



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Estudo dos polimorfismos *DUFFY* em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*

RECHFY KASEM ABOU ALI

MANAUS

2015

RECHFY KASEM ABOU ALI

Estudo dos polimorfismos *DUFFY* em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para Defesa no curso de *Mestrado em Ciências Aplicada à Hematologia*.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Roberto Lopes Albuquerque

MANAUS

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária da Fundação Hemoam: **Ana Cristina Chagas Sena CRB-11/348**

A196e Ali, Rechfy Kasem Abou.

Estudo dos polimorfismos *DUFFY* em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.
/ Rechfy Kasem Abou Ali. Manaus: UEA/FHEMOAM 2015.

88p . Ilust.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas em Hematologia) – Universidade do Estado do Amazonas e Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Escola de Ciências da Saúde (ESA)

Orientador : Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

1. Malária 2. Sistema Duffy 3. Plasmodium vivax I. Ali, Rechfy Kasem Abou.

CDU: 616.936

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 09/2015

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO (A) ALUNO (A) AO TÍTULO DE MESTRE

TURMA 01/2013

No dia nove do mês de Outubro de 2015, as 10h00, realizou-se a Sessão Pública da Defesa de Dissertação **“Estudo dos polimorfismos DUFFY em pacientes infectados com Plasmodium vivax.”**

Apresentada por **Rechfy Kasem Abou Ali** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Hemoterapia.

A banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Dr. (a) Sérgio Roberto Lopes Albuquerque (Presidente)
Prof. (a) Dr. (a) Simone Schneider Weber (Membro interno)
Prof. (a) Dr. (a) Pritesh Jaychand Lalwani (Membro externo)

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. (a) Dr. (a) Sérgio Roberto Lopes Albuquerque	Conceito: <u>APROVADA</u>
Prof. (a) Dr. (a) Simone Schneider Weber	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. (a) Dr. (a) Pritesh Jaychand Lalwani	Conceito: <u>Aprovada</u>

A Dissertação foi considerada:

- Aprovada
 Não Aprovada

Manaus, 09 de Outubro de 2015.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca e pelo aluno (a):

Prof. (a) Dr. (a) Sérgio Roberto Lopes Albuquerque (Presidente)	_____
Prof. (a) Dr. (a) Simone Schneider Weber (Membro interno)	<u>Simone Schneider We.</u>
Prof. (a) Dr. (a) Pritesh Jaychand Lalwani (Membro externo)	<u>Lalwani</u>
Aluno (a) <u>Rechfy Kasem Abou Ali</u>	_____

Rechfy Kasem Abou Ali

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo amor e força que ele me proporcionou.

Aos meus pais Kasem Mohamed Abou Ali e Terezinha Abou Ali, por todo amor, educação, força, apoio e compreensão ao longo de toda minha vida.

Ao meu esposo Alessandro Soares da Silva que me compreendeu em todos os momentos de dificuldades e paciência nos momentos de estresse, sempre me incentivando a nunca desistir.

Em especial ao Dr. Sérgio Albuquerque, meu orientador, pela paciência, apoio, humildade e todos os ensinamentos sobre o amor pela ciência, que para mim transmitiu.

Em especial à Márcia Kamila Souza, Celiane Batista e Alexandre Terço por toda sua dedicação e por ter estado ao meu lado neste trabalho quando mais tive dificuldade.

Em especial ao Dr. Wuelton Monteiro, Dr. Marcus Lacerda, Dra Gisely Melo e Siuhelem Rocha pelo apoio e disponibilizar as amostras e dados dos pacientes para realização deste projeto.

Aos amigos do laboratório, que também são minha família Lucianna Côrrea, Edalton Sanguino, Naiane de Paula, Agda Blenda, Diana Mota, Monique Antunes e Katiane Gomes por todo companheirismo e suporte.

AGRADECIMENTOS (cont.)

Aos meus amigos de turma em especial a Janaina Santana, Raisa Raulino, Renata Novo, Mikaela Pontes, Cintia Portela, Márcia Danielle, por todos os momentos inesquecíveis que vivemos juntos nesta jornada.

Aos colaboradores do laboratório de Imunohematologia e Genômica.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À FAPEAM e Ministério da Saúde, pelo investimento de recursos.

À Universidade Estadual do Amazonas, por esta formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências aplicada a Hematologia e a todos os seus integrantes, pela concretização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste sonho.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Estudo dos polimorfismos *DUFFY* em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*

Introdução: A malária é um importante problema de saúde pública, inclusive no Brasil, onde o *Plasmodium vivax* é mais prevalente. A glicoproteína Duffy atua como facilitadora da invasão no tecido eritróide pelo *P. vivax*; porém, ainda pouco se conhece sobre a associação de polimorfismos *DUFFY* com a susceptibilidade à este tipo de malária. Novas perspectivas, sobre a associação entre esses polimorfismos e o *P. vivax*, têm surgido em diferentes regiões endêmicas, envolvendo também a densidade parasitária das infecções. **Objetivo** Investigar o impacto dos polimorfismos *DUFFY* na malária causada por *Plasmodium vivax* **Materiais e métodos:** Pacientes infectados pelo *P. vivax*, diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical doutor Heitor Vieira Dourado com definição do tipo de malária e parasitemia através dos métodos da gota espessa, genotipagem e leucograma. Para a verificação dos polimorfismos Duffy foram realizadas no Hemocentro do Amazonas, genotipagem através da PCR/RFLP e microarray (Beadchip). Investigamos a significância estatística das frequências encontradas foi analisada utilizando o pacote estatístico *R Core Team 2013*. **Resultados:** Foram estudados 287 pacientes e 273 indivíduos sem antecedente de malária. O alelo *FYB^{ES}* foi encontrado em 53,2% de indivíduos sem antecedente de malária e 11,2% de pacientes e o alelo *FYB* esteve mais associado à média e alta densidade parasitária. **Discussão:** Os polimorfismos Duffy tem se mostrado importantes nas áreas onde predomina o *P. vivax*. No presente estudo confirmamos que o alelo *FYB^{ES}* está diretamente associado com uma redução da expressão da glicoproteína Duffy, o que pode exercer um impacto na infecção malárica. **Conclusão:** Os polimorfismos Duffy podem estar associados tanto com a frequência da infecção quanto com a densidade parasitária e a gravidade das manifestações clínicas.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium vivax*; Sistema Duffy.

ABSTRACT

Study of *DUFFY* polymorphisms in patients infected by *Plasmodium vivax*.

Introduction: Malaria is a major public health problem, including Brazil, where the *Plasmodium vivax* is more prevalent. The Duffy glycoprotein acts as facilitator in the tissue invasion of erythroid by *P. vivax*; however, little is known about the association between *DUFFY* polymorphisms and malaria susceptibility caused by this type of plasmodium. New perspectives about this subject have emerged in different endemic regions also involving the parasite density infections. **Objective:** To investigate the impact of *DUFFY* polymorphisms in patients infected by *Plasmodium vivax* **Materials and Methods:** It was studied DNA samples of Patients infected by *P. vivax*, diagnosed in the Formation of Tropical Medicine Doctor Heitor Vieira Dourado through laboratorial tests which defined the type of malaria parasitaemia as the thick smear methods, genotyping and WBC. The verification of Duffy polymorphisms were carried out in the Amazon Blood Center, through PCR / RFLP and microarray method (Beadchip). The statistical significance of the frequencies found were analyzed using the statistical package R Core Team 2013. **Results:** We studied 287 patients and 273 individuals with no history of malaria. The *FYB^{ES}* allele was found in 53.2% of subjects with no history of malaria and 11.2% of infected patients. The *FYB* allele seems to be associated with middle and high parasite density. **Discussion:** Duffy polymorphism has been considered to be important in areas where *P. vivax* predominates. In the present study we confirm the *FYB^{ES}* allele is directly associated with a reduced expression of the glycoprotein Duffy, which may have an impact on malarial infection. **Conclusion:** Duffy polymorphisms may be associated as the frequency of parasite infection well as the density and the severity of the clinical manifestations.

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; Duffy system.

LISTA DE ABREVIATURA

%	Porcentagem
°C	Graus centígrafos
µl	Microlitro
A	Adenina
Arg	Arginina
Ban I	Enzima de restrição <i>BanI</i>
C	Citosina
CXCL8	Quimiocina IL-8
Cys	Cisteína
DARC	Duffy Antigen receptor for chemokines (Antígeno Duffy receptor para quimiocina)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido ethileno diamino tetra acético
eMAP	Elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms
et al	e outros
EXON	Região codificadora de aminoácidos
Fy	Sistema Duffy
FY*(ES)	Gene <i>FY*</i> eritrocyte silent
FY*A	Alelo A do gene <i>FY</i>
FY*A/FY*B	Gene <i>FY*A/FY*B</i>
FY*B	Alelo B do gene <i>FY</i>
Fy3	Antígeno Fy3
Fy4	Antígeno Fy4
Fy5	Antígeno Fy5
Fy6	Antígeno Fy6
Fy^a	Antígeno Fy ^a
Fy^b	Antígeno Fy ^b
FYB^W ou FYB^X	Gene Duffy “b” fraco
Fy^W ou Fy^X	Antígeno Duffy “b” fraco
G	Guanina
G6PD	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase.
GATA box 1	Fator de Transcrição
gpFy	Glicoproteína Duffy

HEA BeadChip™	Plataforma de “microarray”
INTRON	Região que não codifica aminoácidos
Ladder	Marcador de peso molecular
Locus	Posição de um determinado gene num cromossomo
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
<i>MspAI</i>	Enzima de restrição <i>MspAI</i>
<i>Mwo</i>	Enzima de restrição <i>Mwo</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Análise dos fragmentos da digestão dos produtos da reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
PNG	Papua Nova Guiné
PRIMERS	Segmentos de Oligonucleotídeos sintéticos
PvDBP	Proteína de Ligação Duffy do <i>plasmodium vivax</i> .
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
<i>StyI</i>	Enzima de restrição <i>StyI</i>
T	Timina
TA	Temperatura Ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Taq DNA	Enzima DNA polimerase
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEB	Tris EDTA Borato
V	Volt
WHO	Organização Mundial da Saúde.
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão da glicoproteína Duffy nos diferentes fenótipos e genótipos Duffy. Adaptado (13)	13
Tabela 2. Resultado em cruces de parasitos contados em um exame de gota espessa. (16).....	21
Tabela 3. Comparação da frequência de genótipos Duffy encontradas em pacientes infectados por malária vivax e Indivíduos sem antecedentes de malária.	30
Tabela 4. Cortes de Densidades Parasitárias, segundo Alecrim e colaboradores (18) , encontradas nos pacientes estudados.	31
Tabela 5. Genótipos Duffy dos pacientes infectados por malária vivax de acordo com sua densidade parasitária.....	31
Tabela 6. Comparação da frequência dos Alelos Duffy encontrados em pacientes infectados por malária vivax e Indivíduos sem antecedentes de malária.	32
Tabela 7. Comparação da frequência Alélica Duffy encontrada na Densidade parasitária Média e Alta.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países e áreas de risco de transmissão de Malária. ⁽¹⁾	1
Figura 2. Brasil, área de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de IPA (Incidência Parasitaria Anual) ⁽⁶⁾	2
Figura 3. Gráfico da Proporção de casos de malária notificados, por espécie, no Brasil, 2014 ⁽⁵⁾ ...	3
Figura 4. Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i> sp. ⁽¹³⁾	6
Figura 5. Visão geral do merozoíto <i>P. vivax</i> invadindo um eritrócito jovem (reticulócito). Adaptado ⁽¹⁵⁾	7
Figura 6. Demonstração da proteína Duffy, enfatizando seus antígenos e aminoácidos. ⁽¹⁵⁾	11
Figura 7. Hibridização e emissão de fluorescência. ⁽⁵⁰⁾	25
Figura 8. Sistema automatizado de captura e análise de dados AIS 400 (Array Imaging System). ⁽⁵⁰⁾	26
Figura 9. Análise RFLP de produtos de PCR-Duffy. (fonte: Rechfy Ali)	27
Figura 10. Análise por RFLP de produtos de PCR GATA. (fonte: Rechfy Ali).....	28

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. A MALÁRIA.....	1
1.1 Malária no Brasil	2
1.2 Manifestações clínicas da malária	3
1.3 Malária subclínica (assintomática)	4
1.4. Malária por <i>Plasmodium vivax</i>	4
1.5 Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp</i>	5
1.5.1 Invasão dos merozoítos <i>P. vivax</i> nos eritrócitos jovens (reticulócitos).....	6
1.6 Diagnóstico da malária	8
2. SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO DUFFY	9
2.1 Polimorfismos Duffy	9
2.2 Expressão da glicoproteína Duffy	11
3 JUSTIFICATIVA	16
4 OBJETIVOS	17
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS	18
5.1 Área de estudo	18
5.2 Indivíduos do estudo.....	18
5.3 Comitê de ética e pesquisa.....	18
5.4 Critérios de Elegibilidade	19
5.5 Critérios de Exclusão.....	Erro! Indicador não definido.
5.6 Cálculo amostral	19
5.7 Metodologia do estudo	19
5.7.1 Método de inclusão dos indivíduos no estudo.....	20
5.8 Métodos laboratoriais:	20
5.8.1 Determinação da parasitemia e densidade parasitária.	20
5.8.2 Extração de DNA e Genotipagem Duffy	22
5.8.2.1 Extração de DNA	23
5.8.2.1.1 Pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>	23
5.8.2.1.2 Indivíduos sem antecedentes de malária	23

5.8.2.2 Reação de cadeia polimerase (PCR), BeadChip.....	24
5.8.2.3 Reação de Cadeia da Polimerase (PCR), RFLP.	27
5.8.2.4 Genotipagem para GATA, RFLP.	28
5.8.3 Métodos Estatísticos.....	29
6 RESULTADOS	30
7 DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS.....	46
ANEXO 1.....	46
Equipe do projeto.....	46
ANEXO 2.....	47
PROTOCOLO 1- Extração de DNA genômico (Brazol™ LAC Biotecnológica).....	47
PROTOCOLO 2- Genotipagem Duffy-PCR- BeadChip® KIT HEA.....	47
PROTOCOLO 3 - Genotipagem Duffy-PCR-RFLP	54
PROTOCOLO 4. Reação de RFLP para verificação da mutação GATA	55
PROTOCOLO 5. Preparo do gel de Agarose 1.5%	56
PROTOCOLO 6. Preparação do gel de Poliacrilamida	57
ANEXO 3.....	60
Tabela de resultados dos Pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>	60
Tabela de resultados dos indivíduos sem antecedente de malária.....	67

INTRODUÇÃO

1. A MALÁRIA

A Malária é uma importante doença parasitária, acometendo cerca de 97 países no mundo (Figura 1). Em 2013, a Organização Mundial da Saúde, estimou 198 milhões de casos, com cerca de 584 mil de mortes, sendo que 40% das vítimas foram reportadas nos Países Congo e Nigéria.⁽¹⁾

A malária é uma doença curável, se prontamente diagnosticada e adequadamente tratada, é causada por protozoários da ordem *Apicomplexa* e gênero *Plasmodium*, sendo as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles*^(2,3); ressaltando que o *P. ovale* e *P. knowlesi* ainda não foram descritos no Brasil.⁽¹⁾

O risco de contaminação com malária está ligado ao desmatamento de áreas rurais para construções de estradas, exploração de minérios, madeira, projetos de agricultura e irrigação, particularmente em áreas de fronteiras como a da Amazônia e da região sudeste da Ásia. Outras causas para o aumento de risco de malária incluem: mudanças climáticas globais, conflitos armados e movimento de pessoas para lugares recém-habitados.⁽⁴⁾

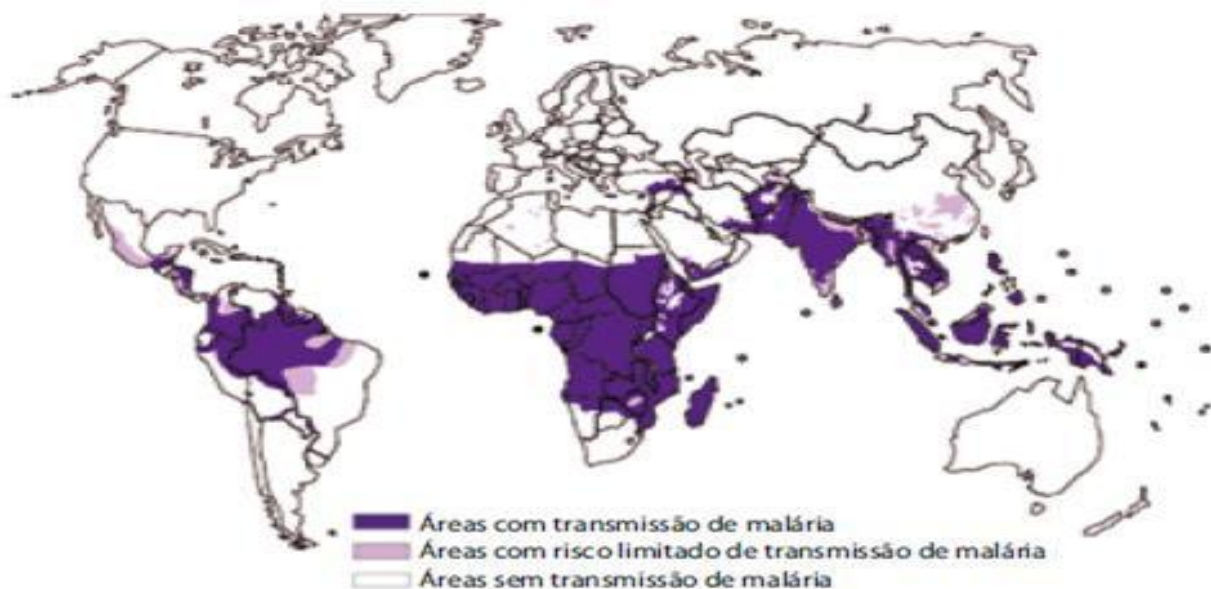


Figura 1. Países e áreas de risco de transmissão de Malária.⁽¹⁾

1.1 Malária no Brasil

Em 2014 segundo o Ministério da Saúde, foram registrados 143.549 casos de malária no Brasil, havendo uma redução no número de infectados quando comparado com o ano de 2013, no qual foram registrados 177.791 casos da doença, uma redução de 19% no número dos casos. O Estado com o maior número de casos registrados foi o Amazonas com 67.390 (47%), seguido pelo Acre com 31.241 (22%), Amapá com 13.555 (9%), Pará 11.201 (8%), Rondônia com 10.206 (7%), Roraima com 7.662 (5%), Maranhão com 1.396 (1%) e Mato Grosso com 876 (1%) registros. O estado de Tocantins apresentou o menor número de casos, com apenas 22 registros no período analisado.⁽⁵⁾

