 b	109	34,9 a	<0,001
Fy(a+b-)	<i>FYA/FYA</i>	139	28,0 a	43	13,0 b	51	16,3 b	<0,001
	<i>FYA/FYX</i>	1	0,2	3	0,9	5	1,6	0,09
	<i>FYA/FYB-33C</i>	36	7,2 a	62	18,8 b	34	10,9 a	<0,001
Fy(a-b+)	<i>FYB/FYB</i>	80	16,1	54	16,4	63	20,2	0,27
	<i>FYB/FYX</i>	8	1,6	6	1,81	4	1,3	0,86
	<i>FYB/FYB-33C</i>	32	6,4 b	54	16,4 a	42	13,5 a	<0,001
Total		497		330		312		

* Teste do Qui quadrado de Pearson.(Fleiss, 1981)

** Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5%

Woolley e colaboradores (2000) demonstraram em estudos, in vitro, diferenças no nível de expressões da glicoproteína Duffy na superfície de reticulócitos de indivíduos caucasianos e afroamericanos com fenótipo Fy (a+b+), pela técnica de citometria de fluxo. Em seu estudo, o nível de expressão dos epítotos Fy⁶, o qual é necessário para a invasão pelo *Plasmodium vivax*, foi significativamente menor em reticulócitos e hemácias maduras nos genótipos *FYB/FYB* em relação aos genótipos *FYA/FYA* ou *FYA/FYB*. Os autores concluíram, portanto que indivíduos heterozigotos podem ter uma maior quantidade de variações de receptores eritrocitários para as proteínas parasitárias ligantes do *Plasmodium vivax*.

Neste trabalho observamos que o maior número de pacientes infectados apresentavam o genótipo heterozigoto *FYA/FYB* (40,4%), sugerindo uma possível associação com o aumento da susceptibilidade à malária causada pelo *Plasmodium vivax*, seja por variações quantitativas ou qualitativas, porém não realizamos testes para medir tanto a quantidade quanto a qualidade da expressão da glicoproteína Duffy nas hemácias dos pacientes com o genótipo *FYA/FYB*.

O genótipo *FYA/FYA* (28%), também apresentou-se associado com o aumento da susceptibilidade à malária vivax, estando este, assim como o genótipo *FYA/FYB*, significativamente mais presente em relação aos doadores de sangue sem antecedentes de malária ($p < 0,001$), concordando com os resultados de Wooley e colaboradores (2000), pois a quantidade de antígenos Fy^6 nestes genótipos também apresenta-se em grande quantidade quando analisado por citometria de fluxo.

Como observado na tabela 6, o genótipo *FYA/FYA* foi detectado por Cavasini e colaboradores (2007a) em 16,3% e o genótipo *FYB/FYB* em 20,3% dos pacientes infectados com *Plasmodium vivax*, não encontrando, portanto indicação de associação com a frequência da infecção pelo *P. vivax*, discordando do resultado encontrado neste estudo e ainda dos resultados de Wooley e colaboradores (2000) que afirmam que os antígenos Fy^6 estão presente no genótipo *FYA/FYA* em maior quantidade em relação ao genótipo *FYB/FYB*, sendo portanto esperado uma maior frequência do genótipo *FYA/FYA* em relação ao genótipo *FYB/FYB* em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, o que encontramos neste estudo, porém não foi encontrado por Cavasini e colaboradores (2007a).

Vale a pena destacar que apesar do dado descrito acima, o genótipo *FYB/FYB*, não se apresentou associado à frequência de infecção pelo *Plasmodium vivax*, nem em nosso estudo e nem no estudo de Cavasini e colaboradores (2007a), quando comparada entre os pacientes estudados e doadores de sangue sem antecedentes de malária ($p>0,05$).

Este resultado, de certa forma também não concorda com os resultados de Wooley e colaboradores, (2000), pois segundo sua afirmação, o esperado seria que houvesse uma associação entre o genótipo *FYB/FYB* e uma baixa frequência de infecções pelo *Plasmodium vivax* em pacientes com este genótipo, o que não foi encontrado em ambos os trabalhos aqui discutidos, ou seja, apesar deste genótipo possuir uma quantidade menor de epítomos Fy⁶, não se apresenta como vantajoso em áreas endêmicas de malária, o que poderia indicar também a existência de possíveis receptores alternativos ao antígeno Fy⁶. Para a definição de novos receptores, há necessidade de estudos de infecção *in vitro*.

O genótipo *FYA/FYX* foi encontrado em apenas 01 (0,2%) paciente deste estudo, não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparados com os 3 (0,9%) doadores sem antecedentes de malária, assim como, com os 5 (1,6%) pacientes estudados por Cavasini e colaboradores (2007a) - $p>0,05$ -. Da mesma forma, a frequência do genótipo *FYB/FYX*, não apresentou diferença quando comparada com os 8 (1,6%) pacientes estudados, os 6 (1,81%) doadores sem antecedentes de malária e 4 (1,28%) pacientes estudados por Cavasini e colaboradores, em 2007a ($p>0,05$), indicando não estar associado à frequência de infecção do *Plasmodium vivax* nos pacientes infectados.

De acordo com Yazdanbakhsh e colaboradores (2000), o alelo *FYX* não foi encontrado em negros, porém detectado em 3,5% dos brancos estudados, sendo, portanto, bem mais frequente em brancos em relação aos indivíduos aqui estudados, "Caboclos", que historicamente possuem ascendência, na grande maioria branca e indígena e em sua minoria negra.

O gene *FYX*, segundo Castilho e colaboradores (2004), é definido pela detecção das mutações nas posições 265 (C>T) e 298 (G>A) da cadeia de DNA que causam as mutações Arg89Cys e Ala100Thr, respectivamente, na proteína Duffy, presente na membrana de hemácias.

Estes resultados sugerem que apesar do gene *FYX* levar a uma diminuição da expressão da proteína Duffy na membrana das hemácias, não está associado à frequência de infecção pelo *Plasmodium vivax*, pois sua frequência entre os grupos estudados não apresentou diferença significativa.

O genótipo *FYA/FYB-33C*, conforme demonstrado na tabela 3, teve uma frequência significativamente menor nos pacientes estudados (7,2%), quando comparados aos doadores de sangue sem antecedentes de malária (18,8%) - $p < 0,001$ -, porém muito similar à frequência encontrada por Cavasini e colaboradores (2007a) em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* (10,9%). Da mesma forma o genótipo *FYB/FYB-33C*, de acordo com a tabela 3, teve também uma frequência significativamente menor nos pacientes infectados (6,4%), quando comparados aos doadores de sangue sem antecedentes de malária (16,3%) - $p < 0,001$ -, porém não foi

estatisticamente similar a frequência encontrada por Cavasini e colaboradores (2000) em pacientes infectados pelo *P. vivax* (13,4%), mas ainda assim sugerindo diante dos resultados deste estudo, que uma combinação genotípica de *FY/FYB-33* nos fenótipos Fy(a+b-) ou Fy(a-b+), parece levar a uma redução na susceptibilidade à malária causada pelo *Plasmodium vivax*.