Os graus de risco de infecção são determinados de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA), que mede o número de exames positivos de malária por mil habitantes (hab.) em determinado lugar e período. As áreas são classificadas como de alto risco (IPA $\geq 50/1.000$ hab.), médio risco (IPA entre 10 e 49/1.000 hab.) e baixo risco (IPA $< 10/1.000$ hab.) (Figura 2). Em 2014, 45 municípios foram classificados como de alto risco, 82 de médio risco e 370 de baixo risco para malária.^(5, 6)

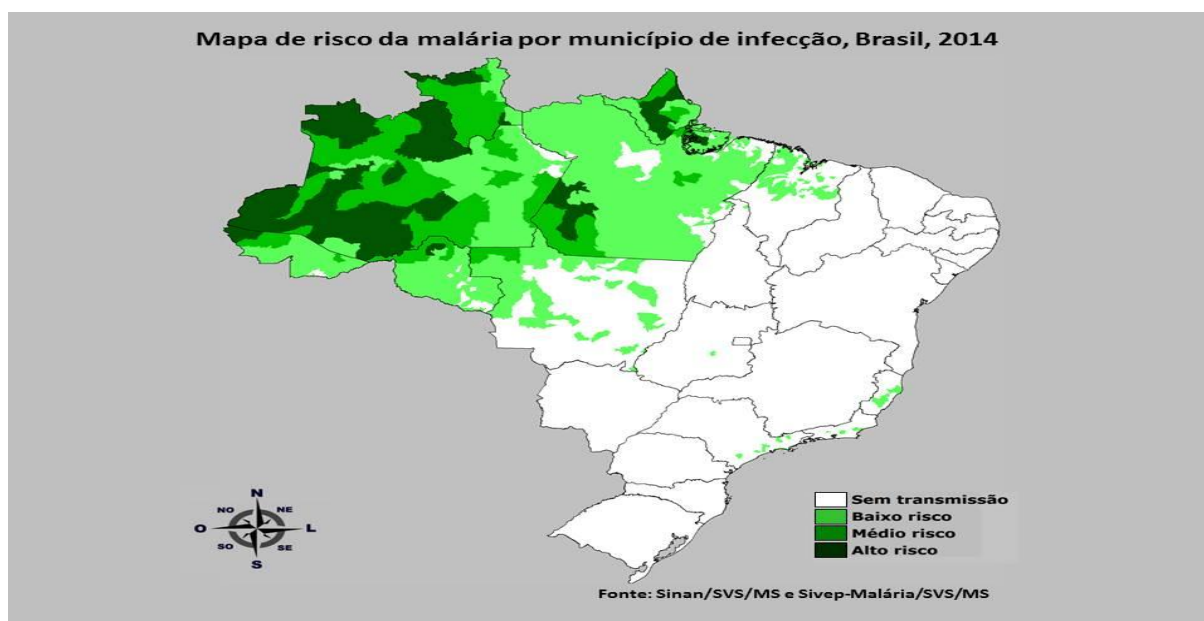


Figura 2. Brasil, área de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de IPA (Incidência Parasitária Anual)⁽⁶⁾

No Brasil, ocorre a transmissão de três espécies de parasitos da malária: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, sendo que as infecções causadas por *P. vivax* predomina com 83% de casos registrados em seguida o *Plasmodium falciparum* com 16% e *P. falciparum* + *P.vivax* 1%. Infecção pelo *Plasmodium malariae* é raramente observada (Figura 3). Nos últimos anos, um padrão de complicações clínicas anormais com casos fatais associadas com *P. vivax* tem sido relatado no Brasil.⁽⁵⁾

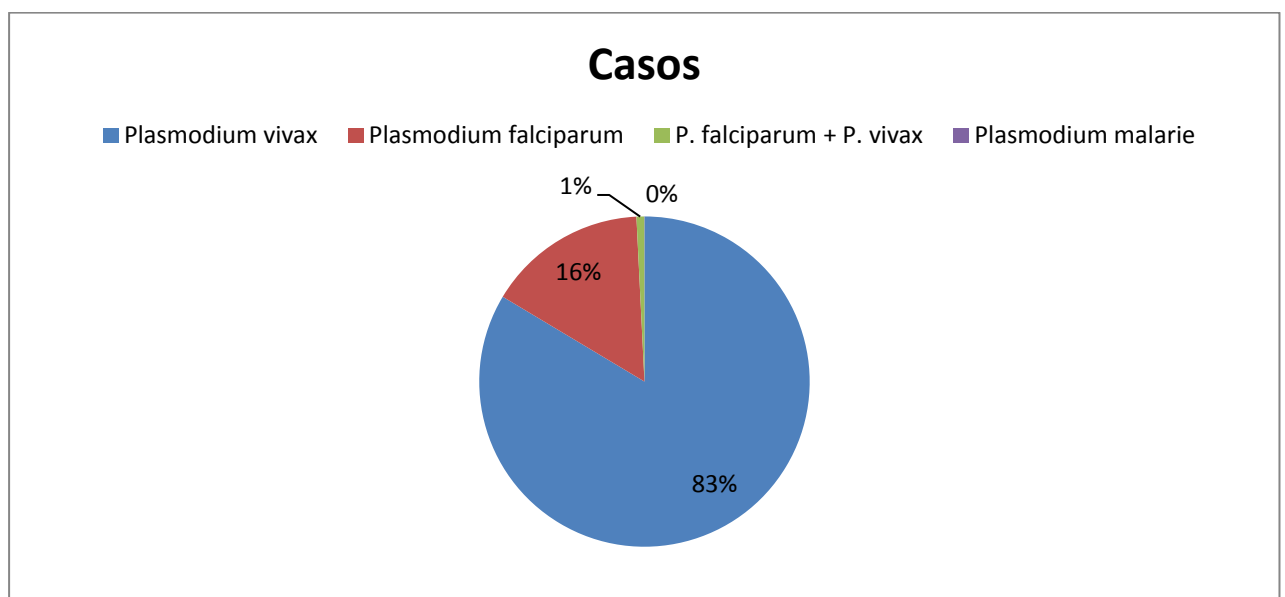


Figura 3. Gráfico da Proporção de casos de malária notificados, por espécie, no Brasil, 2014⁽⁵⁾

1.2 Manifestações clínicas da malária

O período de incubação da malária, varia principalmente de acordo com a espécie do plasmódio, sendo de 9 à 14 dias para o *P. falciparum*, 12 à 17 dias para o *P. vivax*, 18 à 40 dias para o *P. malariae* e 16 à 18 dias para o *P. ovale*. Neste período, é possível ainda não se obter um diagnóstico clínico fiel, pois esta fase sintomática inicial é caracterizada por mal estar, cefaleia, cansaço e mialgia, precedendo a clássica febre da malária, sendo esses sintomas comuns a muitas outras infecções.⁽⁷⁾

O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie,

quantidade de parasitos circulantes, tempo de doença e nível de imunidade adquirida pelo paciente, sendo gestantes, crianças e primoinfectados sujeitos a maior gravidade, principalmente por infecções pelo *Plasmodium falciparum*.⁽⁷⁾

Desde 1980 estudos como o de Driss e colaboradores⁽⁸⁾ abordam que a genética molecular tem produzido evidências incontestáveis sobre polimorfismos associados à resistência à malária e suas complexas interações, entre estes incluem o traço falciforme (HbAS), hemoglobinopatias, como talassemias e polimorfismo da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).⁽⁸⁾

A resistência a esta doença, tem incentivado estudos com intuito de investigar se fatores genéticos do hospedeiro e do parasito estão relacionados ao risco de adquirir a doença, assim como o risco de desenvolver severas complicações. Como o parasito da malária precisa invadir o tecido eritróide de seu hospedeiro humano para continuar seu ciclo de vida, proteínas da membrana eritrocitária, onde se encontram os sistemas de grupos sanguíneos utilizados para tal invasão, tem sido amplamente estudados com o objetivo de encontrar variações que facilitem ou dificultem as etapas do ciclo do parasito.⁽⁹⁾

1.3 Malária subclínica (assintomática)

A malária assintomática ocorre quando o indivíduo está infectado pelo parasito da malária, mas não apresenta sintomas, sendo este achado um ponto que merece mais estudos. Como estes indivíduos infectados, porém sem sintomas, não procuram o serviço médico e portanto não são tratados, tornam-se transmissores não detectáveis desta doença.⁽¹⁰⁾

1.4. Malária por *Plasmodium vivax*

O *Plasmodium vivax* é a espécie com a mais ampla distribuição geográfica e maior prevalência no mundo, exceto no continente africano, causando uma doença debilitante que afeta a qualidade de vida e produtividade econômica dos indivíduos infectados.⁽¹¹⁾

A malária causada por *P. vivax* é reportada como doença benigna e raramente fatal, porém, estudos recentes em Papua Nova Guiné, Indonésia, e Brasil, relataram a existência de casos de malária grave relacionada a essa espécie de plasmódio, sendo estes seguidos por complicações, tais como: malária cerebral, síndrome respiratória aguda (ARDS), disfunção hepática, trombocitopenia grave e baixo peso em neonatos derivado de infecção placentária; de forma habitual estes sintomas são vistos com mais frequência em infecções provenientes de *P. falciparum*.⁽¹¹⁾

1.5 Ciclo biológico do Plasmodium sp

A infecção se inicia quando os parasitos na forma de esporozoítos são inoculados durante a picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (vetor) no hospedeiro humano. Após a inoculação, os esporozoítos entram na corrente sanguínea, migrando para o fígado e invadindo os hepatócitos, sendo esta fase chamada de pré-eritrocítica ou esquizogonia tecidual. Nos hepatócitos, estes esporozoítos multiplicam-se dando origem a milhares de novos parasitos na forma de merozoítos, provocando a ruptura dos hepatócitos e retornando à circulação sanguínea, onde cerca de 90% dos merozoítos irão invadir as células jovens do tecido eritróide (reticulócitos), iniciando-se a segunda fase do ciclo, chamado de eritrocítica (esquizogonia sanguínea), onde surgem os sinais e sintomas da malária.⁽⁷⁾

Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem as células invadidas e invadem outras células eritróides, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária, iniciando 48h após a infecção pelo *P. vivax*. Depois de algumas gerações de merozoítos, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os microgametas (masculino) e os macrogametas (feminino) que quando ingeridos pelo vetor, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito.⁽⁷⁾

A reprodução sexuada (esporogonia) ocorre no estômago do mosquito, após diferenciação dos gametócitos em gametas e a sua fusão com a formação do ovo (zigoto) o qual se transformará

em oocineto que migrará até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto, onde se desenvolverão os esporozoítos, que por sua vez serão liberados na hemolinfa do inseto, migrando até as glândulas salivares, sendo transferidos para o hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo (Figura 4).⁽⁷⁾

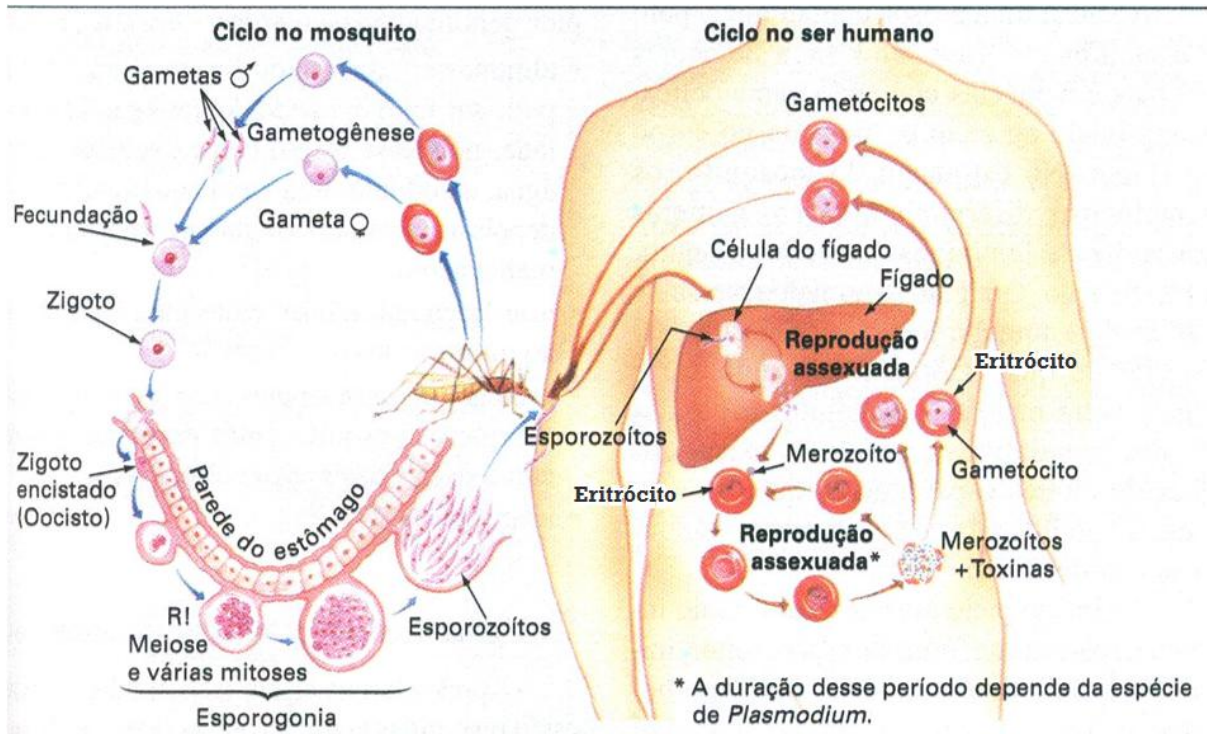


Figura 4. Ciclo Biológico do *Plasmodium* sp.⁽¹²⁾

1.5.1 Invasão dos merozoítos *P. vivax* nos eritrócitos jovens (reticulócitos)

Isolados selvagens de parasitos 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 eritrócitos com o objetivo de aumentar a variabilidade de vias de penetração em células hospedeiras.⁽¹³⁾

Diferentes ligantes dos parasitos e receptores de membrana de eritrócitos têm sido caracterizados para entender o mecanismo de invasão celular, entretanto, após o primeiro contato com os reticulócitos, os merozoítos se reorientam, posicionando sua extremidade apical para fixação à membrana do reticulócito, formando uma junção entre estas partes. ⁽¹⁴⁾

A ocorrência da junção entre o merozoíto e o reticulócito, faz com que haja liberação do conteúdo das organelas apicais, principalmente das rôptrias e dos micronemas, havendo uma invaginação da membrana do reticulócito e como consequência a invasão pelo merozoíto, formando um vacúolo parasitóforo, sendo a membrana novamente selada após a penetração completa (Figura 5). ⁽¹⁴⁾

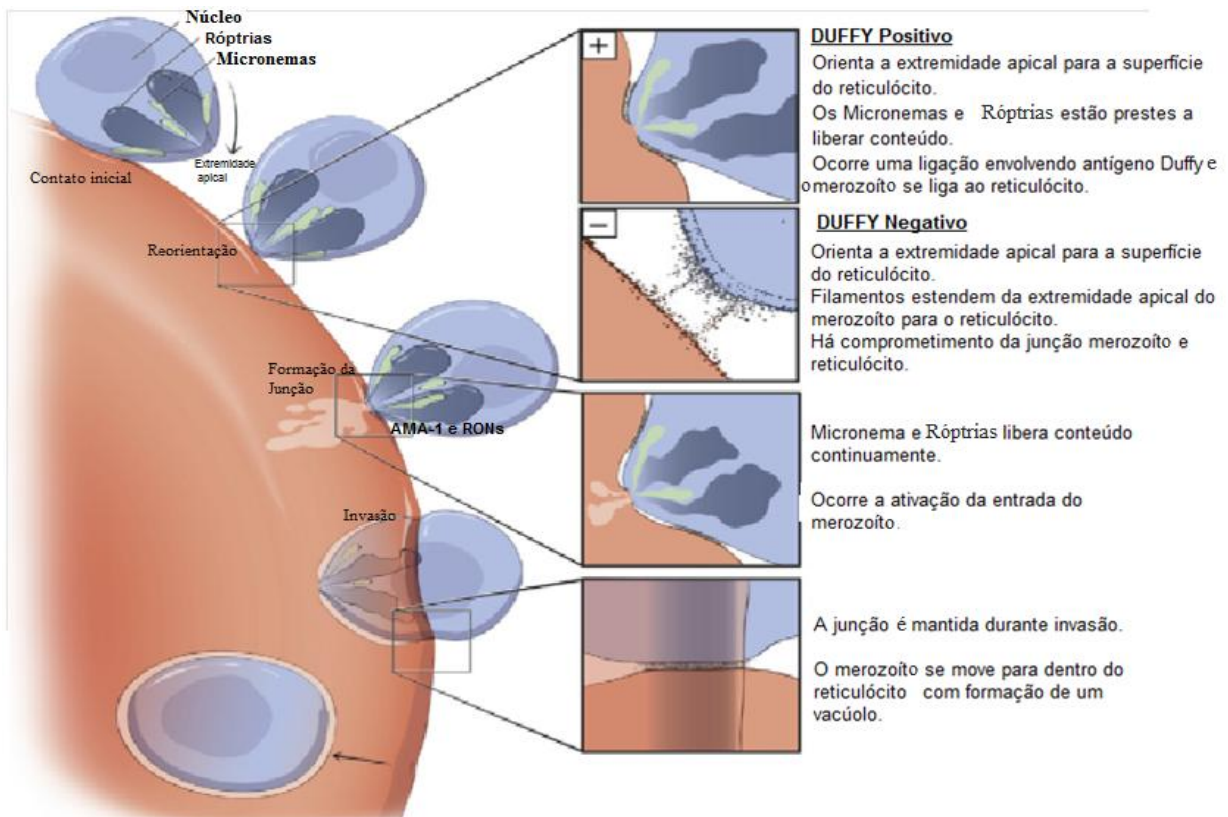


Figura 5. Visão geral do merozoíto *P. vivax* invadindo um eritrócito jovem (reticulócito). Adaptado ⁽¹⁴⁾

Para ocorrer essa ligação é necessário a interação entre a PvDBP (*P. vivax* Duffy Binding Protein), ou seja, proteína de ligação Duffy do merozoíto do *P. vivax* e a proteína de ligação do

reticulócito, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy, também denominado DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) e CD (Cluster of differentiation) 234, portanto, quando o indivíduo é Duffy negativo, o esperado é que não ocorra à junção para a penetração do merozoíto de *P. vivax* (Figura 5).⁽¹⁴⁾

Estudos mais recentes de Grimberg⁽¹⁵⁾ e Russell⁽¹⁶⁾, têm mostrado que tanto anticorpos policlonais de coelho quanto derivados de paciente, ambos específicos para PvDBP são capazes de inibir a invasão de *P. vivax*, os glóbulos vermelhos humanos, *in vitro*.^(15,16)

1.6 Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária é realizado através da determinação da parasitemia, através do método da gota espessa (GE), que consiste na coleta de uma amostra de sangue da polpa digital em uma lâmina, sendo esta gota em seguida desmembrada e corada com Giemsa, sendo a quantidade de parasitos encontrados, expresso em cruzes (de 1+ à 4+).⁽¹⁷⁾

Com o objetivo de obter uma quantificação mais precisa da quantidade de parasitos infectantes, deve-se calcular a densidade parasitária (DP), onde se é possível encontrar o quantitativo de parasitos por microlitro de sangue, como utilizado nos protocolos do projeto da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas - RAVREDA (OPAS,2004).⁽¹⁸⁾

Alecrim e colaboradores descreveram níveis de densidade parasitária de acordo com os sinais e sintomas da malária encontrados, sendo este: baixa DP, até 7.000 trofozoítos por μL , média DP, entre 7.001 e 15.000 trofozoítos por μL e alta DP, igual ou superior a 15.001 trofozoítos por μL .⁽¹⁹⁾

A variação nos níveis de densidade parasitária encontrada em diferentes pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, pode estar associada à diversos fatores genéticos tanto em relação à polimorfismos parasitários e do hospedeiro humano, podendo-se relacionar,

características imunológicas, polimorfismos na enzima G6PD, na hemoglobina, assim como na expressão da glicoproteína Duffy no tecido eritróide. Para tanto veremos a seguir alguns polimorfismos que dirigem variações na densidade antigênica no sistema de grupo sanguíneo Duffy.

2. SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO DUFFY

O sistema Duffy (Fy) foi identificado em 1950 por Cutbush e Mollison ⁽²⁰⁾, sendo o primeiro grupo sanguíneo a ter seu loco autossômico específico determinado em tecido eritróide através de aloanticorpos encontrados no soro de um hemofílico politransfundido que reconheceu um antígeno que posteriormente foi denominado Duffy a (Fy^a) ^(20, 21), sendo o antígeno Duffy b (Fy^b) descoberto por Ikin e Pettenkofer apenas um ano depois ⁽²²⁾. Os outros antígenos do sistema, Fy³, Fy⁴, Fy⁵ e Fy⁶ foram descritos nas décadas seguintes. ⁽²³⁾

2.1 Polimorfismos Duffy

O “locus Duffy” está localizado no braço longo do cromossomo 1 na posição q22-q23, sendo constituída por dois exons que se estendem por mais de 1.500 pb (pares de base) do DNA genômico. ⁽²⁴⁾

Os antígenos Fy^a e Fy^b são codificados por duas formas alélicas codominantes designadas como *FYA* e *FYB*, que diferem por um SNP (Single Nucleotide Polymorphism), ou seja, substituição de único nucleotídeo na posição 125 do exon 2 da cadeia de DNA, caracterizada pela troca de uma Guanina (G) por uma Adenina (A) (G125A), determinando a expressão dos fenótipos Fy (a+b-), Fy (a+b+) e Fy (a-b+), no entanto, um outro SNP na posição -33 T>C da região promotora do gene *DUFFY*, caracterizado pelo alelo *FY^{ES}* (ES, do inglês erytroid silent),

silenciador da expressão do alelo *FYB* no tecido eritróide, determina o fenótipo Fy (a-b-), quando em homozigose (*FYB^{ES}/FYB^{ES}*).⁽²⁵⁻²⁷⁾

Um levantamento dos polimorfismos na região promotora do gene *DUFFY*, revelou que o mesmo SNP encontrado em Africanos (alelo *FYB^{ES}*) foi observado em habitantes de Papua Nova Guiné (PNG), Tunísia e do Estado do Amazonas, no alelo *FYA* (sugerindo a presença do alelo *FYA^{ES}*).^(28, 29)

Um outro fenótipo Fy (a-b(+)), caracterizado pelo enfraquecimento da expressão do antígeno Fy^b, também conhecido como Fy^x, atualmente definido com Fy^w, é determinado por outros SNP no exon 2, sendo estes, a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 265 (C265T), determinando uma troca de uma Argenina por uma Cisteína no códon 89 (Arg89Cys) juntamente com a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 298 (G298A), levando a uma troca de uma Alanina por uma Threonina no códon 100 (Ala100Thr) da proteína caracterizando o alelo *FY^W* (“w” do inglês - weak = fraco).^(26, 30, 31)

O polimorfismo *FY^W* ocorre dentro do primeiro anel intracelular da proteína Duffy, associado à expressão reduzida da mesma na superfície celular, levando a uma detecção enfraquecida do antígeno Fy^b no teste de fenotipagem eritrocitária, onde o mesmo foi detectado, neste caso, até no máximo 2 cruzes. Sendo a frequência do alelo *FYB^W* aproximadamente 2% em caucasianos^(32, 33) e não havendo até o momento, a observação deste polimorfismo no alelo *FYA*^(33, 34).

O produto do gene *DUFFY* é a glicoproteína Duffy (gpFy), que atravessa a membrana celular por sete vezes (heptahelical), com peso molecular de aproximadamente 35kD, composta por 336 aminoácidos, com um domínio N-terminal extracelular com 60 resíduos, três loops extracelulares, três loops citoplasmáticos e uma cauda citoplasmática carboxiterminal com 28 resíduos, presente em diversos tecidos e órgãos como os seguintes: tecido eritróide, rim, baço,

coração, pulmão, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cérebro (Figura 6). ^(14, 24, 35, 36)

A região da gpFy, rica em cisteína, localizada entre os aminoácidos 8 e 42, onde encontram-se os antígenos Fy^a, Fy^b e Fy⁶, demonstrada em vermelho na figura 6, tem sido reportada como a região de ligação entre o PvDBP do merozoíto à glicoproteína Duffy, sendo esta região ainda descrita como receptora de quimiocinas (Ex. CXCL8) ⁽¹⁴⁾, atribuindo por esta razão o nome DARC (Duffy Antigen Receptor for chemokines) à glicoproteína Duffy, entretanto sem evidências até o momento, de associações entre este papel fisiológico e a infecção malárica. ^(37, 38)

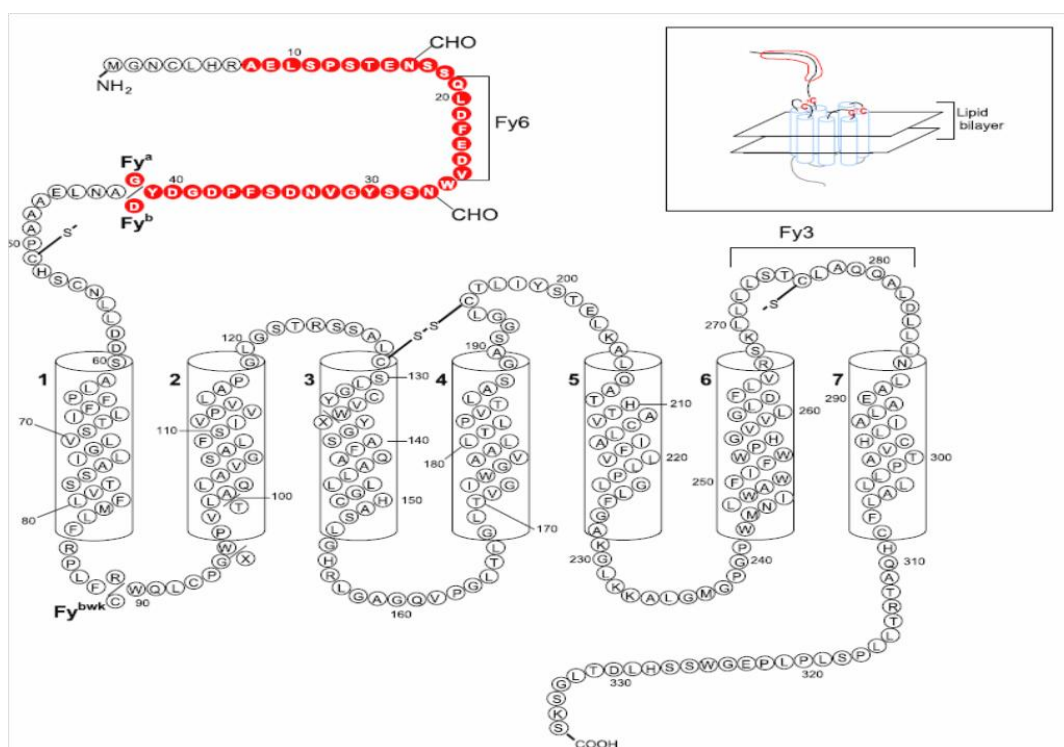


Figura 6. Demonstração da proteína Duffy, enfatizando seus antígenos e aminoácidos. ⁽¹⁴⁾

2.2 Expressão da glicoproteína Duffy

Estudos como o Nichols ⁽³⁹⁾ e Sellami ⁽⁴⁰⁾, utilizando a tecnologia de citometria de fluxo demonstraram que indivíduos com dois alelos funcionais eritróide (*FYA/FYA*) expressam aproximadamente duas vezes mais a quantidade de antígenos Fy^a quando comparado a indivíduos com apenas um alelo eritróide funcional (*FYA/FY^{ES}*) ^{(39) (40)}. Enquanto que um baixo nível de

expressão do antígeno Fy^b, associado ao polimorfismo *FY^W*, foi reportado por Chown e colaboradores.⁽³²⁾

Tournamille e colaboradores⁽³⁴⁾ em um estudos de associação entre a presença dos alelos *FYB^{ES}* e a expressão da glicoproteína Duffy, demonstraram que portadores heterozigotos com um alelo funcional e outro não funcional, como os seguintes exemplos (*FYA/FYB^{ES}*, *FYB/FYB^{ES}*), expressam aproximadamente apenas 50% da gpFy nos seus eritrócitos comparados com indivíduos homozigotos com ambos alelos funcionais (*FYA/FYA*, *FYB/FYB*), como demonstrado na tabela 01.⁽³⁴⁾

Yazdanbakhsh e colaboradores⁽⁴¹⁾ 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.⁽⁴¹⁾

De acordo com Zimmerman e colaboradores⁽¹⁴⁾, o alelo *FYB^W* está associado com uma expressão reduzida da gpFy (aproximadamente 10%), quando comparada à expressão da mesma a partir dos alelos *FYA* e/ou *FYB*.⁽¹⁴⁾

Woolley e colaboradores⁽⁴²⁾ 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 epítomos 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*.⁽⁴²⁾

Na tabela 01, é demonstrada a expressão da gpFy, de acordo com os alelos *DUFFY* (*FYA*, *FYB*, *FYB^W*, *FYA^{ES}*, *FYB^{ES}*).⁽¹⁴⁾

Alelos	Antígeno	Genótipo	Fenótipos	
			Fenotipagem	Expressão
<i>FYA</i>	Fy ^a	<i>FYA/FYA</i>	Fy (a+ b-)	2×Fya, 0×Fyb
<i>FYB</i>	Fy ^b	<i>FYA/FYA^{ES}</i>	–	1×Fya, 0×Fyb
<i>FYX</i>	Fy ^{bweak}	<i>FYA/FYB^{ES}</i>	–	1×Fya, 0×Fyb
<i>FYA^{ES}</i>	–	<i>FYB/FYB</i>	Fy (a- b+)	0×Fya, 2×Fyb
<i>FYB^{ES}</i>	–	<i>FYB/FYB^W</i>	–	0×Fya, 1,1×Fyb
–	–	<i>FYB/FYA^{ES}</i>	–	0×Fya, 1×Fyb
–	–	<i>FYB/FYB^{ES}</i>	–	0×Fya, 1×Fyb
–	–	<i>FYB^W/FYB^W</i>	Fy (a- (b+ fraco))	0×Fya, 0,2×Fyb
–	–	<i>FYB^W/FYA^{ES}</i>	–	0×Fya, 0,1×Fyb
–	–	<i>FYB^W/FYB^{ES}</i>	–	0×Fya, 0,1×Fyb
–	–	<i>FYA/FYB</i>	Fy (a+ b+)	1×Fya, 1×Fyb
–	–	<i>FYA/FYB^W</i>	–	1×Fya, 0,1×Fyb
–	–	<i>FYA^{ES}/FYA^{ES}</i>	Fy (a- b-)	0×Fya, 0×Fyb
–	–	<i>FYA^{ES}/FYB^{ES}</i>	–	0×Fya, 0×Fyb
–	–	<i>FYB^{ES}/FYB^{ES}</i>	–	0×Fya, 0×Fyb

Tabela 1. Expressão da glicoproteína Duffy nos diferentes fenótipos e genótipos Duffy. Adaptado ⁽¹⁴⁾

Albuquerque e colaboradores ⁽¹³⁾, encontraram dados com significância estatística relacionada à densidade parasitária de pacientes infectados por *Plasmodium vivax* com polimorfismos *DUFFY*, onde nos pacientes como os polimorfismos *FYA/FYB* foram encontradas as maiores DP, ao passo que 100% dos pacientes infectados, que possuíam o gene *FYB^W* em heterozigose, desenvolveram DP baixa, podendo este alelo estar associado à intensidade da malária desenvolvida. ⁽¹³⁾

Na análise das DP nos indivíduos estudados, foi verificado que o único paciente detectado com o genótipo *FYA/FYB^W*, possuía uma DP de 591 trofozoítos/μL, da mesma forma, oito pacientes com o genótipo *FYB/FYB^W* desenvolveram uma mediana de DP de 277 trofozoítos/μL, sendo a mínima encontrada nestes pacientes de 125 trofozoítos/μL e a máxima de 2.500 trofozoítos/μL, estando todas estas DP situadas na faixa considerada baixa conforme Alecrim e colaboradores ⁽¹⁹⁾, ainda assim, pelo fato deste ter sido o primeiro episódio de malária destes indivíduos, pode-se deduzir que não houve ação de uma possível resposta imune secundária intervindo na intensidade da DP deste paciente. ⁽¹⁹⁾

Com a demonstração de Yazdanbakhsh e colaboradores ⁽⁴¹⁾ de que indivíduos com o polimorfismo Arg89Cys em heterozigose (alelo FY^W) apresentam uma redução de 10% na expressão da glicoproteína Duffy no tecido eritróide, assim como a afirmação de Estalote ⁽⁴³⁾, 2005 de que a presença isolada da mutação Ala100Thr, não afeta a expressão da proteína Duffy no tecido eritróide, Albuquerque e colaboradores ⁽¹³⁾, compararam as DP dos pacientes com alelo FY^W (Arg89Cys e Ala100Thr) com as DP dos pacientes FYB/FYB (Ala100Thr), onde foi encontrado que dez pacientes com a mutação Ala100Thr isolada, todos pertencentes ao genótipo FYB/FYB , desenvolveram uma mediana de DP de 2.079 trofozoítos/ μ L, sendo a mínima de 275 e a máxima de 7.900 trofozoítos/ 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 FY^W , concordando assim com os dados dos dois autores. ^(13, 41, 43)

Foi verificado ainda que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as DP nos indivíduos com os genótipos FYA/FYB^{ES} e FYB/FYB^{ES} 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^{ES} , uma vez infectados estes indivíduos podem apresentar uma DP entre as faixas baixas, médias e altas. ^(13, 44)

Apesar da afirmação literária de que a gpFy é fundamental para a invasão do tecido eritróide pelo *P. vivax*, algumas evidências de que vias alternativas de invasão tem sido descritas, como no estudo de Cavalini e colaboradores ⁽⁴⁴⁾ que encontraram o genótipo FY negativo (FYB^{ES}/FYB^{ES}) em indivíduos infectados e não infectados pelo *P. vivax*, assim como o estudo de Carvalho e colaboradores ⁽⁴⁵⁾ que encontraram 6.9% de indivíduos Duffy negativo, infectados com *P. vivax*, concluindo que não houve diferença quanto a resistência à malária vivax entre os indivíduos Duffy negativo e Duffy positivo. ⁽⁴⁵⁾

Alguns estudos sobre a parasitemia da malária reportam associações com os mais diversos fatores como, por exemplo, a coinfeção com duas espécies de diferentes plasmódios, causando a supressão de uma das duas espécies, dependendo de suas taxas relativas de reprodução e tempo de inoculação, influenciando diretamente a parasitemia.^{(46) (47)}

Portanto neste estudo, buscamos responder a seguinte pergunta científica: Os polimorfismos Duffy estão associados à infecção *Plasmodium vivax* em pacientes infectados no Estado do Amazonas? Esta resposta poderá indicar ainda quais os polimorfismos envolvidos com uma maior frequência de infecção, uma vez que a mesma foi comparada com a frequência de genótipos *DUFFY* encontrados em indivíduos sem antecedentes para malária.

3 JUSTIFICATIVA

Este estudo dos polimorfismos *DUFFY* de acordo com a faixa de densidade parasitária em pacientes primoinfectados pelo *P. vivax*, se justifica pelas seguintes razões:

1. O *Plasmodium vivax* é responsável por 80% dos casos de malária no Estado do Amazonas, sendo, portanto uma doença que merece atenção das pesquisas realizadas em nossa região.
2. Tem sido demonstrada a diferença do background gênico da população estudada é em comparação com outras populações onde a malária é também endêmica.
3. Estudos *in vitro* com este tipo de plasmódio, ainda são inviáveis pela curta sobrevida do mesmo, sendo a observação da relação parasito hospedeiro na malária vivax a maneira mais adequada de investigação.
4. A dinâmica da variação polimórfica das proteínas do parasito e do hospedeiro no que se refere à invasão do tecido eritróide, o que tem sido um obstáculo a ser vencido para a elaboração de uma vacina eficaz para evitar a malária vivax.

4 OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o impacto dos polimorfismos *DUFFY* na malária causada por *Plasmodium vivax*.

Objetivos específicos

1. Descrever os polimorfismos *DUFFY* encontrados em pacientes primoinfectados com *Plasmodium vivax* de acordo com a faixa de densidade parasitária dos mesmos.
2. Comparar os polimorfismos *DUFFY* encontrados em pacientes primoinfectados com os encontrados em indivíduos sem antecedentes de malária.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Área de estudo

Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD e Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-FHEMOAM.

5.2 Indivíduos do estudo

Pacientes primoinfectados com *Plasmodium vivax* atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD.

Indivíduos sem antecedentes de malária, sendo estes doadores de sangue de repetição por no mínimo 10 anos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas.

5.3 Comitê de ética e pesquisa

A coleta das amostras fez parte do estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (número de aprovação 343/2009).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do FHEMOAM com o parecer aqui descrito: CAAE-0004.0.112.000-11 em 29/12/2011.

5.4 Critérios de Elegibilidade

Ser primoinfectado pelo *Plasmodium vivax*, sem co infecção com outro tipo de plasmódio, sem outra doença associada, de qualquer gênero, idade, cor.

Indivíduos sem antecedentes de malária, sendo estes doadores de sangue regulares a pelo menos 10 anos com aptos na triagem sorológica em todas as doações

5.5 Cálculo amostral

Foi utilizada como base para o cálculo amostral, a porcentagem de 7.2% de FYB/FY^{*ES} encontrado no estudo de Albuquerque e colaboradores⁽¹³⁾, sendo esta a menor frequência encontrada de um total de 15,4% de pacientes com alelos de maior impacto na densidade parasitária (FY/FY^{ES} , FY/FY^W). Utilizamos também para compor o cálculo, a média anual de 3.100 pacientes atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus Doutor Heitor Vieira Dourado, positivos para *Plasmodium vivax*, chegando ao quantitativo de 207 amostras utilizando uma margem de erro de 3.4% e um nível de confiança de 95%. No entanto, acrescentamos 25% ao quantitativo calculado, chegando à 287 indivíduos. Estes dados foram analisados através do pacote estatístico R Core Team (2013).

5.6 Metodologia do estudo

Observacional tipo corte transversal.

5.6.1 Método de inclusão dos indivíduos no estudo.

As amostras de DNA e os dados clínicos dos pacientes infectados com *Plasmodium vivax* foram fornecidos pela equipe de pesquisa do Doutor Marcus Lacerda e Doutor Wuelton Monteiro, atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus, sendo estas amostras encaminhadas para o laboratório de Genômica na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM, onde foram analisadas através de técnicas moleculares para a detecção dos polimorfismos *DUFFY*.

Os indivíduos foram incluídos de acordo com os critérios de seleção da pesquisa na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, onde a coleta das amostras sanguínea foi realizada no período de Janeiro de 2012 a Abril de 2013 após a exposição dos objetivos da pesquisa aos pacientes. Participantes foram instruídos sobre os objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em caso de menores de 18 anos, o TCLE foi assinado pelo pai ou responsável. Pacientes diagnosticados com malária foram tratados de acordo com o Ministério da Saúde.

As amostras de DNA dos indivíduos sem antecedentes de malária foram incluídas de forma randomizada através do aceite dos mesmos em permitir que suas amostras fossem genotipadas para o sistema Duffy.

5.7 Métodos laboratoriais:

5.7.1 Determinação da parasitemia e densidade parasitária.

A determinação da parasitemia foi realizada de acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), 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 cruces (Tabela 2). 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 foi como base a contagem de parasitos assexuados por 200 leucócitos e, no caso de menos de 10 parasitos identificados na leitura, à contagem dos mesmos prosseguirá até 500 leucócitos. 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 (Tabela 2).

Parasitos Contados	Número de Campos Visualizados	Cruzes
40 a 60	100	+/2 (meia cruz)
1	1	+
2 a 20	1	++
21 a 200	1	+++
+ 200	1	++++

Tabela 2. Resultado em cruces de parasitos contados em um exame de gota espessa. ⁽¹⁷⁾

A determinação da fórmula parasitária levou em conta a quantidade de leucócitos de cada paciente (leucograma). O cálculo da Densidade parasitária foi com a seguinte fórmula:

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

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, foi realizada de acordo como os protocolos do projeto da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência as Droga Antimaláricas - RAVREDA (OPAS, 2004).

Utilizamos a classificação descrita por Alecrim ⁽¹⁹⁾ 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 trofozoítos por μL
- **Média densidade parasitária:** contagem de trofozoítos entre 7.001 e 15.000 por μL
- **Alta densidade parasitária:** número de trofozoítos igual ou superior a 15.001 por μL

Todos os resultados das lâminas e o cálculo da parasitemia estão registrados no nosso banco de dados dos pacientes.

5.7.2 Extração de DNA e Genotipagem Duffy

Neste estudo foram utilizados os seguintes reagentes para extração de DNA:

1. Kit QIAmp® Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).
2. Extração manual pela técnica do fenol clorofórmio (anexo 2) utilizando reagente Brazol

Para a genotipagem Duffy foram utilizadas as técnicas de

1. Micro arranjo utilizando kits HEA Beadchip (immucor), o equipamento Array Imaging System (AIS) e o BioArray Solutions Information System (BASIS), sendo este um software que calcula a intensidade ajustada de cada reação confirmando a genotipagem e o provável fenótipo para cada polimorfismo.
2. Técnica manual de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP), pois não tivemos kits de micro arranjo em quantidade suficiente para necessárias repetições de amostras.

5.8.2.1 Extração de DNA

5.8.2.1.1 Pacientes infectados com *Plasmodium vivax*

Para a extração de DNA foi utilizado o kit QIAmp® Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Para 200 µL de sangue com EDTA foram adicionados 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão de lise. Após completa homogeneização em vórtex, a mistura foi incubada em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Ao lisado foram adicionados 200 µL de etanol 96-100%, homogeneizando em vórtex por 5 segundos para a obtenção de uma solução homogênea. Para a purificação do DNA, a solução foi aplicada em coluna, que posteriormente foi lavada sucessivamente com os dois tampões de lavagem. O DNA obtido foi eluído com 50 µL do tampão de eluição.

5.7.2.1.2 Indivíduos sem antecedentes de malária

Para extração do DNA de leucócitos de sangue venoso periférico realizamos a técnica de fenol clorofórmio utilizando kit comercial Brazol™ LAC Biotecnológica. O Brazol é a versão otimizada do método de passo único baseada na metodologia desenvolvida por Chomczynski ⁽⁴⁸⁾. Nessa técnica o DNA pode ser obtido na interfase entre a fase orgânica e a fase aquosa, através da adição de etanol e isopropanol, seguido de lavagem com etanol.

A concentração e a qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas através da concentração de DNA, o qual foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 260 nm realizadas no Nanodrop modelo 2000 Spectrophotometer (A = 230nm, 260nm e 280nm, A260/280 qualidade - ausência de RNA e proteínas, e A260/230 pureza- ausência de resíduos de extração). (Anexo n° 2- protocolo 1).

5.7.2.2 Reação de cadeia polimerase (PCR), BeadChip.

Para a técnica de reação de cadeia da polimerase foi utilizado o kit BeadChip para PCR multiplex que identifica a presença ou ausência dos alelos selecionados associados a um determinado fenótipo. Após a amplificação do PCR multiplex e processamento pós-PCR, utilizamos os reagentes Clean up e Lambda Exonuclease, neste momento as cadeias únicas de DNA são incubadas com a matriz do BeadChip levando o anelamento com as sondas correspondentes. Na reação de alongação subsequente ocorre a extensão e incorporação de moléculas de dNTP marcadas com fluorescência nas sondas em que a extremidade 3'coincida exatamente com o DNA hibridizado. Os produtos de alongação dos alelos A e B são simultaneamente detectados através de uma análise de imagem (figura 7).

Neste método, cada sonda está ligada de forma covalente a um tipo de microesfera que pode ser distinguida pelas suas qualidades de espectro. O BeadChip contém todas as probes de interesse, incluindo controles internos positivo, negativo e da reação.

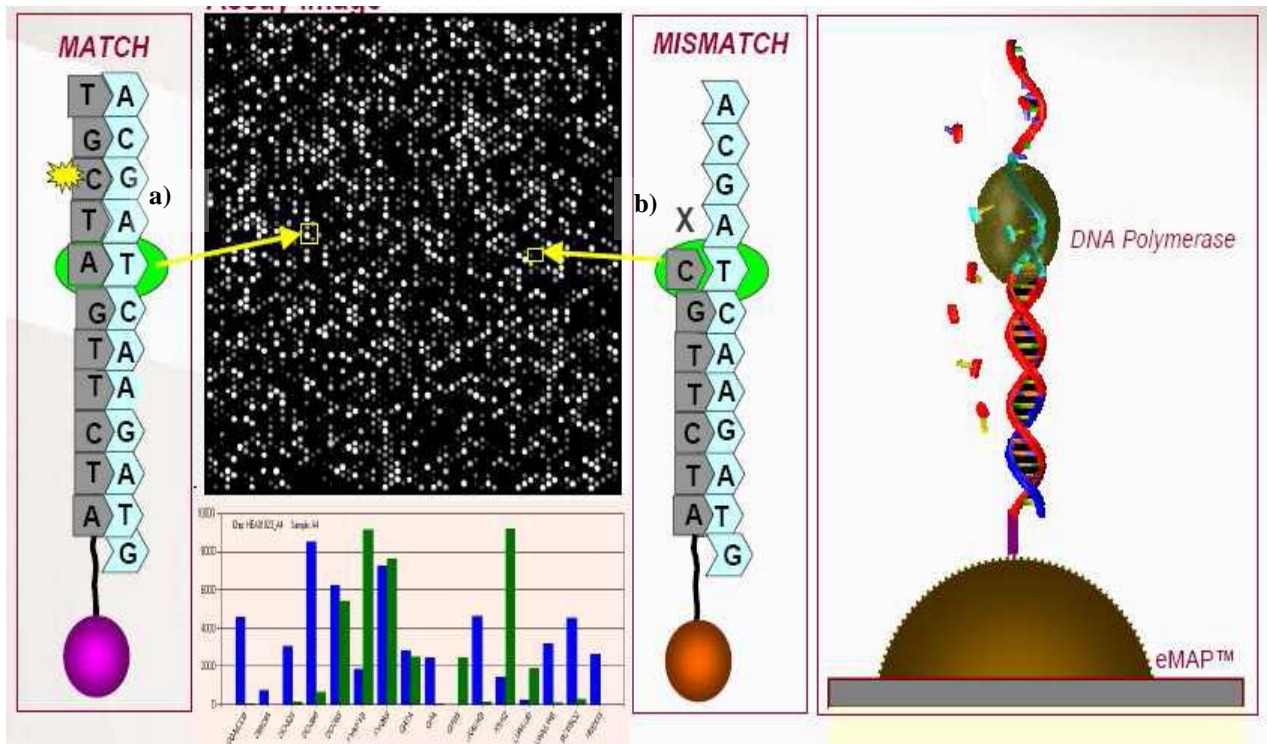


Figura 7. Hibridização e emissão de fluorescência. ⁽⁴⁹⁾

Em (a) é possível ver a emissão da fluorescência (visualizada através de um ponto branco na imagem) que ocorreu em função da hibridização do DNA alvo com a sonda pré-existente no BeadChip™. Em (b) não houve hibridização entre o DNA alvo e a sonda e desta forma, não se visualiza a emissão da fluorescência.

O sistema de imagem do equipamento (AIS400) é utilizado para captar o sinal fluorescência das microesferas individuais, determinar a identidade da microesfera pela sua cor e reportar a intensidade media do sinal, o coeficiente de variância das intensidades e número de partículas medidas para cada tipo de sonda (figura 8). O software BASIS™ importa os dados com as intensidades emitidas, verifica a validade dos controles internos e libera os resultados. (Anexo nº 2 - protocolo 2)



Figura 8. Sistema automatizado de captura e análise de dados AIS 400 (Array Imaging System). ⁽⁴⁹⁾

Este sistema é formado por um microscópio de fluorescência acoplado a um leitor de código de barras e a um computador. Cada lâmina contendo os chips de DNA possui um código de barras que a identifica e fornece ao sistema importante informações sobre a localização das beads na lâmina. Após a leitura do código de barras, o microscópio inicia a leitura de cada um dos BeadChipTM e transmite a captura da imagem para um sistema capaz de detectar a imagem e determinar a quantidade de fluorescência emitida por cada bead.

Com esta técnica verificamos o polimorfismo do nucleotídeo 125 G>A que caracteriza o fenótipo Fy^a, Fy^b. O polimorfismo -37 T>C que caracteriza a mutação GATA (Fy Eritrócito silencioso) ou *FY^{ES}*. E o polimorfismo 265 C>T caracterizando o *FY^X* ou *FY^W*. Utilizando os oligo nucleotídeo iniciador *FYAB* sense 5' TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC 3' e *FYAB* anti-sense 5' AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC 3'. A técnica de PCR para verificação do polimorfismo -37 T>C no promotor GATA Box 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 *FYI* sense 5' CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA 3' e *FYI* anti-sense 5' CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG 3'.

5.7.2.3 Reação de Cadeia da Polimerase (PCR), RFLP.

No protocolo da PCR-RFLP, descrito por Castilho e colaboradores, 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. (Anexo nº 2- Protocolo 3)

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 1,5% (Anexo nº 2- protocolo 5) 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 1,5%, 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 (figura 9).

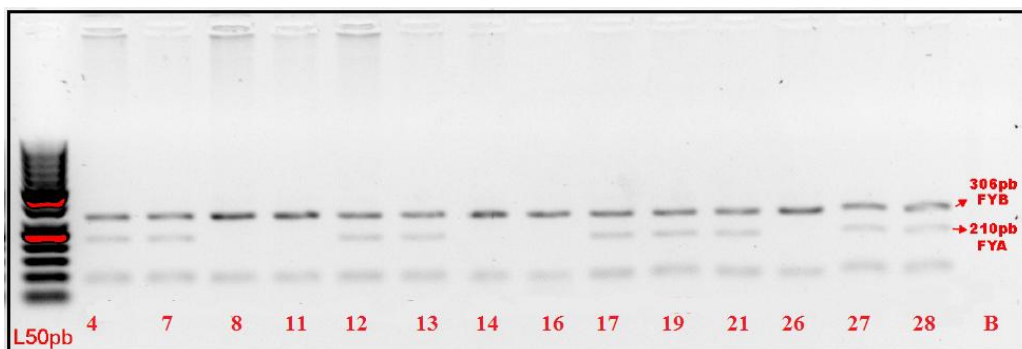


Figura 9. Análise RFLP de produtos de PCR-Duffy. (fonte: Rechfy Ali)

Uma alíquota do DNA, extraído de cada paciente, foi congelada para a realização de uma contraprova (quando necessário).

5.7.2.4 Genotipagem para GATA, RFLP.

A técnica de PCR para verificação do polimorfismo -33 T>C no promotor GATA (Anexo nº 2- protocolo 4) foi realizada em todos os indivíduos, 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 oligonucleotídeos 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 1,5% 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 12% (Anexo nº 2- protocolo 6). 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 (figura 10).

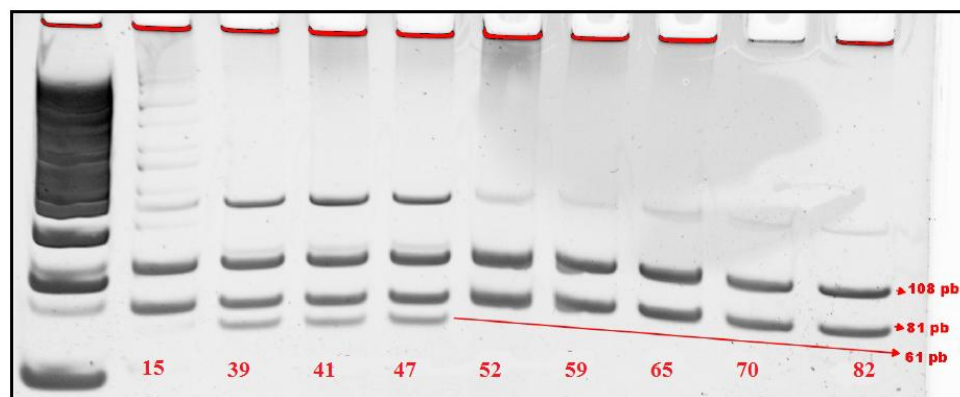


Figura 10. Análise por RFLP de produtos de PCR GATA. (fonte: Rechfy Ali)

Os testes de Biologia Molecular PCR-RFLP foram realizados na Fundação FHEMOAM com a utilização da tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), laboratório de Biologia Molecular, do setor de Pesquisa do Hemocentro da UNICAMP, sob-responsabilidade da Dra. Lilian Castilho.

5.7.3 Métodos Estatísticos

A análise estatística foi realizada através do pacote R Core Team (2013), R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Foram aplicados os testes Qui quadrado e exato de Fisher para análise das variáveis categóricas ou qualitativas e o teste de Pearson para análise das variáveis contínuas ou quantitativas. Foram realizadas as regressões necessárias em testes de associações para eliminar variáveis de confundimento com gênero e idade.

6 RESULTADOS

Realizamos genotipagem do sistema Duffy em 287 pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e 273 Indivíduos sem antecedentes de malária onde encontramos a seguinte frequência (tabela 3):

GENÓTIPOS	PACIENTES		Indivíduos sem antecedentes de malária		p
	n	%	n	%	
<i>FYA/FYA</i>	68	23,7	58	21,2	0.5537
<i>FYA/FYB</i>	124	43,2	86	31,5	(P<0,05)
<i>FYA/FYB^{ES}</i>	23	8,1	34	12,4	0.1102
<i>FYA/FYB^W</i>	1	0,3	0	0,0	1
<i>FYB/FYB</i>	61	21,3	54	19,8	0.7437
<i>FYB/FYB^{ES}</i>	8	2,8	26	9,5	(P<0,05)
<i>FYB/FYB^W</i>	1	0,3	2	0,9	0.9654
<i>FYB^{ES}/FYB^{ES}</i>	0	0,0	13	4,7	(P<0,05)
<i>FYB^{ES}/FYB^W</i>	1	0,3	0	0,0	1
TOTAL	287	100	273	100	

Tabela 3. Comparação da frequência de genótipos Duffy encontradas em pacientes infectados por malária vivax e Indivíduos sem antecedentes de malária.