Estudos *in vitro*, como o de Michon e colaboradores (2005), apóiam a hipótese de que hemácias, que expressam o genótipo *FY/FYB-33C*, têm uma significativa redução na citoaderência do parasita quando comparado as hemácias que expressam *FYB/FYB*.

De acordo com Tournamille e colaboradores (1995a), o alelo *FYB-33* é um variante do alelo *FYB* resultando da mutação pontual T → C no gene promotor da região (nucleotídeo-33), o qual abole sua expressão.

Em suas pesquisas, Michon et al., (2001) e Yazdanbakhsh et al., (2000), detectaram que a presença do alelo *FYB-33* resulta em uma redução de 50% na expressão da proteína Duffy, na superfície das hemácias e ainda, Woolley e colaboradores (2000) verificaram que este processo demonstra a ação do efeito de dose relacionado ao gene, ou seja, genes *FYA* e *FYB* em heterozigose com o gene *FYB-33C* pode limitar o processo de invasão das hemácias pelo parasita, apesar de que a susceptibilidade ao *Plasmodium vivax* pode ocorrer em indivíduos Duffy-negativos heterozigotos (Miller et al., 1977).

Nossos resultados indicando associações do alelo *FYB-33C* com a diminuição

da frequência de infecção e corroboram com os achados de outros autores (Wooley et al., 2000; Michon et al., 2005; Cavasini, et al., 2007a).

Nas 497 amostras de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, não foram encontrados indivíduos com genótipo *FYB-33C/FYB-33C*, uma vez que este genótipo é conhecido como um fator de resistência ao *P. vivax*, como descrito por Kasehagen e colaboradores (2007).

Durante a busca ativa de amostras para a realização da dissertação de mestrado de Albuquerque, em 2003, foram encontrados dois indivíduos em uma mesma família, residentes no interior do Estado do Amazonas, com o fenótipo Fy(a-b-), genótipo *FYB-33C/FYB-33C*, com antecedente de infecção pelo *Plasmodium vivax*. Infelizmente, não encontramos os indivíduos ainda infectados, para identificar geneticamente a espécie do plasmódio que os infectou. Porém, ambos, ainda, possuíam o resultado da gota espessa emitido pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), assim como evidências do tratamento da malária vivax, de acordo com os esquemas terapêuticos utilizados pela FUNASA. Ainda assim confirmamos a presença de anticorpos anti-*Plasmodium vivax* no soro daqueles indivíduos, através de um teste Imunofluorescência indireta (IFI), realizado na Fundação de Medicina Tropical. Os indivíduos foram encontrados durante o presente estudo e confirmamos que ambos possuem o genótipo *FYB-33C/FYB-33C*, porém não tiveram novos antecedentes de malária.

Este achado corrobora com os achados de Gautret et al. (2001), 1 Caso na França, Ryan et al. (2006), 32 Casos no Kênia e Cavasini et al. (2007b), 2 Casos no norte do Brasil, todos com genótipo *FYB-33C/FYB-33C*.

Segundo Nichols e colaboradores (1987), os indivíduos Fy(a-b-), *FYB-33C/FYB-33C* não expressam o antígeno Fy⁶ em suas hemácias, o que pode indicar a eleição pelo *Plasmodium vivax*, de um receptor alternativo a proteína Duffy, ou ainda uma outra região dentro da mesma proteína. Esses novos receptores podem estar se desenvolvendo, lentamente, em algumas partes do mundo, como já mencionado por Pasvol, em 2007, e por Michon e colaboradores (2001). É importante considerar que os testes de citometria de fluxo para detecção do antígeno Fy⁶, foram realizados por Nichols e colaboradores (1987) apenas em indivíduos *FYB-33C/FYB-33C*.

Em alguns estudos foram encontrados Indivíduos Fy(a-b-) devido a outros polimorfismos genéticos distintos dos descritos anteriormente, como os SNP (271C>T e 304G>A no gene FYB) encontrado por Parasol e colaboradores (1998), os genótipos FYA/FYB FYA/FYA com SNP ainda Indeterminado, detectado por Shimizu et al. (2000) e um novo alelo Heterozigoto, o qual leva a uma expressão 50% menor da glicoproteína Duffy, descrito por Michon et al. (2001), porém sem indicarem o impacto destes polimorfismos na expressão do Fy⁶.

SISTEMA DUFFY E A DENSIDADE PARASITÁRIA DA MALÁRIA VIVAX.

Os valores das medianas das densidades parasitárias (DP) encontradas nos pacientes deste estudo foram comparados em relação aos diversos genótipos encontrados nestes pacientes e não foram observadas, de uma maneira geral, de acordo com o valor de p (0,480), diferenças significantes, porém a constância de faixa de DP encontrada em alguns genótipos, foram consideradas para a discussão destes resultados.

Na tabela 5, as DP encontradas, foram divididas segundo os cortes propostos por Alecrim 2000, para defini-las em baixa, média e alta. Observa-se que 93,1% das DP encontradas foram classificadas como baixa (≤ 7000 parasitas / uL), 5,9% como média ($7000 < \leq 15000$ parasitas / uL) e apenas 0,9% como alta (≥ 15000 parasitas / uL). Nesta tabela pode-se observar também que 100% dos pacientes, com genótipos *FYA/FYX* e *FYB/FYX*, apresentaram DP baixa, enquanto que 5,8% dos pacientes com genótipo *FYA/FYA*, 5,8% dos *FYA/FYB*, 3,1% dos *FYA/FYB-33*, 6,3% dos *FYB/FYB* e 11,5% dos *FYB/FYB-33* apresentaram DP média e apenas 2,5% dos pacientes com o genótipo *FYA/FYA* e 0,6% dos *FYA/FYB*, apresentaram DP alta.

Na tabela 4, observamos também que pacientes com o genótipo *FYA/FYB* apresentaram a mediana de densidade parasitária (DP) de 1.812 parasitos/ μ L, não apresentando significância estatística quando comparada com as DP encontradas em pacientes portadores dos demais genótipos Duffy. Os pacientes com genótipo *FYA/FYB*, apresentaram DP situadas nas faixas baixa, média e alta de acordo com as definições de Alecrim (2000), ou seja, tanto a menor DP de cinco parasitos/ μ L, quanto a maior DP, de 16.128 parasitos/ μ L, dos pacientes deste estudo, foram encontradas entre os indivíduos com este genótipo.

É importante destacar que no momento da inclusão dos voluntários primoinfectados ou com antecedentes de infecção, nos certificávamos que os mesmos não estavam ou tinham passado por tratamento para malária nos últimos 6 meses. Uma vez que se este fato ocorresse, certamente os níveis de parasitemia tenderiam ao viés de baixa categoria, mesmo se sabendo que o *Plasmodium vivax* cursa na área de estudo com o perfil de parasitemia encontrado. Incluíamos os voluntários na 1º visita ao

médico, no momento em que os mesmos se queixavam dos sintomas clássicos da malária como febre, calafrios, dor de cabeça, observando que em determinados casos estes sintomas, se apresentavam de uma forma leve e em outros casos de uma forma clínica média ou até grave.

Outro aspecto interessante são os casos de alta parasitemia, raro em malária vivax, porém observado esporadicamente em nossa região e alguns lugares do mundo. Observamos que estes casos aconteceram em particulares genótipos Duffy como o *FYA/FYB* e *FYA/FYA*, podendo estar associados a estes, ou a um possível receptor alternativo à glicoproteína Duffy.

Todavia, observamos que este genótipo (*FYA/FYA*) não está associado com a DP causada por este parasito, pois pacientes portadores deste genótipo, apresentaram mediana de DP de 1.195 parasitos/ μ L, porém com os mais diversos valores, sendo a menor DP encontrada de 15 parasitos/ μ L e a maior de 15.725 parasitos/ μ L, apresentando, portanto, DP situadas nas faixas baixa, média e alta, de acordo com Alecrim (2000).

Da mesma forma, não observamos significância estatística também relacionada às DP encontradas nos pacientes com esse genótipo quando comparada com as DP encontradas em pacientes com os demais genótipos do sistema Duffy. A mediana de DP dos pacientes com o genótipo *FYB/FYB* foi de 1.229 parasitos/ μ L, porém, com valores variando de 21 parasitos/ μ L à 11.264 parasitos/ μ L, estando, portanto, as DP encontradas situadas, apenas, nas faixas baixa e média. Observamos, ainda, que apesar dos resultados de Woolley e colaboradores (2000) que demonstraram uma significativa redução no nível de expressão dos epítomos Fy6, em hemácias maduras com o genótipo

FYB/FYB, não encontramos, neste estudo, indicadores que sustentassem associações do genótipo *FYB/FYB* com aumento ou diminuição à susceptibilidade ao *Plasmodium vivax*.

Neste estudo podemos constatar na tabela 5, que 100% dos pacientes infectados, que possuíam o gene *FYX* em heterozigose, desenvolveram DP baixa, podendo este alelo estar associado à intensidade da malária desenvolvida.

Em nossa análise das DP nestes indivíduos, verificamos que o único paciente detectado com o genótipo *FYA/FYX*, possuía uma DP de 591 parasitos/ μ L, considerada baixa segundo Alecrim (2000), sendo este, porém, um dado muito incipiente por se tratar de apenas um indivíduo. Ainda assim, pelo fato deste ter sido o primeiro episódio de malária deste indivíduo, pode-se deduzir que não houve ação de uma possível resposta imune secundária intervindo na intensidade da DP deste paciente. Conforme descrito por Fesel e colaboradores (2005), a produção policlonal de anticorpos na malária, de uma forma geral, parece estar mais associada com o estado intrínseco de ativação de indivíduos infectados, do que com a resposta imunológica específica aos antígenos parasitários, parecendo, ainda, esta ativação estar influenciada por estímulos prévios, porém sem estar associada ao nível de parasitemia em infecções sucessivas.

Da mesma forma, os oito pacientes com o genótipo *FYB/FYX* desenvolveram uma mediana de DP de 277 parasitos/ μ L, sendo a mínima encontrada nestes pacientes de 125 parasitos/ μ L e a máxima de 2.500 parasitos/ μ L, estando todas estas DP situadas na faixa considerada baixa conforme Alecrim (2000), como

demonstrado na tabela 5, sendo que estes pacientes também não possuíam antecedentes de malária, não havendo, portanto influência de resposta secundária na densidade parasitária encontrada.

Yazdanbakhsh e colaboradores (2000) demonstraram, por citometria de fluxo, uma redução de 10% da proteína Duffy na membrana das hemácias de indivíduos com o alelo *FYX* em heterozigose, sendo esta redução devido à instabilidade da proteína causada pela mutação Arg89Cys.

A presença isolada da mutação Ala100Thr, segundo Estalote, 2005, não afeta a expressão da proteína Duffy nas hemácias. Para verificar a comprovação dos achados de Yazdanbakhsh et al. (2000) e Estalote, et al. (2005) em nosso estudo, comparamos as densidades parasitárias (DP), dos pacientes com alelo *FYX* (Arg89Cys e Ala100Thr) com as DP dos pacientes *FYB/FYB* (Ala100Thr).

Neste estudo, encontramos dez pacientes com a mutação Ala100Thr isolada, todos pertencentes ao genótipo *FYB/FYB*. Estes pacientes desenvolveram uma mediana de DP de 2.079 parasitas/uL, sendo a mínima de 275 parasitos/ μ L e a máxima de 7.900 parasitos/ μ L, estando estas DP situadas nas faixas baixa e média, mostrando que as DP dos pacientes *FYB/FYB* (Ala100Thr) foram consideravelmente maiores quando comparadas com as DP dos pacientes com alelo *FYX*, concordando assim com os dados dos dois autores.

Na tabela 4, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos as DP encontradas nos indivíduos com os genótipos *FYA/FYB-*

33C e *FYB/FYB-33* com os demais genótipos Duffy, encontrados nos participantes infectados com o *Plasmodium vivax*, indicando que, apesar de haver uma diminuição na frequência de infecção entre os indivíduos heterozigotos *FYB-33*, uma vez infectados estes indivíduos podem apresentar uma DP entre as faixas baixas, médias e altas.

8. CONCLUSÕES

1. O antígeno A do sistema ABO mostrou-se associado à diminuição da taxa de infecção pelo *Plasmodium vivax* entre os pacientes da região estudada.
2. O antígeno RhD do sistema Rh, não mostrou-se associado à susceptibilidade ao *Plasmodium vivax*.
3. Os genótipos *FYA/FYB* e *FYA/FYA* mostraram-se associados ao aumento da taxa de infecção pelo *Plasmodium vivax*, porém sem estar associado aos níveis de densidade parasitária (DP), apesar de que as mais altas DP foram encontradas entre os pacientes com estes genótipos.
4. O genótipo *FYB/FYB* não foi associado tanto à taxa de infecção pelo *P. vivax*, quanto ao nível de densidade parasitária encontrada nos pacientes infectados.
5. Os genótipos *FYA/FYX* e *FYB/FYX* não mostraram-se associados à taxa de infecção pelo *Plasmodium vivax*, porém, mostraram-se associados ao baixo nível de densidades parasitárias detectadas nos pacientes infectados.
6. Os genótipos *FYA/FYB-33C* e *FYB/FYB-33C* mostraram-se associados à diminuição da taxa de infecção pelo *Plasmodium vivax*, porém sem estarem associados ao nível de densidades parasitárias desenvolvidas em pacientes infectados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM, M.G.C. Estudo clínico, resistência e polimorfismo parasitário na malária pelo *Plasmodium vivax*, em Manaus/AM. 176f. **Tese (Doutorado em Medicina Tropical)** – Universidade de Brasília, UNB, Brasil.2000.