Na tabela 3 é possível observar os valores estatisticamente significativos em relação à frequência dos genótipos *FYA/FYB*, *FYB/FYB^{ES}* entre pacientes infectados e indivíduos sem antecedente de malária, além da frequência esperada do genótipo *FYB^{ES}/FYB^{ES}* presente apenas em indivíduos sem antecedentes de malária.

DENSIDADE PARASITÁRIA	n	%
BAIXA (0 a 7000 trofozoítos/mm ³)	266	92,7
MÉDIA (7001 a 15000 trofozoítos/mm ³)	16	5,6
ALTA (maior 1501 trofozoítos/mm ³)	5	1,7
TOTAL	287	100

Tabela 4. Cortes de Densidades Parasitárias, segundo Alecrim e colaboradores⁽¹⁹⁾, encontradas nos pacientes estudados.

Na tabela 04 observa-se que apenas 5,6% dos indivíduos estudados apresentaram média DP e 1,7% com alta DP.

GENÓTIPOS DUFFY	DENSIDADE PARASITÁRIA									TOTAL por genótipo
	BAIXA	%	%	MÉDIA	%	%	ALTA	%	%	
<i>FYA/FYA</i>	63	23,7	92,6	4	25,0	5,9	1	20,0	1,5	68
<i>FYA/FYB</i>	114	42,8	91,9	9	56,3	7,3	1	20,0	0,8	124
<i>FYA/FYB^{ES}</i>	23	8,6	100	0	0	0	0	0	0	23
<i>FYA/FYB^W</i>	1	0,4	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>FYB/FYB</i>	55	20,7	90,2	3	18,7	4,9	3	60,0	4,9	61
<i>FYB/FYB^{ES}</i>	8	3,0	100	0	0	0	0	0	0	8
<i>FYB/FYB^W</i>	1	0,4	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>FYB^{ES}/FYB^{ES}</i>	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>FYB^{ES}/FYB^W</i>	1	0,4	100	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL por Dens. parasitária	266	100		16	100		5	100		287

Tabela 5. Genótipos Duffy dos pacientes infectados por malária vivax de acordo com sua densidade parasitária.

O resultado da tabela 5 demonstra que os genótipos *FYA/FYA*, *FYA/FYB* e *FYB/FYB* estão presentes em todos os níveis de densidade parasitária.

Alelos	Paciente		Indivíduos sem antecedentes de malária	
	n	%	n	%
<i>FYA</i>	284	49,9	236	43,3
<i>FYB</i>	255	44	222	40,5
<i>FYB^{ES}</i>	32	5,6	86	15,8
<i>FYB^W</i>	3	0,5	2	0,4
Total	574	100	546	100

Tabela 6. Comparação da frequência dos Alelos Duffy encontrados em pacientes infectados por malária vivax e Indivíduos sem antecedentes de malária.

Na tabela 6, o alelo *FYB^{ES}* se mostrou em maior porcentagem 15,8% em Indivíduos sem antecedentes de malária quando comparados aos 5,6% dos pacientes infectados por *Plasmodium vivax*.

Alelos	Densidade Parasitaria-DP	
	Media	Alta
<i>FYA</i>	17	3
<i>FYB</i>	15	7
<i>FYB^{ES}</i>	0	0
<i>FYB^W</i>	0	0
Total	32	10

Tabela 7. Comparação da frequência Alélica Duffy encontrada na Densidade parasitária Média e Alta.

Quando descrevemos a frequência alélica Duffy nos níveis de média e alta densidade parasitaria (tabela 7), verificamos a ausência dos alelos *FYB^{ES}* e *FYB^W*, com maior frequência do alelo *FYB* entre os pacientes que apresentaram alta DP.

7 DISCUSSÃO

Frequência dos polimorfismos Duffy

Estudos da frequência do genótipo *DUFFY* em indivíduos sem antecedência de malária e pacientes infectados com *Plasmodium vivax* tem sido publicado mostrando um elevado grau de miscigenação na população brasileira com variações na distribuição de alelos *FY*.

A frequência dos polimorfismos Duffy encontrada em pacientes e indivíduos sem antecedente de malária da região da Amazônia brasileira difere parcialmente de estudos realizados em outras regiões do País como o publicado por Novaretti e colaboradores⁽⁵⁰⁾, os quais descreveram uma frequência do fenótipo Fy (a-b-) de 1,1% em caucasoides e 66,9 em negros, divergindo dos 4,7% de indivíduos sem antecedente de malária encontrados neste estudo com este fenótipo (tabela 3). Além desta frequência, não houve diferença quanto aos demais fenótipos Duffy encontrados em ambos estudos. A grande diversidade de distribuição dos determinantes antigênicos Duffy, nos diversos grupos étnicos, é característica desse sistema de grupo sanguíneo.

Cavasini e colaboradores⁽⁵¹⁾ compararam a frequência de polimorfismos *DUFFY* em indivíduos infectados com *P. vivax* e não infectados da região amazônica brasileira, da mesma forma que comparamos os indivíduos de nosso estudo, sendo demonstrado em ambos resultados com diferenças estatisticamente significantes em relação aos genótipos *FY/FYB^{ES}*, com uma maior frequência em indivíduos sem antecedentes de malária. Não foram encontradas diferenças significantes quanto aos demais polimorfismos estudados entre os indivíduos em ambos os resultados. Esta concordância de achados parece demonstrar que a presença do alelo *FY^{ES}* pode ser vantajosa em relação à infecção pelo *Plasmodium vivax* nos indivíduos estudados dos Estados do

Pará e Amazonas.

Nas 287 amostras de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, não foram encontrados indivíduos Fy (a-b-), (genótipo FYB^{ES}/FYB^{ES}) (tabela 3), uma vez que este genótipo é conhecido como um fator de resistência ao *P. vivax*, como descrito por Zimmerman e colaboradores⁽¹⁴⁾. Já nos indivíduos sem antecedente de malária este genótipo se apresentou em 4,7% destes indivíduos sem antecedente de malária, confirmando assim que esse polimorfismo considerado como fator de proteção contra *P. Vivax*, embora que tem se observado, em estudos em áreas endêmicas de malária, indivíduos Fy(a-b-) infectados por *P. vivax*⁽¹⁴⁾. Estes casos podem estar relacionados a uma variação deste parasita chamada *P. Vivax like*? Ou pode-se tratar de uma porta alternativa de entrada na membrana de reticulócitos, através de outra ou outras proteínas? Estas afirmações necessitam de mais evidências para esclarecimento destes casos. De uma forma geral pode-se inferir com estes achados que a presença deste alelo fará com que haja uma diminuição na densidade da glicoproteína Duffy, provavelmente na posição onde haja a expressão da região de acoplamento dos merozoítos do *P. vivax*

Quando comparamos os resultados deste estudo com a frequência de indivíduos estudados por Albuquerque e colaboradores⁽¹³⁾ não encontramos diferença estatisticamente significativa em relação aos polimorfismos *DUFFY* em pacientes infectados por *Plasmodium vivax* do Estado do Amazonas por se tratar dos indivíduos da mesma região deste estudo.

Polimorfismos Duffy e Malária

Para delinear uma discussão envolvendo o impacto dos polimorfismos *DUFFY* e malária, iniciaremos comparando a frequência destes polimorfismos entre pacientes infectados por

P. vivax e indivíduos sem antecedente de malária do Estado do Amazonas (tabela 3), onde encontramos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos seguintes genótipos *FYA/FYB*, *FYB/FYB^{ES}* e *FYB^{ES}/FYB^{ES}*, sendo que destes três genótipos, a frequência de *FYA/FYB* foi bem maior entre os indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax* quando comparados a indivíduos sem antecedente de malária concordando com os resultados de King e colaboradores⁽⁵²⁾, pois a quantidade de antígenos Fy6, ponto de adesão e penetração do *P. vivax* nos eritrócitos, nestes genótipos apresenta-se em grande quantidade quando analisado por citometria de fluxo⁽¹⁴⁾.

O genótipo *FYB/FYB^{ES}*, apresentou-se em uma frequência significativamente menor nos pacientes infectados (2,8%), quando comparados aos indivíduos sem antecedente de malária (9,5%) sugerindo diante dos resultados deste estudo, que uma combinação genotípica de *FY*/FYB^{ES}* nos fenótipos Fy (a+b-) ou Fy (a-b+), parece levar a uma redução na susceptibilidade à malária causada pelo *Plasmodium vivax*, concordando com estudos de King e colaboradores⁽⁵²⁾.

Estudos *in vitro*, como o de Ménard e colaboradores⁽⁵³⁾, apoiam a hipótese de que eritrócitos, que expressam o genótipo *FY*/FYB^{ES}*, têm uma significante redução na citoaderência do parasita quando comparado aos eritrócitos que expressam *FYB/FYB*.

Em suas pesquisas, Tournamille e colaboradores⁽³⁴⁾; Woolley e Colaboradores^(42, 54), detectaram que a presença do alelo *FYB^{ES}* resulta em uma redução de 50% na expressão da proteína Duffy na Superfície dos eritrócitos e ainda, no estudo de Woolley e colaboradores⁽⁴²⁾ 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^{ES}* pode limitar o processo de invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium vivax*, apesar de que a susceptibilidade ao *P. vivax*, pois segundo Ménard e colaboradores⁽⁵³⁾ Culleton e colaboradores⁽⁵⁵⁾ pode ocorrer em indivíduos Duffy-

negativos heterozigotos FYB^{ES}/FYB^{ES} .

Woolley e colaboradores⁽⁴²⁾ demonstraram em seu estudo diferenças no nível de expressão dos epítomos Fy⁶, na superfície de reticulócitos de indivíduos com fenótipo Fy (a+b+), pela técnica de citometria de fluxo. Essa expressão 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 os maiores números de pacientes infectados apresentavam o genótipo heterozigoto FYA/FYB (43,2%), 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 nos eritrócitos dos pacientes com o genótipo FYA/FYB .

O genótipo FYA/FYA (23,7%), não se apresentou associado com o aumento da susceptibilidade à malária vivax, em relação aos indivíduos sem antecedente de malária, discordando com os resultados de Wooley e colaboradores⁽⁴²⁾, pois a quantidade de antígenos Fy⁶ nestes genótipos também se apresenta em grande quantidade quando analisado por citometria de fluxo.

Cavasini e colaboradores⁽⁵¹⁾ em seu estudo com pacientes infectados com *Plasmodium vivax* da região Amazônica brasileira, encontrou 16,3% do genótipo FYA/FYA e 20,3% do genótipo FYB/FYB , não encontrando, portanto indicação de associação com a frequência da infecção pelo *P. vivax*, concordando com o resultado encontrado neste estudo, e ainda discordando

dos resultados de Woolley e colaboradores⁽⁴²⁾ que afirmam que os antígenos Fy⁶ 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 não encontramos neste estudo, porém foi encontrado por Cavasini e colaboradores⁽⁵¹⁾. Outro achado interessante em nosso estudo foi a presença do polimorfismo *FYB^{ES}/FYB^W* em um dos pacientes infectados, onde o mesmo polimorfismo não foi descrito por Cavasini e colaboradores⁽⁵¹⁾.

Destacando os dados descritos 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⁽⁵¹⁾, quando comparada entre os pacientes estudados e indivíduos sem antecedente de malária. Segundo o estudo de Woolley e colaboradores⁽⁴²⁾, o esperado seria que houvesse uma associação entre uma baixa frequência de infecções pelo *Plasmodium vivax* em pacientes com o genótipo *FYB/FYB*, 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 à existência de possíveis receptores alternativos a infecção pelo *P. vivax*.

Nossos resultados indicam associações do alelo *FYB^{ES}* com a diminuição da frequência de infecção e corroboram com os achados de outros autores citados no estudo de Zimmerman e colaboradores⁽¹⁴⁾.

Segundo Nichols e colaboradores⁽³⁹⁾, os indivíduos que possuem o genótipo *FYB^{ES}/FYB^{ES}* não expressam o antígeno Fy⁶ em seus eritrócitos, o que pode indicar que existe uma rota alternativa de penetração do *Plasmodium vivax* no eritrócito, ou seja 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 Woldearegai e colaboradores⁽⁵⁶⁾, após detectar em seu estudo indivíduos Fy(a-b-) infectados por *P. vivax*, o que nos leva a acreditar que o grupo sanguíneo Duffy-negativo não parece oferecer proteção absoluta contra a infecção pelo *P. vivax* nesta região.

No presente estudo os alelos *FYB^{ES}*, parecem exercer um impacto na infecção malárica uma vez que quando combinados com outro alelo Duffy, podem fazer com que a glicoproteína seja expressa nos reticulócitos apenas com a metade de sua densidade antigênica, afetando a região N terminal, considerada a região da citoaderência do *P. vivax* como descrito por Zimmerman e colaboradores⁽¹⁴⁾. A combinação genotípica de *FY*/FYB^{ES}* foi 26,6% em indivíduos sem antecedente de malária e 11,2% em pacientes infectados (tabela 3), sendo estatisticamente significativa, pois o universo de pacientes infectados neste estudo foi consideravelmente menor que os indivíduos sem antecedente de malária. O alelo *FYB^W* não foi associado com nenhum dos grupos, no entanto todos os 3 pacientes com esse genótipo possuíam uma densidade parasitária baixíssima, mostrando que este alelo pode estar associado com malária sub clínica.

Polimorfismos Duffy e densidade parasitária

A densidade parasitária está relacionada à quantidade de parasitos por microlitros encontrada, o que depende de fatores que possa facilitar ou não a penetração de parasitos como é o caso da glicoproteína Duffy e seus polimorfismos que podem estar diretamente ligado densidade parasitária do *Plasmodium vivax* nos eritrócitos. Neste estudo os números de pacientes infectados foram agrupados de acordo com as densidades parasitárias (DP), onde 92,7% apresentaram Baixa (até 7.000 trofozoítos por mm³), 5,6% com Média (entre 7.001 e 15.000 por mm³) e 1,7% com

Alta (igual ou superior a 15.001 por mm³) (tabela 4).

Na tabela 5 observa-se que 100% dos pacientes, com genótipos *FYA/FYB^{ES}*, *FYA/FYB^W*, *FYB/FYB^{ES}*, *FYB/FYB^W* e *FYB^{ES}/FYB^W* apresentaram Baixa densidade parasitária, enquanto que 5,9% dos pacientes com genótipo *FYA/FYA*, 7,3% dos *FYA/FYB*, 4,9% dos *FYB/FYB* apresentaram Média densidade parasitária e apenas 1,5% dos pacientes com o genótipo *FYA/FYA*, 0,8% dos *FYA/FYB* e 4,9% *FYB/FYB*, apresentaram Alta densidade parasitária. Não encontramos pacientes com o polimorfismo *FYB^{ES}/FYB^{ES}* infectados pelo *P. vivax*, uma vez que estes não possuem a glicoproteína Duffy expressa em seu tecido eritróide

Verificamos que não houve diferença significativa quando comparamos as DP encontradas nos indivíduos com os genótipos *FYA/FYB^{ES}* e *FYB/FYB^{ES}* 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^{ES}*, uma vez infectados estes indivíduos podem apresentar uma DP Baixa.

Os pacientes com genótipos *FYA/FYA*, *FYA/FYB* e *FYB/FYB*, apresentaram DP situadas nas faixas Baixa, Média e Alta de acordo com as definições de Alecrim e colaboradores⁽¹⁹⁾, ou seja, tanto a menor DP de 78 trofozoítos/μL, quanto a maior DP, de 23.896 trofozoítos/μL, dos pacientes deste estudo, foram encontradas entre os indivíduos com estes genótipos.

Outro aspecto interessante são os casos de alta densidade parasitária, raro em malária vivax, porém observado esporadicamente em nossa região e em alguns lugares do mundo. De acordo com a tabela 7, observamos que estes casos aconteceram em particular com a maior frequência alélica de *FYB*, podendo este alelo estar associado à Alta DP, ou a um possível receptor

alternativo à glicoproteína Duffy.

Observamos, ainda, que apesar dos resultados de Woolley e colaboradores⁽⁴²⁾ que demonstraram uma significativa redução no nível de expressão dos epítomos Fy6, em eritrócitos maduros com o Alelo *FYB* em homozigose, não encontramos, neste estudo, na tabela 6, indicadores que sustentassem associações deste Alelo *FYB* com aumento ou diminuição à susceptibilidade ao *Plasmodium vivax*.

Neste estudo podemos constatar na tabela 5 e tabela 7, que 100% dos pacientes infectados, que possuíam o Alelo *FYB^{ES}* e *FYB^W* em heterozigose, desenvolveram Baixa densidade parasitária, podendo estes alelos estar associado à intensidade da malária desenvolvida.

Em nossa análise das densidades parasitaria nestes indivíduos, verificamos que 3 pacientes detectado com o Alelo *FYB^W* segundo tabela 6, os mesmos possuíam uma DP 78 a 513 trofozoítos/ μ L, considerada Baixa segundo Alecrim e colaboradores⁽¹⁹⁾, concordando com o achado no estudo de Albuquerque e colaboradores⁽¹³⁾ em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* da região amazônica. Há uma justificativa para esse número bastante reduzidos de pacientes que apresentaram este alelo *FYB^W* nos 2 estudos, pois segundo Yazdanbakhsh e colaboradores⁽⁴¹⁾ que demonstraram, por citometria de fluxo, uma redução de 10% da proteína Duffy na membrana dos eritrócitos de indivíduos com o alelo *FYB^W* em heterozigose, sendo esta redução devido à instabilidade da proteína causada pelo polimorfismo Arg89Cys, e provavelmente ajudando na diminuição da frequência de infecção entre os indivíduos por *P. vivax*.