ALBUQUERQUE, SRL. Frequência dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS, em habitantes de uma área endêmica de malária no Amazonas. Manaus, ,79f. **Dissertação (Mestrado - Ciências Hematológicas)**- Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Hemocentro do Amazonas e Universidade Federal do Amazonas, 2003

AKALIN, E.; Neylan, JF. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. **Transplantation**, 15 ; 75(9), 1496-500, 2003.

BANNISTRE, L.; MITCHELL G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends Parasitol**, 19 (5), 209-13, 2003.

BARRAGAN, A.; KREMSNER, PG.; WAHLGREN, M.; CARLSON, J. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. **Infect Immun**, 68, 2971-2975. 2000.

BARNWELL, JW.; WARTHEIMER, SP. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. **Prog Clin Biol Res**, 313, 1-11, 1989.

BAYOUMI, RA.; BASHIR, AH.; ABDULHADI, NH. Resistance to falciparum malaria among adults in central Sudan. **Am J Trop Med Hyg**, 35, 45-55, 1986.

BEIGUELMAN, B.; ALVES, FP.; MOURA, MM.; ENGRACIA, V.; NUNES, AC.; HECKMANN, MI.; GERREIRA, RG.; DA SILVA LH.; CAMARGO, EP.; KRIEGER H. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian Western Amazonian Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98 (4), 455-60, 2003.

BLUMENFELD, OO.; PATNAIK, SK. Allelic genes of blood group antigens : A source of human mutation and cSNPs documented in the in the blood group Antigen Gene Mutation Database. **Hum Mutat**, 23, 8-16, 2004

BRASIL - Ministério da Saúde . SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - SIVEP**. Acessado em 22.02.08 na https://sis.funasa.gov.br/sivep_malaria. 2008

BRUCE, MC.; DAY, KP. Cross species regulation of Plasmodium parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea. **Trends Parasitol**, 19(6), 271-7, 2003

CARLSON, J.; WAHLGREN, M. *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. **J Exp Med**, 176, 1311-1317, 1992.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; PELLEGRINO, J.; SAAD ST.; COSTA FF.; REID ME. A Novel FY Allele in Brazilians. **Vox Sang.**, 87(3), 190-5, 2004.

CAVASINI, CE.; DE MATTOS, LC.; COUTO, AA.; COUTO, VS.; GOLLINO, Y.; MORETI, LJ.; BONINI-DOMINGOS, CR.; ROSSIT, AR.; CASTILHO, L.; MACHADO RL. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon Region. **Malaria J**, 6, 167, 2007a

CAVASINI, CE.; DE MATTOS, LC.; COUTO, AA.; COUTO, VS.; GOLLINO, Y.; MORETI, LJ.; BONINI-DOMINGOS, CR.; ROSSIT, AR.; CASTILHO, L.; MACHADO, RL. Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon Region. An exception? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 101(10), 1042-4, 2007b

CHAUDHURI, A .; ZBRZEZNA, V.; POLYAKOVA, J.; ET AL. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. **J Biol Chem**, 269, 7835-8, 1994.

CHAUDHURI, A.; POLYAKOVA, J.; ZBRZEZNA, V.; POGO, AO. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non-

erythroid tissues in Duffy-negative individuals. **Blood**, 85, 615-21, 1995.

COLE-TOBIAN, JL.; MICHON, P.; DABOD, E.; MUELLER, I.; KING, CL. Dynamics of asymptomatic Plasmodium vivax infection and Duffy binding protein polymorphisms in relation to parasitemia levels in Papua New Guinea children. **Am J Trop Med Hyg**, 77(5), 955-62, 2007.

DANIELS G. Human blood groups. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

DARBONNE, WC.; RICE, GC.; MOHLER, MA.; ET AL. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. **J Clin Invest**; 88(4), 1362-9, 1991.

DE WINTER, RJ.; MANTEN, A .; DE JONG, YP.; ET AL. Interleukin 8 released after acute myocardial infarction is mainly bound to erythrocytes. **Heart**, 78(6), 598-602, 1997.

DVORAK, J.A.; MILLER, L.H.; WHITEHOUSE, W.C.; SHIROISHI, T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science**, 187(4178), 748-50,1975.

ESTALOTE, AC.; PROTO SIQUEIRA, R.; SILVA ,WA.; ZAGO, MA.; PALATINIK, M. The mutation G298A Ala100Thr on the coding sequence of the Duffy antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians. **Genet Mol Res**, 4(2), 166-73, 2005.

FESEL, C.; GOULART, LF.; SILVA NETO, A.; COELHO, A.; FONTES, CJ.; BRAGA, EM.; VAZ, NM. Increased polyclonal immunoglobulin reactivity toward human and bacterial proteins is associated with clinical protein in human Plasmodium infection. **Malar J**, 4,5,2005.

FISHER, PR; BOONE, P. Severe malaria associated with blood group. **Am J Trop Med Hyg**, 58, 122-123.1998

FLEISS J.L. Statistical methods for rates and proportions. 2 ed. **New York: John Wiley & sons**, 138-58,1981.

GAUTRET, P.; LEGROS, F.; KOULMANN, P.; RODIER, MH.; JACQUEMIN, JL.

Imported Plasmodium vivax malaria in France: geographical origin and report of an atypical case acquired in Central or Western Africa. **Acta Trop**, 78(2), 177-81, 2001.

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

HADLEY, TJ.; LU, ZH.; WASNIOWSKA, K.; ET AL. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. **J Clin Invest**; 94(3), 985-91, 1994.

HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **J Neurovirol**, 5 (1), 13-26, 1999.

HOLGERSSON, J.; BREIMER, ME.; SAMUELSON, BE. Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphingolipids. **APMIS**, 100 (Suppl 27), 18-27, 1992.

HORUK, R.; CHITNIS, CE.; DARBONNE, WC.; ET AL. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. **Science**, 261, 1182-4, 1993.

KASEHAGEN, LJ.; MUELLER, I.; KINIBORO, B.; BOCKARIE, MJ.; REEDER, JC.; KAZURA, JW.; KASTENS, W.; McNAMARA, DT.; KING, CH.; WHALEN, CC.; ZIMMERMAN, PA. Reduced Plasmodium vivax erythrocyte in PNG Duffy-negative heterozygotes. **Plos One**, 2(3), e336, 2007

KLEIN, HG.; ANSTEE, D. ABO, Lewis and P group and Ii antigens. In: **Mollison's blood transfusion in clinical medicine**. 11th. ed. Oxford: Blackwell, 114-62, 2005.

KOMINATO, Y.; HATA, Y.; MATSUI, K.; KIMURA, H. Transcriptional regulation of the human ABO histo-blood group genes is dependent on the N box upstream of the proximal promoter. **Transfusion**, 44, 1741-9, 2004.

LANGHI, DM.; BORDIN, JO. Duffy blood group and malaria. **Hematology**, 11(5),

389-98, 2006.

LEVINE, P.; BURNHAN, L.; KATZIN, WM.; VOGEL, P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. **Am J Obset Gynecol**, 42, 925-37, 1941.

McQUEEN, PG.; McKENZIE, FE. Competition for red blood cells can enhance Plasmodium vivax parasitemia in mixed-species malaria infections. **Am J Trop Med Hyg**, (1), 112-25, 2006.

MONTOYA, F.; RESTREPO, M.; MONTOYA, AE.; ROJAS, W. Blood groups and malaria. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 36, 33-38, 1994 .

MALLINSON, G.; SOO, KS.; SCHALL, TJ.; ET AL. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. **Br J Haematol**, 90 (4), 823-9, 1995.

MARIONNEAU, S.; CAILLEAU-THOMAS, A .; ROCHER, J.; ET AL. ABH and Lewis histo-blood group antigens: A model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. **Biochimie**, 83, 565-73. 2001.

MATHEWS, HM.; ARMSTRONG, JC. Duffy Blood Types and vivax Malaria in Ethiopia. **Am J Trop Med Hyg**, 30, 299-303, 1981.

MICHON, P.; WOOLEY, I.; WOOD, EM.; KASTENS, W.; ZIMMERMAN, PA.; ADAMS, JS. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the P. vivax ligand required for blood-stage infection. **FEBS Lett**, 459(1-2), 111- 4, 2001.

MILLER, LH; McAULIFFE, FM; MASON, SJ; Erythrocyte receptor for malaria merozoites. **Am J Trop Med Hyg**, 26, 204-208, 1977.

MILLER LH. Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Afrincans and African Americans. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91, 2415-2419, 1994.

MILLER, LH.; BARUCH, DI.; MARSH, K.; DOUMBO, OK. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, 415, 673-679, 2002.

MURPHY, PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu Rev Immunol**, 12, 593-633, 1994.

NEOTE, K.; DARBONNE, W.; OGEZ, J.; ET AL. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. **J Biol Chem**, 15; 268(17), 12247-9, 1993.

NEOTE, K.; MAK, JY.; KOLAKOWSKI, LF.; JR, SCHALL, TJ. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, 84, 44-52, 1994.

NICHOLS, ME; RUBINSTEIN, P; BARNWELL, J, ET AL. A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to *Plasmodium vivax*. **J Exp Med**, 1;166(3), 776-85, 1987.

NKUO-AKENJII, TK.; WEPNGONG, P.; AKOACHERE, JF. Effects of ABO/Rh blood groups, G-6-P-D enzyme activity and haemoglobin genotypes on malaria parasitaemia and parasite density. **Afr. J Health Sci**, 11(3-4), 93-7, 2004.

NOVARETTI, M.C.Z.; DORLHIAC, LPE.; CHAMONE, DAF. Blood groups in Caucasian and Black blood donors from São Paulo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 22, 23-32, 2000.

OMS. Organização Mundial da Saúde . World Malaria Report 2008 .

OSISANYIA, JO. ABO blood groups and infections with human malarial parasites in vivo and in vitro. **East Afr Med J**, 60, 616-621, 1983.

OPAS - Organización Pan-americana de la Saúde. Normas de protocolos genéricos para la eficacia de la cloroquina para el tratamiento de la malaria causada pelo *P. vivax*. Washington, Organización Pan-americana da la Saude, 2004.

PASVOL G. Eroding the resistance of Duffy negativity to invasion by *Plasmodium vivax* ? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 101 (10), 953-4, 2007.

PARASOL, N.; REID, M.; RIOS, M.; CASTILHO, L.; HARARI, I.; KOSOWER, N.S. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. **Blood**, 92, 2237-43, 1998.

PEIPER, SC.; WANG, ZX.; NEOTE, K.; ET AL. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. **J Exp Med**, 1, 181(4), 1311-7, 1995.

POGO, A.O.; CHAUDHURI, A. The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. **Semin Hematol**, 37, 122-9, 2000.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; IMWONG, M.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, NJ. Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in vivax malaria. **Acta Tropica**, (89), 351-356, 2004.

RAJAN, A.; CHITNIS, CE. Mapping regions containing binding residues within functional domains of Plasmodium vivax and Plasmodium Knowlesi erythrocytes-binding proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96 (24), 14067-72, 1999

REID, ME.; Lomas-Francis, C. The blood group antigen factsbook. 2nd ed. San Diego, CA: **Academic Press**, 2004.

ROWE, JA.; HANDEL, IG.; THERA, MA.; DEANS, AM.; LYKE, KE.; KONÉ, A.; DIALLO, DA.; RAZA, A.; KAI, O.; MARSH, K.; PLOWE, CV.; DOUMBO, OK.; MOULDS, JM. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. **pnas**, 104, 17471-17476, 2007.

RYAN, JR.; STOUTE, JA.; AMON, J.; DUNTON, RF.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, RA.; BARNWELL, JW.; ROSENBERG, R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in western Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, 75(4), 575-81, 2006.

SANS, M. Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. **Hum Biol**, 72(1), 155-77, 2000.

SANTOS, SEB.; SALZANO, FM.; FRANCO, MHL.; FREITAS, MJM.. Mobility, genetic markers, susceptibility to malaria and race mixture in Manaus, Brazil. **J Hum Evol**, 12, 373-381, 1983.

SINGH, S.; PANDEY, K.; CHATTOPADHAYAY, R.; YAZDANI, S.S.; LYNN, A; BHARADWAJ, A.; RAJAN, A.; CHITNIS, C. Biochemical, biophysical and functional characterization of bacterially expressed and refolder receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. **J Biol Chem**, 276, 17111- 6, 2001.

SHIMIZU, Y.; AO, H.; SOEMANTRI, A.; ET AL. Sero- and molecular typing of Duffy blood group in Southeast Asians and Oceanians. **Hum Biol**, 72 (3), 511-8, 2000.

SPRINGER, GF. Blood-group and Forssman antigenic determinants shared between microbes and mammalian cells. **Prog Allergy**, 15:9-77, 1971.

SVENSSON, L.; RYDBERG,L.; HELDBERG, A.; ET AL. Novel glycolipid variation revealed by monoclonal antibodies immunochemical analisis of weak ABO subgroups of A. **Vox Sang**, 89, 27-38, 2005.

SWARDSON-OLVER, C.J.; DAWSON, T.C.; BURNETT, R.C.; PEIPER, S.C.; MAEDA, N.; AVERY, A.C. *Plasmodium yoelii* uses the murine Duffy antigens receptor for chemokines as a receptor for normocyte invasion and an alternative receptor for reticulocyte. **Blood**, 99 (8), 2677-84, 2002.