Nossos resultados juntamente com publicações anteriores da literatura demonstram que há uma associação significativa entre os polimorfismos Duffy com a suscetibilidade e resistência à

malária por *Plasmodium vivax*. O presente estudo demonstrou que o genótipo *FYA/FYB* foi o prevalente entre os indivíduos infectados, sendo que se compararmos os alelos *FYA* e *FYB* separadamente não houve diferença entre os pacientes infectados com *P. vivax*, e os indivíduos sem antecedente de malária. Por outro lado, o Alelo *FYB^{ES}* tanto em homozigose quanto em heterozigose, mostrou uma diminuição da susceptibilidade quando associada a alelos *FYA* e *FYB* ou proteção quando apresentado *FYB^{ES}/FYB^{ES}*. Estes achados sugerem que este polimorfismo ainda poderia ser uma seleção vantajosa na população de áreas que são endêmicas *P. vivax*. Porém alguns estudos com dados recentes sugerem que *P. vivax* pode estar a evoluir, usando receptores alternativos para se ligar e invadir o eritrócito.

Nas últimas décadas, estudos revelaram a complexidade do sistema Duffy em seus níveis fenotípico e genotípico, e que a ausência de seus antígenos nos eritrócitos parece ter um significativo impacto na distribuição das populações humanas nas áreas em que a malária é endêmica. O sistema Duffy constitui, portanto, um sistema polimórfico que oferece grandes desafios aos pesquisadores não somente pela sua importância acadêmica, mas também pelas potenciais aplicações no tratamento envolvendo a malária vivax, onde há uma seleção natural desta população e que a adaptação natural em área endêmica de malária pode levar a mecanismos parciais de defesa contra *P. vivax*.

CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente estudo, as condições em que foram realizadas as técnicas moleculares para a caracterização dos polimorfismos Duffy em amostras de DNA de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* podemos concluir que:

1. Os genótipos *FYA/FYA* e *FYA/FYB* mostraram-se associados ao aumento da frequência de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, porém sem estar associado aos níveis de densidade parasitária (DP).
2. Os genótipos *FYA/FYB^W*, *FYB/FYB^W* e *FYB^{ES}/FYB^W* não se mostraram associados aumento de indivíduos infectados pelo *P. vivax*, porém, mostraram-se associados ao baixo nível de densidades parasitárias detectadas nos pacientes infectados.
3. Os Alelos *FYA* e *FYB* não mostraram-se associados tanto frequência de infecção pelo *P. vivax*, quanto ao nível de densidade parasitária encontrada nos pacientes infectados.
4. O Alelo *FYB^{ES}* mostrou-se associado à diminuição da frequência de infecção pelo *P. vivax*, e ao baixo nível de densidades parasitárias desenvolvidas nestes pacientes infectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Malaria Report 2014. WHO Global Malaria Programme. 2015.
2. da Silva Santos S, Clark TG, Campino S, Suarez-Mutis MC, Rockett KA, Kwiatkowski DP, et al. Investigation of Host Candidate Malaria-Associated Risk/Protective SNPs in a Brazilian Amazonian Population. *PLoS one*. 2012;7(5):e36692.
3. Costa DC. A reação em Cadeia da Polimerase como técnica auxiliar no diagnóstico de malária em serviços de saúde de referência em Minas Gerais; The polymerase chain reaction technique to assist in diagnostic malaria in health services reference in Minas Gerais: Centro de Pesquisas René Rachou; 2010.
4. Katsuragawa TH, Cunha RPdA, Souza DCAd, Gil LHS, Cruz RB, Silva AdA, et al. Malaria and hematological aspects among residents to be impacted by reservoirs for the Santo Antônio and Jirau Hydroelectric Power Stations, Rondônia State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2009;25(7):1486-92.
5. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico, Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015;Volume 46.
6. Ministério da Saúde SdVeS. Mapa de risco por município de infecção, Brasil, 2014. Portal da Saúde. 2015.
7. Neves DP. Parasitologia humana. 12 ed ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
8. Driss A, Hibbert JM, Wilson NO, Iqbal SA, Adamkiewicz TV, Stiles JK. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. *Malar J*. 2011;10:271.
9. Rowe JA, Opi DH, Williams TN. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *Current opinion in hematology*. 2009;16(6):480.
10. Da Silva R, Pinto A, Calvosa V, de Souza JM. Esquemas terapêuticos encurtados para o tratamento de malária por *Plasmodium vivax*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:235-9.
11. Sanchez BAM. Caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) e da resposta imune anti Duffy Binding Protein em indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax*; Characterization of the receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) and the immune response anti Duffy Binding Protein in individuals exposed to *Plasmodium vivax*: Centro de Pesquisas René Rachou; 2011.
12. Jotta LdACV, da Silva Carneiro MH. Malária: as imagens utilizadas em livros didáticos de biologia. *Anais do VII Encontro Nacional de Pesquisa em Ensino em Ciências*. 2009:01-11.
13. Albuquerque SRL, de Oliveira Cavalcante F, Sanguino EC, Tezza L, Chacon F, Castilho L, et al. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitology research*. 2010;106(5):1049-53.
14. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Puijalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013;81:27-76.
15. Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, et al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS medicine*. 2007;4(12):e337.
16. Russell B, Suwanarusk R, Borlon C, Costa FT, Chu CS, Rijken MJ, et al. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Blood*. 2011;118(13):e74-e81.
17. World Health Organization. Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual. Geneva: WHO. 2011.
18. Teixeira JRM. Resposta terapêutica da malária por *Plasmodium vivax* a cloroquina e primaquina. [Doutorado]: Universidade Federal do Pará; 2011.
19. Alecrim MdGC. Estudo clínico, resistência e polimorfismo parasitário na malária pelo *Plasmodium vivax*, em Manaus-AM: Universidade de Brasília. Departamento de Medicina Tropical; 2000.
20. Cutbush M, Mollison P. The Duffy blood group system. *Heredity*. 1950;4(3):383.
21. COMPTON A, HABER JM. The Duffy Blood Group System in Transfusion Reactions: A Review of the Literature and Report of Four Cases. *Blood*. 1960;15(1):186-91.
22. IKIN E, PETTENKOFER H. Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fyb. *Nature*. 1951;168(4288):1077-8.
23. Jens E, Pagliarini T, Novaretti MC. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática Transfusional. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27(2):110-9.
24. Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1968;61(3):949.
25. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo A. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood*. 1995;85(3):615-21.

26. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron J-P, Colin Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Human genetics*. 1995;95(4):407-10.
27. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nature genetics*. 1995;10(2):224-8.
28. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, et al. Emergence of FY* Anull in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(24):13973-7.
29. Langhi D, Orlando Bordin J. Duffy blood group and malaria. *Hematology*. 2006;11(5-6):5-6.
30. Castilho L, Rios M, Pellegrino J, Saad S, Costa F, Reid M. A novel FY allele in Brazilians. *Vox sanguinis*. 2004;87(3):190-5.
31. Oscar Pogo A, Chaudhuri A, editors. *The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor*. Seminars in hematology; 2000: Elsevier.
32. Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele. *American journal of human genetics*. 1965;17(5):384.
33. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, et al. The Fyx phenotype is associated with a missense mutation in the Fyb allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *British journal of haematology*. 1998;103(4):1184-91.
34. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fyx individuals. *Blood*. 1998;92(6):2147-56.
35. Mathew S, Chaudhuri A, Murty V, Pogo A. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (FY) at 1q22→q23 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics*. 1994;67(1):1-22.
36. Forabosco P, Collins A, Morton N. Integration of gene maps: updating chromosome 1. *Annals of human genetics*. 1995;59(3):291-305.
37. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 1996;7(1):47-64.
38. Darbonne W, Rice G, Mohler M, Apple T, Hebert C, Valente A, et al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *Journal of Clinical Investigation*. 1991;88(4):1362.
39. Nichols M, Rubinstein P, Barnwell J, de Cordoba SR, Rosenfield R. A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to Plasmodium vivax. *The Journal of experimental medicine*. 1987;166(3):776-85.
40. Sellami M, Kaabi H, Midouni B, Dridi A, Mojaat N, Boukef M, et al. Duffy blood group system genotyping in an urban Tunisian population. *Annals of human biology*. 2008;35(4):406-15.
41. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry J, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion*. 2000;40(3):310-20.
42. Woolley I, Hotmire K, Sramkoski R, Zimmerman P, Kazura J. Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion*. 2000;40(8):949-53.
43. Estalote AC, Proto-Siqueira R, Silva Jr W, Zago MA, Palatnik M. The mutation G298A→Ala100Thr on the coding sequence of the Duffy antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians. *Genet Mol Res*. 2005;4(2):166-73.
44. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto ÁADA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, de Souza Neiras WC, et al. Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007b;101(10):1042-4.
45. Carvalho TA, Queiroz MG, Cardoso GL, Diniz IG, Silva AN, Pinto AY, et al. Plasmodium vivax infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malaria journal*. 2012;11(1):1-6.
46. Bruce MC, Day KP. Cross-species regulation of Plasmodium parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends in parasitology*. 2003;19(6):271-7.
47. McQueen PG, McKenzie FE. Competition for red blood cells can enhance Plasmodium vivax parasitemia in mixed-species malaria infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(1):112.
48. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-4, 6-7.
49. Ribeiro KAR. Genotipagem eritrocitária em larga escala: impacto na medicina transfusional: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas; 2009.
50. Novaretti MC, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Blood groups in caucasian and black blood donors from São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2000;22(1):23-32.

51. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, et al. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malaria journal*. 2007a;6(1):167.
52. King CL, Adams JH, Xianli J, Grimberg BT, McHenry AM, Greenberg LJ, et al. Fy(a)/Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to Plasmodium vivax malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 13;108(50):20113-8. PubMed PMID: 22123959. Pubmed Central PMCID: 3250126.
53. Menard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbao A, et al. Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(13):5967-71.
54. Woolley I, Wood E, Sramkoski R, Zimmerman P, Miller J, Kazura J. Expression of Duffy antigen receptor for chemokines during reticulocyte maturation: using a CD71 flow cytometric technique to identify reticulocytes. *Immunohematology*. 2005;21(1):15-20.
55. Culleton R, Coban C, Zeyrek FY, Cravo P, Kaneko A, Randrianariveolosia M, et al. The origins of African Plasmodium vivax; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e29137. PubMed PMID: 22195007. Pubmed Central PMCID: 3237592.
56. Woldearegai TG, Kremsner PG, Kun JF, Mordmüller B. Plasmodium vivax malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;107(5):328-31.

ANEXOS

ANEXO 1

Equipe do projeto

Integrantes do projeto	Instituição e formação acadêmica	Função no projeto
Rechfy Kasem Abou Ali	Biomédica-HEMOAM	Pesquisadora
Sergio Albuquerque, Dr.	Farmacêutico-HEMOAM	Orientador
Lucianna Tezza, Msc	Farmacêutica-HEMOAM	Colaborador
Edalton Sanguino, Msc	Biólogo-HEMOAM	Colaborador
Katiane Gomes, Msc	Farmacêutica-HEMOAM	Colaborador
Naiane Cavalcante	Biomédica-HEMOAM	Colaborador
Alexandre Terço	Graduando Farmacia-HEMOAM	Colaborador
Diana Mota	Graduanda Biomedicina-HEMOAM	Colaborador
Ágda Aidem	Graduanda Biomedicina-HEMOAM	Colaborador
Celiane Batista	Graduanda Biomedicina-HEMOAM	Colaborador
Màrcia Kamila	Graduanda Biomedicina-HEMOAM	Colaborador
Monique Negreiros	Graduanda Biomedicina-HEMOAM	Colaborador
Edson Lira	Estatístico - HEMOAM	Colaborador
Luiz Schwade	Estatístico - HEMOAM	Colaborador
Marcus Lacerda, Dr.	Médico infectologista-, FMT-HVD/Fiocruz	Colaborador
Wuelton Monteiro, Dr.	Farmacêutico-Bioquímico, FMT-HVD/UEA	Colaborador
Gisely Melo, Dra.	Farmacêutica-Bioquímica, FMT-HVD/UEA	Colaborador
André Siqueira, Dr.	Médico Infectologista, FMT-HVD/Fiocruz	Colaborador
Belisa Magalhães, Dra.	Enfermeira, FMT-HVD/UEA	Colaborador
Aline Alencar	Aluna de mestrado, médica, FMT-HVD/UEA	Colaborador
Siuhelem Rocha	Aluna de mestrado, biomédica, FMT-HVD/UEA	Colaborador

ANEXO 2

PROTÓCOLO 1- Extração de DNA genômico (Brazol™ LAC Biotecnológica)

Fase 1 – extração do DNA

- 1- Pipetar 200µL da amostra de sangue em um microtubo de 2,0 mL, devidamente identificados. Se possível pipetar somente o creme leucocitário (*buffy coat*);
- 2- Adicionar 400µL de Brazol gelado (4°C) e agitar no vortex até a mostra adquirir um aspecto homogêneo;
- 3- Adicionar 100µL de clorofórmio gelado (4°C) e misturar no vortex até a amostra adquirir uma coloração marrom;
- 4- Centrifugar a amostra 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 5- Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução está dividida em duas fases;
- 6- Pipetar cuidadosamente o sobrenadante e transferir para tubos para tubos de 1,5 mL devidamente identificados;

Fase 2 – precipitação do DNA genômico

- 1- Adicionar 500µL de etanol a 100% gelado (4°C), homogeneizar no vortex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 e 60 segundos;
- 2- Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 3- Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 500µL de etanol a 100% gelado (4°C);
- 4- Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 5- Decantar o sobrenadante;
- 6- Remover o etanol residual com pipeta e colocar no banho seco a 56°C por 10 minutos;
- 7- Adicionar 200µL de água destilada estéril em cada tubo (H₂Odd);
- 8- Quantificar o DNA genômico utilizando o equipamento NanoDrop 1000;
- 9- Armazenar o DNA purificado a 4°C ou a -20°C.

PROTÓCOLO 2- Genotipagem Duffy-PCR- BeadChip® KIT HEA

NOTAS:

1. Os controles positivo e negativo (H₂O livre de nuclease) devem ser incluídos em cada conjunto de testes.
2. Podem ser utilizadas pipetas multicanais ou monocanal, de acordo com a preferência do laboratório. Todas as pipetas utilizadas devem ser calibradas.
3. Misturar corretamente as amostras e os reagentes. Evite fazer espuma ou bolhas.

4. Retirar as quantidades necessárias de reagentes, amostras e controles. Se estiverem congelados, descongelar antes da sua utilização.
5. Retirar as lâminas do BeadChip da geladeira e deixar em temperatura ambiente durante 15 minutos antes de utilizar.
6. É extremamente importante evitar a contaminação cruzada entre os vários poços BeadChip. Tenha cuidado quando pipetar, lavar ou remover fluidos.
7. É necessária uma pipetagem precisa das amostras e dos reagentes para obter resultados precisos.
8. O BioArray Solutions AIS 400 Array Imaging System e o forno de hibridização (Boekel Inslide-Out, modelo 241000) devem ser ligados no mínimo 30 minutos antes do funcionamento e ajustado à temperatura para **53°C**. Coloque 2 toalhas de papel no tabuleiro do forno de hibridização e umedeça-as com 25mL de água destilada e deionizada (H Odd) para manter as condições de umidade durante a incubação. Se o forno de hibridização foi utilizado anteriormente durante o dia, substitua as toalhas de papel por 2 novas e umedeça-as novamente com a mesma quantidade da água deionizada.

DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

Preparo dos reagentes:

1. Determinar o número de amostras e controles que devem ser testados.
2. Verificar o nome dos reagentes, lotes, validade e fabricante.
3. Comparar o lote do kit de reagentes com o lote das lâminas a serem utilizadas (Os lotes devem ser os mesmos).
4. Os reagentes devem permanecer resfriados (gelo) por um período de 5 a 10 minutos antes de serem utilizados (exceto a *Clean Up* que deve ser mantido no freezer até a hora do uso).
5. Depois de descongelados, todos os reagentes devem ser agitados (vortex e spin) e armazenar imediatamente o restante do reagente que não foi utilizado.

Nota: Recomendam-se áreas laboratoriais distintas para os procedimentos pré-PCR e pós-PCR, para prevenir contaminação. Os passos descritos abaixo devem ser realizados na área do laboratório pré-PCR e sempre devem ser utilizadas ponteiras com filtro.

6. Consultar a tabela abaixo para preparar os reagentes. A tabela é uma diretriz, com acréscimo de 10% do volume necessário para a realização dos ensaios (o volume para 1 amostra é exato sem reagente em excesso).
7. Preparar o PCR Master Mix de acordo com a tabela abaixo e manter em gelo (rack térmica) até o momento de ser utilizado. Quando calcular o número de testes, lembre-se de incluir os controles.

Reagentes / Amostras		1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
HEA eMAP PCR Mix μ l	Adicionar em um Flaconete	16	144	296	448	592	736	880	1008	1168	1296	1456	1584	1744
HotStar Taq DNA polymerase (μ l)		1	9	18.5	28	37	46	55	63	73	81	91	99	109

8. De acordo com a tabela abaixo, aliquotar o PCR Master Mix numa tira de 8 tubos.

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (μ l) por tubo na tira	Ir para etapa 9	38	56	76	92	112	128	148	164	188	200	224

NOTA: Se aplicável utilizar cubeta alternativa para a pipetagem com a pipeta multicanal.

NOTA: Remover todas as bolhas de ar existentes no fundo da tira antes de pipetar os reagentes. Este passo é muito crítico.

9. Dispensar μ L do PCR Master Mix em cada microtubo apropriadamente identificado. Sempre utilizar ponteiros com filtros.

10. Selar os microtubos e transferir para área específica para a adição do DNA, fora da área pré-PCR.

11. Pipetar μ L de DNA em cada microtubo de PCR e homogeneizar 3 vezes com a pipeta ou utilizar vórtex

12. Para o controle negativo dispensar μ L de H Odd (*nuclease free*) no microtubo apropriado e homogeneizar 3 vezes com a pipeta utilizando sempre ponteira com filtro.

13. Selar cuidadosamente os microtubos, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).

14. Colocar os microtubos no termociclador e selecionar o protocolo do PCR desejado.

Por exemplo: Modelo Applied Biosystems – Modelo Veriti

94°C - 15 min

94°C - 30 seg, rampa de 60%

60°C - 30 seg, rampa 50%

68°C - 50 seg, rampa 35%

68°C - 8 min

} 30 ciclos

4°C até a retirada das amostras. As amostras não devem ficar no equipamento por mais de 24 horas.

Após o término da reação, retirar os produtos de PCR do termociclador e centrifugar.