TIPPET, P. A speculative model for the Rh blood groups. **Ann Hum Genet**, 50 (Pt 3), 241-7, 1986.

TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, JP.; KIM, CLV. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individual. **Nat Genet**, 10, 224-228.1995a.

TOURNAMILLE, C.; LE.; VAN KIM, C.; GANE P. ET AL. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism. **Hum Genet**, 95, 407-10.1995b.

TOURNAMILLE, C. Bases moléculaires et relations structure-fonction des antigènes de groupe sanguin Duffy: récepteur de chimiokines et de *Plasmodium vivax*. **Transfus Clin Biol**, 7, 497-509, 2000.

UDOMSANGPETCH, R.; WÄHLIN, B.; CARLSON, J.; BERZINS, K.; TORII, M.; AIKAWA, M.; PERLMANN, P.; WAHLGREN, M.. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. **J Exp Med** 169, 1835-1840, 1989.

UDOMSANGPETCH, R.; TODD, J.; CARLSON, J.; GREENWOOD, BM. The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. **Am J Trop Med Hyg** 48: 149-153, 1993.

VAN DER LAKEN, CJ.; BOERMAN, OC.; OYEN, WJ.; ET AL. The kinetics of radiolabelled interleukin-8 in infection and sterile inflammation. **Nucl Med Commun**, 19(3), 271-81, 1998.

WAGNER, FF.; GASSNER, C.; MULLER, TH.; ET AL. Molecular basis of weak D phenotypes. **Blood**, 93, 385-93, 1999.

WOOLLEY, IJ.; HOTMIRE, KA.; SRAMKOSKI, RM.; ZIMMERMAN, PA.; KAZURA, JW. Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and *FY* genotype. **Transfusion**, 40, 949-953, 2000.

YAMAMOTO F. Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A e anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology**, 20:3-22. 2004.

YAZDANBAKHSH, K.; RIOS, M.; STORRY, JR.; KOSOWER, N.; PARASOL, N.; CHAUDURI, A.; REID, ME. Molecular mechanisms that lead to reduce expression of duffy antigens. **Transfusion**, 40(3), 310-20, 2000.

10. ANEXOS

PROTOCOLO 01

Técnicas para fenotipagem ABO, Rh e Duffy

Técnica para fenotipagem ABO, Rh

Reagentes: Cartão contendo anticorpos monoclonais anti-A [Linhagem celular LM297/628 (LA-2)], anti-B [linhagem celular LM306/686 (LB-2)] e anti-D(Linhagens celulares ESD-1M, 175-2), suspensos em gel. Conservante: < 0,1% NaN₃

1. Preparar uma suspensão de hemácias a 5% em diluente “ID-Diluent 2”, pipetando 0,5 mL de ID-Diluent 2 no tubo de suspensão e em seguida 25 uL de concentrado de hemácias ou 50 uL de sangue total e homogeneizar.
2. Identificar o ID-Cartão com o nome ou o número da amostra.
3. Pipetar 10-12,5 uL da suspensão de hemácias da amostra nos microtúbulos.
4. Centrifugar o ID-Cartão durante 10 minutos na centrífuga de cartão
5. Ler e anotar os resultados das reações.

Técnica de fenotipagem Duffy.

Material utilizado:

Hemácias anticoaguladas (EDTA)

Anticorpos Anti-Fy^a de origem humana (Diamed)

Anticorpos Anti-Fy^b de origem humana (Diamed)

Cartões de gelcentrifugação com gel de sephadex, contendo soro poliespecífico antiglobulina humana (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal, linhagem celular C 139-9), suspensos em gel.

O procedimento Técnico de fenotipagem pela técnica de gel centrifugação, consiste em inicialmente lavar as hemácias a serem fenotipadas, três vezes com solução salina 0,9%, centrifugando por 1 minuto a 3.500 rpm cada lavagem, para então preparar uma suspensão das hemácias a serem fenotipadas a 1% em solução de baixa força iônica(LISS).Em seguida identificamos o cartão de gel centrifugação e pipetamos 50 uL dos reagentes anti-Fya e anti-Fyb nos respectivos canalículos no cartão de gel.Em seguida dispensamos 25 uL da suspensão de hemácias a ser testada em cada 1 dos dois tubos. O cartão foi incubado por 10 minutos à 37°C em banho seco e centrifugado em seguida por 10 minutos. A leitura foi realizada de acordo com os padrões do fabricante, descritos abaixo.

Interpretação dos resultados

Reação Positiva ++++ : Hemácias totalmente concentradas na parte superior do gel após a centrifugação.

Reação Positiva +++: Hemácias concentradas na parte superior porém se estendendo ao 1º terço superior do gel.

Reação Positiva ++: Hemácias se estendendo da parte superior do gel até a parte central do canalículo.

Reação Positiva +: Hemácias se estendendo da parte central do gel até a a parte inferior do canalículo.

Reação negativa: Hemácias totalmente concentradas na parte inferior do gel após a centrifugação.

PROTOCOLO 2

Genotipagem Duffy.

Reagentes Utilizados

Primers

-Sintetizados pela INVITROGEN life technologies.

Solução estoque (1ng/uL)

Para o cálculo utilizamos a concentração em Nmoles de cada primer e multiplicamos por 10 para sabermos a quantidade de água injetável a ser acrescentada na ressuspensão.

As alíquotas foram devidamente identificadas e armazenadas à -20°C

Solução de uso

Foram diluídos 5 uL da solução de estoque 10 vezes em água injetável.

Exemplo: 5 uL de primer + 45 uL de água injetável.

Enzima taq polimerase.

Platinum Taq DNA Polymerase

Marca - INVITROGEN

DNTP

Marca - INVITROGEN

Solução estoque: 100 mM

Solução de uso: 10mM

Reações de PCR.

Volume final: 50 uL

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidades</i>
Água injetável	33,7 uL (qsp 50 uL)
Buffer	5 uL (sempre 10% do volume final)
Cloreto de Magnésio	3 uL
Primer 1 (forward)	1 uL
Primer 2 (Reverse)	1 uL
DNTP	0,8 uL
Taq polimerase	0,5 uL
DNA extraído	5 uL (Depende da qualidade da extração)

Realizamos 35 ciclos com as seguintes fases:

95° C por 5 minutos	Desnaturação
94° C por 20 segundos	Desnaturação
62° C por 20 segundos	Anelamento
72° C por 20 segundos	Extensão
72° C por 10 minutos	

Reação de RFLP para genotipagem Duffy.

Enzima de restrição *BanI*

Marca: FERMENTAS

Volume final: 20 uL

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água injetável.	5,5 uL (qsp 20 uL)
Buffer	2,0 uL
Enzima de restrição <i>BanI</i>	0,5 uL
DNA amplificado (DUFFY)	12 uL

Observação:

Incubar a 37°C overnight ou no mínimo por duas horas.