NOTA: Devido à diferença entre os termocicladores, cada instrumento deve obrigatoriamente ser validado com amostras conhecidas para avaliar o seu desempenho.

As amostras centrifugadas e os controles devem ser usados imediatamente, mas podem ser armazenados a temperatura $\leq - 0^{\circ}\text{C}$ durante 4 semanas.

PROCESSAMENTO PÓS-PCR (Tratamento Amplicons)

1. Agitar os produtos de PCR vigorosamente e centrifugar (vortex e spin – segurar o botão de spin até a velocidade máxima da centrifuga e soltar).
2. Preparar e identificar uma nova tira
3. Transferir , μL de cada produto de PCR para a nova tira. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.
4. Aliquotar o Reagente *Clean Up* para a realização dos testes numa tira de 8 ou 16 tubos. Utilizar pipeta monocal, e adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Clean Up Stock solução de trabalho μL	Flaconetes	2	18	36

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo:

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (μL) do Reagente <i>Clean up</i> por tubo na tira	Ir para a etapa 5	6	9	12	14	16	18	20	22	24	26	28

5. Adicionar μL de reagente *Clean Up* a cada poço e homogeneizar 3 vezes com pipeta. Descartar o reagente que não foi utilizado. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.

Nota: Realizar o procedimento cuidadosamente para garantir resultados corretos quando for pipetar volumes pequenos.

Armazenar o reagente *Clean Up* que não foi utilizado e manter os demais reagentes em gelo.

6. Selar cuidadosamente o microtubo, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).

7. Colocar o microtubo no termociclador e executar o seguinte protocolo:

37 °C 25 min.

80°C 15 min.

4 °C até à remoção das tiras. O tempo não deve ultrapassar a 3 horas

NOTA: As amostras centrifugadas e os controles devem ser usados imediatamente, mas podem ser armazenados a temperatura $\leq - 0^{\circ}\text{C}$ até 24 horas no freezer “**no frost free**”

PROCESSAMENTO PÓS-PCR - OBTENÇÃO DA FITA SIMPLES (LAMBDA EXONUCLEASE)

1. Homogeneizar (vortex) e centrifugar (spin) os microtubos contendo os produtos de PCR limpos.
2. Aliquotar o reagente Lambda Exonuclease para realização dos testes numa tira de 8 ou 16 microtubos. Se for utilizar pipeta monocal, adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Volume (ul) Lambda Exonuclease	Flaconetes	2	18	36

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo
 Armazenar o reagente Lambda Exonuclease não utilizado e manter os reagentes em gelo.

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (µl) do Reagente Lambda Exonuclease por tubo na tira	Ir para a etapa 3	6	9	12	14	16	18	20	22	24	26	28

3. Adicionar a cada microtubo μL da solução de Lambda Exonuclease e homogeneizar 3 vezes com uma pipeta
4. Selar cuidadosamente o microtubo, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).
5. Colocar o microtubo no termociclador e executar o seguinte protocolo:

37 °C 25 min.

80°C 15 min.

4°C até a remoção das tiras. O tempo não deve ultrapassar a 3 horas

NOTA: As amostras centrifugadas e os controles devem ser usados imediatamente, mas podem ser armazenados a temperatura $\leq - 0^{\circ}\text{C}$ até 16 horas no freezer “**no frost free**”

6. Ligar e preparar a incubadora Boekel Scientific (colocar papel toalha umedecido com H₂O) e deixar atingir a temperatura de 53°C.

7. Ligar o sistema de captura de imagem (X-Cite e o Opti Scan II) e abrir o programa AISR3.0VI.
8. Identificar as lâminas contendo os BeadChips e deixá-las à TA por 15 minutos.
9. Transferir os dados do CD para o computador (Esta etapa deve ser realizada na abertura de cada kit).

HIBRIDIZAÇÃO DO DNA ALVO NO BeadChip™

NOTA: Os passos 4 ao 11 não podem ser interrompidas em hipótese alguma.

1. Verificar se o forno de hibridização está na temperatura de 53°C.
2. Assegurar que as lâminas do BeadChip estão em temperatura ambiente.
3. Agitar os produtos de PCR vigorosamente e centrifugar (vortex e spin).
4. Aliquotar o reagente Elongação eMAP® para realização dos testes numa tira de 8 ou 16 microtubos. Ter cuidado para evitar a formação de espuma. Se for utilizar pipeta monocal, adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Volume (ul) eMAP elongase	Flaconetes	10	90	180

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
eMAP Elongase (ul)* Volume (ul) por tubo na tira	Ir para etapa 5	25	36	47	59	70	80	90	100	114	125	135

NOTA: Retirar todas as bolhas de ar no fundo da tira antes de prosseguir com a pipetagem dos reagentes.

5. Adicionar µL do reagente eMAP® em cada amostra e homogeneizar 3 vezes com a pipeta. Utilizar somente **ponteiras com filtro**. Descartar o reagente que não foi utilizado.
6. Transferir µL do Mix para o HEA BeadChip correspondente. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.
7. Colocar as lâminas BeadChip™ no forno de hibridização e incubar durante minutos a **53°C**.
8. Retirar as lâminas do forno e lavar com H Odd mantendo a lâmina na vertical segurando nas laterais.

9. Enxaguar cada BeadChip individualmente com H₂O sob um fluxo de pressão constante. O fluxo de água deve ser perpendicular à face da lâmina e a aproximadamente 2,5 cm de distância. Enxaguar cada BeadChip durante aproximadamente 3 segundos
10. Remover o excesso da água da lâmina utilizando ar comprimido. Não agitar a embalagem de ar comprimido. Remover o excesso de água da parte traseira da lâmina com papel toalha.
11. Ler as lâminas BeadChip utilizando o BioArray Solutions AIS400 Array Imaging System. Processar as imagens utilizando o software HEA Analysis no BioArray Solutions Information System (BASIS).

PROTOCOLO 3 - Genotipagem Duffy-PCR-RFLP

Reagentes Utilizados

Primers

Sintetizados pela INVITROGEN life technologies.

Solução estoque (1ng/ μ L)

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 μ L da solução de estoque 10 vezes em água injetável.

Exemplo: 5 μ L de primer + 45 μ L 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 μ L
Reagentes	Quantidades
Água injetável	33,7 μ L (qsp 50 uL)
Buffer	5 μ L (sempre 10% do volume final)
Cloreto de Magnésio	3 μ L
Primer 1 (forward)	1 μ L
Primer 2 (Reverse)	1 μ L
DNTP	0,8 μ L
Taq polimerase	0,5 μ L
DNA extraído	5 uL (Depende da qualidade da extração)

Realizaremos 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 µL
Reagentes	Quantidade
Água injetável	5,5 µL (qsp 20 µL)
Buffer	2,0 µL
Enzima de restrição BanI	0,5 µL
DNA amplificado (DUFFY)	12 µL

Observação:

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

Leitura das bandas em gel de agarose 2%

PROTOCOLO 4. Reação de RFLP para verificação da mutação GATA:

Enzima de restrição StyI

Marca: Fermentas

Volume final	20 µL
Reagentes	Quantidade
Água injetável.	5,5 µL (qsp 20 uL)

Buffer	2,0 µL
Enzima de restrição StyI	0,5 µL
DNA amplificado (GATA)	12 µL

Observação:

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

Leitura das bandas em gel de Poliacrilamida.

PROTOCOLO 5. Preparo do gel de Agarose 1.5%

1. Em um Erlenmeyer pesar 1,5 g de Agarose
2. Completar com TEB 1x para 100 mL ,
3. Tampar o Erlenmeyer com plástico (Tipo Magi pac) fazendo um furo no mesmo.
4. Aquecer o Erlenmeyer no forno microondas até ferver e ficar transparente.
5. Acrescentar o Brometo de Etídio no Erlenmeyer (cerca de 0,7 µL para 100 mL).
6. Prepara o suporte de polimerização colocando o pente com a quantidade desejada de poços.
7. Esperar esfriar o Erlenmeyer 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 μ L de branco e DNA, homogeneizar com a gota de azul de bromofenol e dispensar no poço do gel. Deve-se aplicar também 4 μ L de Ladder porém este já vem corado
4. Sempre aplicar da seguinte forma: Ladder, branco, DNA's.
5. Correr o gel.

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.

PROTOCOLO 6. 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 de amônia (APS)

9mL de Água Destilada

4.Temed

Gel de Poliacrilamida à 12%

Produto	Quantidade
Acrilamida 40%.	12,8mL /2 = 6,4 mL
TEB 10X4,0mL /2 = 2,0 mL
Água Destilada	24,8 mL /2 = 12,4 mL
Persulfato de Amônia (APS) 10%	400 µL /2 = 200 µL
TEMED	16 µL = 32 µL

Preparo da Base para receber o Gel

1. Preparar os suportes com as placas de vidro.
2. Prender os suportes nas bases.
3. Prepara 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 elimina-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 µL + azul
4. Digestão: 10 µ+ 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 5 μ L ou 10 μ L de brometo de etídio e aguardar 5 minutos.
5. Fotografar o gel no sistema de documentação

ANEXO 3

Tabela de resultados dos Pacientes infectados com *Plasmodium vivax*

Id	FYA/FYB	GATA (FY* ^{ES})	FY-265 (FYB ^W)	Densidades Parasitaria (parasitos/mm ³)	NÍVEIS DP
1	BB	MUTADO	MUTADO	78,0	Baixa DP
2	AA	NORMAL	NORMAL	80,0	Baixa DP
3	BB	NORMAL	NORMAL	86,8	Baixa DP
4	AB	MUTADO	NORMAL	93,6	Baixa DP
5	AB	NORMAL	NORMAL	105,8	Baixa DP
6	AA	NORMAL	NORMAL	116,8	Baixa DP
7	AA	NORMAL	NORMAL	118,4	Baixa DP
8	AA	NORMAL	NORMAL	120,0	Baixa DP
9	AA	NORMAL	NORMAL	138,0	Baixa DP
10	BB	NORMAL	NORMAL	144,0	Baixa DP
11	AB	NORMAL	NORMAL	166,4	Baixa DP
12	AB	NORMAL	NORMAL	172,8	Baixa DP
13	AB	MUTADO	NORMAL	175,2	Baixa DP
14	AA	NORMAL	NORMAL	176,4	Baixa DP
15	BB	NORMAL	NORMAL	178,2	Baixa DP
16	AB	NORMAL	NORMAL	182,4	Baixa DP
17	AB	NORMAL	NORMAL	197,6	Baixa DP
18	AB	MUTADO	NORMAL	217,6	Baixa DP
19	AA	NORMAL	NORMAL	222,6	Baixa DP
20	AB	NORMAL	NORMAL	244,0	Baixa DP
21	BB	NORMAL	MUTADO	255,2	Baixa DP
22	BB	NORMAL	NORMAL	260,0	Baixa DP
23	BB	NORMAL	NORMAL	264,0	Baixa DP
24	BB	NORMAL	NORMAL	271,4	Baixa DP
25	BB	NORMAL	NORMAL	272,0	Baixa DP
26	AA	NORMAL	NORMAL	282,0	Baixa DP
27	AB	MUTADO	NORMAL	297,0	Baixa DP
28	AB	NORMAL	NORMAL	298,8	Baixa DP
29	AB	NORMAL	NORMAL	323,0	Baixa DP
30	AB	MUTADO	NORMAL	324,0	Baixa DP
31	AB	NORMAL	NORMAL	336,0	Baixa DP
32	AB	NORMAL	NORMAL	343,0	Baixa DP
33	AA	NORMAL	NORMAL	345,6	Baixa DP
34	AB	NORMAL	NORMAL	360,0	Baixa DP
35	BB	NORMAL	NORMAL	360,0	Baixa DP
36	BB	NORMAL	NORMAL	364,8	Baixa DP
37	AA	NORMAL	NORMAL	378,2	Baixa DP
38	AA	NORMAL	NORMAL	381,6	Baixa DP

39	AA	NORMAL	NORMAL	385,0	Baixa DP
40	AB	NORMAL	NORMAL	385,0	Baixa DP
41	AA	NORMAL	NORMAL	408,0	Baixa DP
42	AB	NORMAL	NORMAL	420,0	Baixa DP
43	AB	NORMAL	NORMAL	434,0	Baixa DP
44	AB	NORMAL	NORMAL	444,0	Baixa DP
45	BB	MUTADO	NORMAL	447,2	Baixa DP
46	AB	NORMAL	NORMAL	448,8	Baixa DP
47	BB	NORMAL	NORMAL	456,0	Baixa DP
48	BB	NORMAL	NORMAL	457,6	Baixa DP
49	AA	NORMAL	NORMAL	491,9	Baixa DP
50	AB	NORMAL	NORMAL	506,0	Baixa DP
51	AB	NORMAL	MUTADO	513,0	Baixa DP
52	AA	NORMAL	NORMAL	530,4	Baixa DP
53	AA	NORMAL	NORMAL	532,8	Baixa DP
54	AB	NORMAL	NORMAL	540,0	Baixa DP
55	AA	NORMAL	NORMAL	564,3	Baixa DP
56	BB	NORMAL	NORMAL	570,0	Baixa DP
57	BB	NORMAL	NORMAL	574,0	Baixa DP
58	AB	NORMAL	NORMAL	582,4	Baixa DP
59	AB	NORMAL	NORMAL	594,0	Baixa DP
60	AB	NORMAL	NORMAL	607,2	Baixa DP
61	AA	NORMAL	NORMAL	617,8	Baixa DP
62	AB	NORMAL	NORMAL	646,8	Baixa DP
63	AB	NORMAL	NORMAL	649,6	Baixa DP
64	AB	NORMAL	NORMAL	649,6	Baixa DP
65	AB	NORMAL	NORMAL	667,0	Baixa DP
66	BB	NORMAL	NORMAL	667,8	Baixa DP
67	BB	NORMAL	NORMAL	676,8	Baixa DP
68	BB	NORMAL	NORMAL	680,8	Baixa DP
69	AB	NORMAL	NORMAL	686,0	Baixa DP
70	AB	NORMAL	NORMAL	693,0	Baixa DP
71	BB	NORMAL	NORMAL	702,0	Baixa DP
72	BB	NORMAL	NORMAL	737,2	Baixa DP
73	BB	NORMAL	NORMAL	760,0	Baixa DP
74	AA	NORMAL	NORMAL	766,8	Baixa DP
75	BB	NORMAL	NORMAL	770,0	Baixa DP
76	AA	NORMAL	NORMAL	795,6	Baixa DP
77	BB	NORMAL	NORMAL	811,2	Baixa DP
78	AB	NORMAL	NORMAL	827,2	Baixa DP
79	AB	NORMAL	NORMAL	827,3	Baixa DP
80	AB	NORMAL	NORMAL	832,0	Baixa DP
81	AB	NORMAL	NORMAL	832,0	Baixa DP
82	AB	NORMAL	NORMAL	832,0	Baixa DP
83	BB	NORMAL	NORMAL	840,0	Baixa DP
84	AB	NORMAL	NORMAL	852,8	Baixa DP

85	BB	NORMAL	NORMAL	857,9	Baixa DP
86	BB	NORMAL	NORMAL	871,0	Baixa DP
87	BB	NORMAL	NORMAL	918,4	Baixa DP
88	BB	NORMAL	NORMAL	919,1	Baixa DP
89	AB	NORMAL	NORMAL	924,0	Baixa DP
90	AB	NORMAL	NORMAL	950,4	Baixa DP
91	AA	NORMAL	NORMAL	962,0	Baixa DP
92	AA	NORMAL	NORMAL	967,2	Baixa DP
93	BB	NORMAL	NORMAL	975,0	Baixa DP
94	AB	NORMAL	NORMAL	978,2	Baixa DP
95	AA	NORMAL	NORMAL	997,6	Baixa DP
96	AA	NORMAL	NORMAL	1.000,0	Baixa DP
97	AB	NORMAL	NORMAL	1.003,0	Baixa DP
98	BB	NORMAL	NORMAL	1.009,2	Baixa DP
99	BB	NORMAL	NORMAL	1.013,8	Baixa DP
100	AB	NORMAL	NORMAL	1.024,0	Baixa DP
101	AB	NORMAL	NORMAL	1.026,0	Baixa DP
102	AA	NORMAL	NORMAL	1.071,6	Baixa DP
103	AB	MUTADO	NORMAL	1.104,0	Baixa DP
104	AA	NORMAL	NORMAL	1.107,0	Baixa DP
105	AB	MUTADO	NORMAL	1.113,0	Baixa DP
106	AB	NORMAL	NORMAL	1.116,0	Baixa DP
107	AB	MUTADO	NORMAL	1.122,0	Baixa DP
108	AA	NORMAL	NORMAL	1.123,2	Baixa DP
109	AB	NORMAL	NORMAL	1.126,4	Baixa DP
110	AA	NORMAL	NORMAL	1.136,8	Baixa DP
111	BB	MUTADO	NORMAL	1.165,6	Baixa DP
112	BB	NORMAL	NORMAL	1.176,0	Baixa DP
113	AB	MUTADO	NORMAL	1.178,0	Baixa DP
114	AB	NORMAL	NORMAL	1.195,6	Baixa DP
115	AB	MUTADO	NORMAL	1.214,4	Baixa DP
116	AB	NORMAL	NORMAL	1.239,0	Baixa DP
117	BB	NORMAL	NORMAL	1.240,8	Baixa DP
118	BB	NORMAL	NORMAL	1.279,2	Baixa DP
119	AB	MUTADO	NORMAL	1.302,0	Baixa DP
120	BB	NORMAL	NORMAL	1.344,7	Baixa DP
121	AB	NORMAL	NORMAL	1.356,8	Baixa DP
122	AB	NORMAL	NORMAL	1.377,6	Baixa DP
123	AB	NORMAL	NORMAL	1.380,0	Baixa DP
124	AB	NORMAL	NORMAL	1.386,0	Baixa DP
125	AB	NORMAL	NORMAL	1.411,2	Baixa DP
126	AB	MUTADO	NORMAL	1.424,0	Baixa DP
127	AA	NORMAL	NORMAL	1.425,6	Baixa DP
128	AB	NORMAL	NORMAL	1.452,0	Baixa DP
129	BB	NORMAL	NORMAL	1.465,0	Baixa DP
130	BB	MUTADO	NORMAL	1.472,0	Baixa DP