Leitura das bandas em gel de agarose 2%

Reação de RFLP para verificação da mutação GATA:

Enzima de restrição *StyI*

Marca: Fermentas

Volume final: 20 uL

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água injetável.	5,5 uL (qsp 20 uL)
Buffer	2,0 uL
Enzima de restrição <i>StyI</i>	0,5 uL
DNA amplificado(GATA)	12 uL

Observação:

Incubar a 37°C overnight ou no mínimo por duas horas.

Leitura das bandas em gel de Poliacrilamida.

Reação de RFLP para a verificação do mutação 265 (C>T) da proteína Duffy.

Enzima de restrição *MspAI*

Marca: Fermentas

Volume final: 20 uL

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água injetável.	5,5 uL (qsp 20 uL)
Buffer	2,0 uL
Enzima de restrição <i>MspAI</i>	0,5 uL
DNA amplificado(DUFFY)	12 uL

Observação:

Incubar a 60°C overnight ou no mínimo por duas horas.

Leitura das bandas em gel de Poliacrilamida.

Reação de RFLP para a verificação da mutação 298 (G>A) da proteína Duffy.

Enzima de restrição *MWO*

Marca: Fermentas

Volume final: 20 uL

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água injetável.	5,5 uL (qsp 20 uL)
Buffer	2,0 uL
Enzima de restrição <i>MWO</i>	0,5 uL
DNA amplificado (DUFFY)	12 uL

Observação:

Incubar a 37°C overnight ou no mínimo por duas horas.

Leitura das bandas em gel de Poliacrilamida.

Preparo do gel de Agarose 1,5%

1. Em um Erlemeyer pesar 1,5 g de Agarose
2. Completar com TEB 1x para 100 mL ,
3. Tampar o Erlemeyer com plástico (Tipo Magi pac) fazendo um furo no mesmo.
4. Aquecer o Erlemeyer no forno microondas até ferver e ficar transparente.
5. Acrescentar o Brometo de Etídio no Erlemeyer (cerca de 0,7 uL para 100 mL).
6. Prepara o suporte de polimerização colocando o pente com a quantidade desejada de poços.
7. Esperar esfriar o Erlemeyer e despejar a agarose a 1,5% no suporte de polimerização.
8. Aguardar a formação do gel e retirar o pente.

As corridas em gel de agarose são para observar se houve amplificação durante o PCR, assim como verificar a qualidade do DNA amplificado, ou seja, se o mesmo está em boa quantidade (Bandas fortes), se não há rastro(não está degradado).

Aplicação das amostras no gel de Agarose

Objetivo: As corridas em gel de agarose são para observar se houve amplificação durante o PCR, assim como verificar a qualidade do DNA amplificado, ou seja, se o mesmo está em boa quantidade (Bandas fortes), se não há rastro(não está degradado).

1. Colocar o suporte com o gel de agarose dentro da cuba e encher até cobrir com tampão TEB 1x.
 2. Em um plástico (Tipo Mag Pac), dispensar pequenas gotas de azul de bromofenol (1-2uL).
 3. Pipetar 4 uL de branco e DNA, homogeneizar com a gota de azul de bromofenol e dispensar no poço do gel.
- III. Deve-se aplicar também 4 uL de Ladder porém este já vem corado
4. Sempre aplicar da seguinte forma: Ladder, branco, DNA's.
 - 5.

Obs: O DNA pode correr entre 80 e 100 v durante cerca de 5 minutos ou o suficiente para verificar a presença da banda amplificada.

Após a corrida, o gel de agarose está pronto para ser fotografado no sistema de gel documentação.

Preparação do gel de Poliacrilamida

Constituintes

1. **Acrilamida 40%**
38,5g de acrilamida
1,5g de Metileno Bis acrilamida
100mL de Água Deionizada.
2. **TEB 10X**
Água Destilada
3. **Persulfato de amônia (APS) 10%**
1g de Persulfato(APS)
9mL de Água Destilada
4. **Temed**

Gel de Poliacrilamida à 8%

1. Acrilamida 40%.....23,3mL
2. TEB 10X.....8,8mL
3. Água Dest.....55 mL
4. Persulfato de Amônia(APS) 10%.....363 uL
5. TEMED.....66 uL

Gel de Poliacrilamida à 12%

6. Acrilamida 40%.....12,8mL /2 = 6,4 mL
7. TEB 10X.....4,0mL /2 = 2,0 mL
8. Água Dest.....24,8 mL /2 = 12,4 mL
9. Persulfato de Amônia(APS) 10%.....400 uL /2 = 200 uL
10. TEMED.....16 uL = 32 uL

Preparo da Base para receber o Gel

1. Preparar os suportes com as placas de vidro
2. Prender os suportes nas bases
3. Preparar o Gel
4. Encher a placa de vidro com o gel preparado utilizando uma seringa de 10 mL com agulha.
5. Verificar a presença de bolhas e eliminá-las com a agulha
6. Colocar o pente para a formação dos poços
7. Aguardar a formação do gel. (Deixar de 1 dia para o outro)
8. Após a formação do gel, verificar, com agulha e seringa, se os poços estão obstruídos.
9. Aplicar as amostras.

Aplicação de amostras no gel de Poliacrilamida

Encher a cuba de corrida com TEB 1x conforme as marcas na cuba.

Aplicar as amostras

1. Poços vazios: Encher com azul de bromofenol.
2. Ladder: 5 uL + azul
3. PCR Total: 5 uL + azul
4. Digestão: 10 uL + azul

Correr a 100 V até o fim do gel

Após a corrida

1. Retirar a lâmina com gel da cuba de corrida
2. Colocar o gel com a lâmina em uma cuba com Água Destilada ou tampão TEB 1x
3. Retirar o gel da placa
4. Adicionar 5uL ou 10 uL de brometo de etídio e aguardar 5 minutos.
5. Fotografar o gel no sistema de documentação.

PROTOCOLO 3

Protocolo para teste de Imunofluorescência

Foram utilizados antígenos da cepa W2 proveniente da Indonésia e conjugado anti-IgG marcado com isotiocianato de fluoresceína (FLUOCON cog. 1112-I) titulada com soro de paciente malárico como controle positivo e soro de paciente com sorologia negativa para malária, chagas, sífilis, hepatite B, hepatite C, HIV e HTLV como controle negativo, sendo o *cut-off* estabelecido para a reação de 1:20 e a leitura realizada em objetiva de 40 no microscópio marac NIKON,

PROTOCOLO 4

Ficha de avaliação do paciente(FAP)

**Universidade Federal do Amazonas-UFAM
Hemocentro do Amazonas -HEMOAM
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas-FMTAM**

ESTUDO: Estudo das associações entre os sistemas ABO, Duffy, antígenos RhD e a malária vivax em habitantes do Estado do Amazonas, Brasil.