131	BB	NORMAL	NORMAL	1.472,0	Baixa DP
132	AB	NORMAL	NORMAL	1.497,6	Baixa DP
133	AB	NORMAL	NORMAL	1.520,0	Baixa DP
134	BB	NORMAL	NORMAL	1.576,8	Baixa DP
135	AA	NORMAL	NORMAL	1.584,0	Baixa DP
136	BB	NORMAL	NORMAL	1.584,0	Baixa DP
137	AA	NORMAL	NORMAL	1.587,3	Baixa DP
138	AB	NORMAL	NORMAL	1.590,8	Baixa DP
139	AA	NORMAL	NORMAL	1.604,8	Baixa DP
140	AB	MUTADO	NORMAL	1.612,0	Baixa DP
141	BB	MUTADO	NORMAL	1.619,2	Baixa DP
142	AB	MUTADO	NORMAL	1.656,0	Baixa DP
143	BB	NORMAL	NORMAL	1.692,8	Baixa DP
144	AB	NORMAL	NORMAL	1.731,6	Baixa DP
145	BB	NORMAL	NORMAL	1.748,0	Baixa DP
146	AB	NORMAL	NORMAL	1.748,4	Baixa DP
147	AB	MUTADO	NORMAL	1.760,0	Baixa DP
148	AB	NORMAL	NORMAL	1.764,0	Baixa DP
149	AA	NORMAL	NORMAL	1.774,8	Baixa DP
150	AB	NORMAL	NORMAL	1.850,0	Baixa DP
151	BB	MUTADO	NORMAL	1.892,0	Baixa DP
152	BB	NORMAL	NORMAL	1.900,8	Baixa DP
153	BB	NORMAL	NORMAL	1.932,0	Baixa DP
154	AB	MUTADO	NORMAL	1.974,7	Baixa DP
155	AB	NORMAL	NORMAL	1.989,0	Baixa DP
156	BB	NORMAL	NORMAL	1.995,2	Baixa DP
157	AA	NORMAL	NORMAL	2.006,0	Baixa DP
158	AB	NORMAL	NORMAL	2.010,0	Baixa DP
159	AB	MUTADO	NORMAL	2.012,8	Baixa DP
160	AB	NORMAL	NORMAL	2.016,0	Baixa DP
161	AB	NORMAL	NORMAL	2.021,0	Baixa DP
162	BB	NORMAL	NORMAL	2.040,0	Baixa DP
163	AA	NORMAL	NORMAL	2.058,0	Baixa DP
164	AB	NORMAL	NORMAL	2.080,0	Baixa DP
165	AB	NORMAL	NORMAL	2.105,6	Baixa DP
166	BB	NORMAL	NORMAL	2.128,5	Baixa DP
167	AB	NORMAL	NORMAL	2.156,6	Baixa DP
168	AB	NORMAL	NORMAL	2.176,0	Baixa DP
169	AA	NORMAL	NORMAL	2.184,0	Baixa DP
170	AB	NORMAL	NORMAL	2.290,7	Baixa DP
171	BB	NORMAL	NORMAL	2.304,0	Baixa DP
172	AB	NORMAL	NORMAL	2.310,0	Baixa DP
173	AB	NORMAL	NORMAL	2.322,0	Baixa DP
174	AB	NORMAL	NORMAL	2.340,0	Baixa DP
175	AA	NORMAL	NORMAL	2.358,0	Baixa DP
176	AB	MUTADO	NORMAL	2.386,8	Baixa DP

177	AB	NORMAL	NORMAL	2.419,0	Baixa DP
178	AB	NORMAL	NORMAL	2.429,2	Baixa DP
179	AB	NORMAL	NORMAL	2.441,2	Baixa DP
180	AB	NORMAL	NORMAL	2.520,0	Baixa DP
181	AB	NORMAL	NORMAL	2.525,2	Baixa DP
182	AB	NORMAL	NORMAL	2.534,4	Baixa DP
183	AA	NORMAL	NORMAL	2.582,1	Baixa DP
184	AB	NORMAL	NORMAL	2.600,0	Baixa DP
185	AB	NORMAL	NORMAL	2.620,8	Baixa DP
186	AB	NORMAL	NORMAL	2.624,0	Baixa DP
187	AB	NORMAL	NORMAL	2.688,0	Baixa DP
188	AA	NORMAL	NORMAL	2.812,0	Baixa DP
189	AB	MUTADO	NORMAL	2.814,0	Baixa DP
190	AB	NORMAL	NORMAL	2.841,6	Baixa DP
191	AB	NORMAL	NORMAL	2.849,2	Baixa DP
192	AA	NORMAL	NORMAL	2.851,2	Baixa DP
193	BB	NORMAL	NORMAL	2.854,4	Baixa DP
194	AB	NORMAL	NORMAL	2.862,0	Baixa DP
195	AB	NORMAL	NORMAL	2.891,0	Baixa DP
196	AB	NORMAL	NORMAL	2.894,1	Baixa DP
197	BB	MUTADO	NORMAL	3.016,0	Baixa DP
198	AA	NORMAL	NORMAL	3.016,0	Baixa DP
199	AB	NORMAL	NORMAL	3.080,4	Baixa DP
200	AB	NORMAL	NORMAL	3.095,2	Baixa DP
201	AB	NORMAL	NORMAL	3.115,2	Baixa DP
202	AA	NORMAL	NORMAL	3.116,0	Baixa DP
203	AB	NORMAL	NORMAL	3.132,3	Baixa DP
204	AA	NORMAL	NORMAL	3.168,0	Baixa DP
205	AB	NORMAL	NORMAL	3.225,0	Baixa DP
206	AA	NORMAL	NORMAL	3.240,0	Baixa DP
207	AB	NORMAL	NORMAL	3.240,0	Baixa DP
208	AA	NORMAL	NORMAL	3.283,1	Baixa DP
209	AB	NORMAL	NORMAL	3.296,4	Baixa DP
210	AB	NORMAL	NORMAL	3.311,0	Baixa DP
211	AA	NORMAL	NORMAL	3.332,0	Baixa DP
212	AA	NORMAL	NORMAL	3.372,8	Baixa DP
213	BB	NORMAL	NORMAL	3.418,8	Baixa DP
214	AB	NORMAL	NORMAL	3.428,6	Baixa DP
215	AA	NORMAL	NORMAL	3.507,8	Baixa DP
216	AB	MUTADO	NORMAL	3.546,4	Baixa DP
217	BB	NORMAL	NORMAL	3.590,4	Baixa DP
218	BB	MUTADO	NORMAL	3.631,2	Baixa DP
219	AB	NORMAL	NORMAL	3.663,0	Baixa DP
220	BB	NORMAL	NORMAL	3.763,0	Baixa DP
221	AB	NORMAL	NORMAL	3.832,6	Baixa DP
222	AB	MUTADO	NORMAL	3.840,0	Baixa DP

223	AA	NORMAL	NORMAL	3.857,0	Baixa DP
224	AB	NORMAL	NORMAL	3.887,4	Baixa DP
225	AA	NORMAL	NORMAL	3.999,0	Baixa DP
226	BB	NORMAL	NORMAL	4.175,6	Baixa DP
227	BB	NORMAL	NORMAL	4.218,0	Baixa DP
228	AB	NORMAL	NORMAL	4.231,6	Baixa DP
229	AA	NORMAL	NORMAL	4.233,0	Baixa DP
230	AA	NORMAL	NORMAL	4.290,0	Baixa DP
231	AB	NORMAL	NORMAL	4.326,4	Baixa DP
232	AB	NORMAL	NORMAL	4.358,8	Baixa DP
233	AA	NORMAL	NORMAL	4.387,0	Baixa DP
234	BB	NORMAL	NORMAL	4.423,3	Baixa DP
235	AB	NORMAL	NORMAL	4.500,8	Baixa DP
236	AA	NORMAL	NORMAL	4.588,0	Baixa DP
237	AB	NORMAL	NORMAL	4.624,0	Baixa DP
238	AA	NORMAL	NORMAL	4.655,0	Baixa DP
239	AB	NORMAL	NORMAL	4.674,0	Baixa DP
240	AA	NORMAL	NORMAL	4.771,2	Baixa DP
241	AA	NORMAL	NORMAL	5.059,2	Baixa DP
242	AB	MUTADO	NORMAL	5.109,3	Baixa DP
243	AB	NORMAL	NORMAL	5.123,0	Baixa DP
244	AB	NORMAL	NORMAL	5.144,6	Baixa DP
245	AA	NORMAL	NORMAL	5.236,0	Baixa DP
246	AA	NORMAL	NORMAL	5.406,4	Baixa DP
247	AB	NORMAL	NORMAL	5.611,2	Baixa DP
248	AA	NORMAL	NORMAL	5.628,0	Baixa DP
249	AB	NORMAL	NORMAL	5.670,0	Baixa DP
250	AB	NORMAL	NORMAL	5.760,0	Baixa DP
251	AB	NORMAL	NORMAL	5.776,0	Baixa DP
252	AB	NORMAL	NORMAL	5.859,0	Baixa DP
253	AB	MUTADO	NORMAL	5.904,0	Baixa DP
254	AB	NORMAL	NORMAL	5.986,0	Baixa DP
255	BB	NORMAL	NORMAL	6.115,2	Baixa DP
256	AB	NORMAL	NORMAL	6.154,8	Baixa DP
257	BB	MUTADO	NORMAL	6.260,5	Baixa DP
258	AB	NORMAL	NORMAL	6.333,6	Baixa DP
259	AA	NORMAL	NORMAL	6.436,3	Baixa DP
260	AA	NORMAL	NORMAL	6.475,2	Baixa DP
261	AA	NORMAL	NORMAL	6.588,8	Baixa DP
262	AB	NORMAL	NORMAL	6.596,1	Baixa DP
263	AB	NORMAL	NORMAL	6.600,2	Baixa DP
264	AB	NORMAL	NORMAL	6.674,0	Baixa DP
265	BB	NORMAL	NORMAL	6.901,0	Baixa DP
266	BB	NORMAL	NORMAL	7.519,0	Baixa DP
267	AB	NORMAL	NORMAL	7.760,0	Media DP
268	BB	NORMAL	NORMAL	8.037,2	Media DP

269	AA	NORMAL	NORMAL	8.201,6	Media DP
270	BB	NORMAL	NORMAL	9.942,4	Media DP
271	AA	NORMAL	NORMAL	10.040,0	Media DP
272	AB	NORMAL	NORMAL	10.261,4	Media DP
273	AA	NORMAL	NORMAL	10.275,2	Media DP
274	AB	NORMAL	NORMAL	10.791,6	Media DP
275	BB	NORMAL	NORMAL	10.890,0	Media DP
276	AB	NORMAL	NORMAL	11.056,1	Media DP
277	AB	NORMAL	NORMAL	11.090,6	Media DP
278	AB	NORMAL	NORMAL	11.496,8	Media DP
279	AB	NORMAL	NORMAL	11.609,7	Media DP
280	AB	NORMAL	NORMAL	11.805,6	Media DP
281	AA	NORMAL	NORMAL	12.693,8	Media DP
282	AB	NORMAL	NORMAL	13.632,2	Media DP
283	BB	NORMAL	NORMAL	16.246,0	Alta DP
284	BB	NORMAL	NORMAL	16.714,8	Alta DP
285	AB	NORMAL	NORMAL	20.618,2	Alta DP
286	AA	NORMAL	NORMAL	23.498,5	Alta DP
287	BB	NORMAL	NORMAL	23.896,5	Alta DP

Tabela de resultados dos indivíduos sem antecedente de malária

Id	FYA/FYB	GATA	FY-265
1	BB	AA	AA
2	AA	AA	AA
3	AB	AB	AA
4	AB	AB	AA
5	BB	AA	AA
6	BB	AA	AA
7	AA	AA	AA
9	BB	BB	AA
10	AA	AA	AA
11	AB	AA	AA
12	AB	AB	AA
13	AA	AA	AA
14	AB	AA	AA
15	AA	AA	AA
17	AB	AA	AA
18	AB	AA	AA
19	BB	AA	AA
20	AA	AA	AA
21	BB	AA	AA
22	AB	AB	AA
23	BB	AA	AA
24	BB	AA	AA
25	AB	AA	AA
26	AB	AB	AA
27	BB	AB	AA
28	AB	AA	AA
29	AA	AA	AA
30	BB	AB	AA
31	AA	AA	AA
33	AB	AA	AA
34	AB	AA	AA
35	BB	AA	AA
36	AB	AA	AA
37	AA	AA	AA
38	AB	AB	AA

39	AA	AA	AA
41	BB	AA	AA
42	BB	AB	AA
43	AA	AA	AA
44	AB	AA	AA
45	AB	AA	AA
46	AB	AA	AA
47	AB	AA	AA
49	BB	AB	AA
50	BB	AA	AA
51	AB	AA	AA
52	AB	AA	AA
53	AB	AA	AA
54	BB	AA	AB
55	AA	AA	AA
56	AA	AA	AA
57	AB	AB	AA
58	AB	AA	AA
59	BB	AB	AA
60	AB	AA	AA
61	AA	AA	AA
62	AB	AA	AA
63	BB	BB	AA
65	AA	AA	AA
66	AB	AA	AA
67	BB	AA	AA
68	AA	AA	AA
69	AA	AA	AA
70	AA	AA	AA
71	AB	AA	AA
73	AB	AA	AA
74	BB	AA	AA
75	AA	AA	AA
76	BB	BB	AA
77	BB	AA	AA
78	AA	AA	AA
79	BB	AA	AA
81	BB	AA	AA

82	BB	AB	AA
83	AB	AA	AA
84	AB	AA	AA
85	AA	AA	AA
86	AB	AA	AA
87	AB	AA	AA
89	BB	AB	AA
90	AA	AA	AA
91	BB	AB	AA
92	BB	BB	AA
93	AB	AA	AA
94	AA	AA	AA
95	AA	AA	AA
96	AB	AA	AA
97	BB	BB	AA
98	BB	BB	AA
99	AB	AA	AA
100	BB	BB	AA
101	AA	AA	AA
102	AB	AA	AA
103	AB	AA	AA
104	BB	AB	AA
105	AA	AA	AA
106	AA	AA	AA
107	BB	AB	AA
108	AB	AA	AA
109	BB	AA	AA
110	AB	AB	AA
112	AA	AA	AA
113	AB	AA	AA
114	AB	AB	AA
115	AA	AA	AA
116	AB	AA	AA
117	BB	AA	AA
118	BB	AB	AA
119	AB	AA	AA
120	AA	AA	AA
121	BB	AA	AA

122	BB	AA	AA
123	AB	AB	AA
124	BB	AA	AA
125	AA	AA	AA
126	BB	AA	AA
127	AB	AB	AA
129	AB	AA	AA
130	AB	AB	AA
131	BB	AA	AA
132	BB	AA	AA
135	BB	AB	AA
136	AB	AA	AA
137	BB	AA	AA
138	BB	AA	AA
139	AB	AA	AA
140	AB	AB	AA
141	AB	AA	AA
142	AB	AB	AA
143	AB	AA	AA
144	AB	AA	AA
145	AA	AA	AA
146	AB	AA	AB
147	AB	AA	AA
148	BB	AA	AA
149	BB	BB	AA
150	BB	BB	AA
151	BB	AA	AA
152	BB	AA	AA
153	BB	BB	AA
154	BB	AA	AA
155	AB	AA	AA
156	AB	AB	AA
157	AB	AB	AA
158	AB	AA	AA
160	BB	AA	AA
161	BB	AA	AA
162	BB	AA	AA
163	BB	AB	AA

164	BB	AB	AA
165	AB	AB	AA
166	BB	AA	AA
167	BB	AA	AA
168	BB	AA	AA
169	AB	AA	AA
170	AB	AA	AA
171	AB	AA	AA
172	AA	AA	AA
173	AB	AA	AB
174	AB	AA	AA
175	AB	AA	AA
176	AB	AA	AA
177	BB	AA	AA
178	BB	AB	AA
179	BB	AB	AA
180	AB	AA	AA
181	AB	AA	AA
182	AB	AB	AA
183	BB	AB	AA
184	AA	AA	AA
185	AB	AB	AA
186	AA	AA	AA
187	AA	AA	AA
188	AA	AA	AA
189	AB	AA	AA
190	BB	AA	AA
191	AA	AA	AA
192	BB	AB	AA
193	BB	AA	AA
194	AB	AA	AA
195	BB	AB	AA
196	AB	AB	AA
197	AB	AB	AA
198	AB	AA	AA
199	AA	AA	AA
200	AB	AB	AA
201	BB	AB	AA

202	AB	AA	AA
203	AB	AA	AA
204	BB	AA	AA
205	BB	BB	AA
206	BB	AB	AA
207	AB	AA	AA
208	AA	AA	AA
209	AA	AA	AA
210	BB	AA	AA
211	AB	AA	AA
212	AB	AB	AA
213	BB	AB	AA
214	AB	AB	AA
215	AB	AA	AA
216	AA	AA	AA
217	AB	AA	AA
218	AB	AA	AA
219	BB	AB	AA
220	AA	AA	AA
221	BB	AA	AA
222	AB	AA	AA
223	AB	AA	AA
224	AB	AB	AA
225	AA	AA	AA
226	BB	BB	AA
227	AB	AA	AA
228	AB	AA	AA
229	AA	AA	AA
230	BB	AA	AA
231	BB	AA	AA
232	BB	AA	AA
233	AA	AA	AA
234	BB	AA	AA
235	AB	AA	AA
236	AB	AA	AA
237	AA	AA	AA
238	AA	AA	AA
239	AB	AB	AA

240	AB	AA	AA
241	AB	AB	AA
242	AA	AA	AA
243	BB	AA	AA
244	AB	AB	AA
245	AA	AA	AA
246	BB	AA	AA
247	AB	AA	AA
248	AB	AB	AA
249	AB	AA	AA
250	AB	AB	AA
251	AA	AA	AA
252	AA	AA	AA
253	BB	BB	AA
254	AB	AA	AA
255	AA	AA	AA
256	AB	AB	AA
257	BB	AA	AA
258	AB	AA	AA
259	AB	AB	AA
260	BB	AA	AA
261	BB	AB	AA
262	AB	AA	AA
263	AB	AA	AA
264	BB	AA	AA
265	AB	AA	AA
266	AB	AA	AA
267	BB	AB	AA
268	AB	AA	AA
269	BB	AA	AB
270	AB	AB	AA
271	AB	AA	AA
272	AB	AA	AA
273	AB	AA	AA