FICHA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE (FAP)

Nº: _____ Data: / /

A – Dados epidemiológicos

I. Nome: _____

II. Nome da Mãe: _____

III. Idade: _____ II.I Sexo: 1()M 2()F

IV.I. Data do Nascimento: / /

V.Local de Nascimento: _____

V.Procedência: _____

VI. Endereço: _____

Telefone: _____

VII.Gestante: () 1 – Sim 2 – Não

IX.Local provável de infecção: _____

X.Antecedentes de malária: _____

Quando foi a ultima vez e que tipo teve? _____

Nenhuma

5

1

6 - 10

2

11 - 15

3

16 - 20

14

1 + 20

B – Dados clínicos e terapêuticos

I.Sintomas:

<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Mioartralgia	<input type="checkbox"/> Colúria
<input type="checkbox"/> Vômitos	<input type="checkbox"/> Astemia	<input type="checkbox"/> Icterícia
<input type="checkbox"/> Calafrios	<input type="checkbox"/> Tosse	<input type="checkbox"/> Hematúria
<input type="checkbox"/> Dor de cabeça	<input type="checkbox"/> Diarréia	<input type="checkbox"/> Outros
<input type="checkbox"/> Tontura	<input type="checkbox"/> Disúria	(descrever)

II.Peso: _____kg Altura: _____cm Temperatura axilar: _____°C

III.Exame físico:

Hepatoesplenomegalia: () 1 – Sim () 2 – Não Palidez: () Icterícia ()

Observações: _____

C – Dados Laboratoriais

I. Gota espessa

Dia do seguimento	Densidade parasitária	Parasitas por campo	Intensidade
D0			
D3			
D7			
D14			
D21			
D28			

II. Testes Imunoehamtológicos

Fenotipagem eritrocitária

ABO : 1() A 2() B 3() AB 4() O **Rh**: 1() Positivo 2() Negativo

Duffy: 1() Fya 2() Fyb **MNSs**: M() N() S() s() U()

Pesquisa de Anticorpos Irregulares: _____

Identificação de Anticorpos Irregulares: _____

Classe: IgG () IgM ()

III. PCR para malária

(Se Duffy negativo): _____

IV. PCR para o sistema Duffy

(Se Duffy negativo na fenotipagem): _____

V. Hematologia, bioquímica e EPF:

Hematológicos		Bioquímicos	
Hemácias		Glicose	
Hb		Uréia	
Hct		Creatinina	
VCM		Transaminases	
HCM		Bilirrubina direta	
Leucócitos		Bilirrubina total	
Neutrófilos			
Bastões		EPF	
Linfócitos			
Eosinófilos		Outros	
Plaquetas			

PROTOCOLO 5

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Universidade Federal do Amazonas -UFAM
Hemocentro do Amazonas -HEMOAM
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas-
FMTAM**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo

Estudo das associações entre os sistemas ABO, Duffy, antígenos RhD e a malária vivax em habitantes do Estado do Amazonas, Brasil.

INFORMAÇÕES PARA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NESSE ESTUDO.

Objetivo do estudo.

Este estudo tem como objetivo identificar os tipos sanguíneos que podem permitir que a malária pelo *P. vivax* aconteça.

Procedimentos do estudo

Caso você tenha como resultado a gota espessa positiva para *P. vivax* e aceite em participar como voluntário serão tomadas suas informações pessoais (nome, idade, data, local de nascimento, etc), um médico te examinará e terá início o tratamento gratuito para malária. Será solicitada também sua autorização para ser colhida duas amostras de 5 mL de sangue venoso, através de punção de uma veia de braço. O sangue será examinado no Hemocentro do Amazonas (HEMOAM) para verificar o seu tipo de sangue. Após os testes, os participantes receberão o resultado da sua tipagem sanguínea ABO Rh gratuitamente. Com a sua autorização iniciaremos um acompanhamento ambulatorial do tratamento no 1º, 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias

Crítérios para participação

A participação neste estudo é voluntária, sendo os participantes do sexo masculino ou feminino a partir de 10 anos de idade (neste caso com autorização dos pais), naturais do estado do Amazonas, infectados por malária vivax.

Risco e Desconforto

O procedimento da coleta de sangue será realizado por um profissional treinado,

utilizando agulhas e seringas descartáveis o que reduzirá o risco de alguma contaminação durante o processo de coleta, sendo o único desconforto para os participantes deste trabalho, a penetração da agulha na veia do braço durante o procedimento da coleta de sangue.

Contato com o investigador principal.

O voluntário tem o direito de conversar com o investigador, Bioquímico Sérgio Roberto Lopes Albuquerque, diariamente nos períodos da manhã e da tarde no HEMOAM situado à Avenida Constantino Nery, nº 4.397, Chapada, esquina com a Avenida Pedro Teixeira ou pelo telefone 3655-0129, em qualquer fase do estudo, para pedir qualquer tipo de esclarecimento, ou se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética deste estudo.

Retirada do consentimento.

É garantida ao voluntário a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento, deixando assim de participar do estudo sem qualquer prejuízo ao mesmo.

Perdas e Danos

Neste estudo, o esperado é que não haja perdas ou danos físico ou moral por parte dos participantes, porém havendo tais ocorrências, estas devem ser comunicadas imediatamente ao pesquisador principal que deverá avaliar e tomar as devidas providências se for assim necessário. Os participantes não terão suas identidades divulgadas durante o período de execução do estudo, assim como em publicações posteriores.

Despesas e Compensações financeiras.

Os participantes deste estudo não terão nenhuma despesa ou compensação financeira, ou algum benefício adicional, por participar deste trabalho, mas estará contribuindo para o conhecimento científico da malária. Ainda assim, se houver algum prejuízo financeiro, o pesquisador responsável poderá ressarcir-lo.

A PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA. ISTO QUER DIZER QUE O PACIENTE TEM TODO O DIREITO DE NÃO PARTICIPAR OU SE RETIRAR DO ESTUDO, EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço local.

A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, uma cópia fica com o pesquisador e a outro com o paciente.

Eu,.....

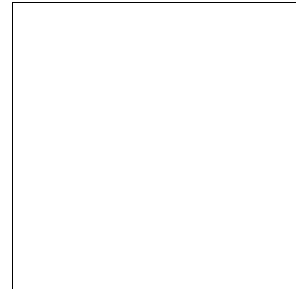
participante do estudo, recebi a explicação de que serei um(a) dos (as) participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome.

responsável pelo participante do estudo, recebi a explicação sobre a metodologia e objetivo do estudo do qual o menor, será participante.

E por estar devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

Manaus, / /

.....
Assinatura do paciente ou representante legal ou
Impressão do polegar direito do paciente,
caso este não saiba escrever seu nome.



**MÉDICO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO E INFORMAÇÕES AO
PACIENTE:**

NOME LEGÍVEL:.....

FONE:

ASSINATURA:

TESTEMUNHA:.....

Contato com Sérgio Albuquerque

Fone: 9176-9493 / 3655-0206 -HEMOAM / 3214-5703 Res.