



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

---

**Carlos Eugênio Cavasini**

**Caracterização fenotípica dos sistemas de  
grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy e  
genotipagem do grupo sanguíneo Duffy nos  
indivíduos de áreas endêmicas de malária no  
Brasil**

**São José do Rio Preto**  
**2007**

**CARLOS EUGÊNIO CAVASINI**

**“Caracterização fenotípica dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy e genotipagem do grupo Duffy nos indivíduos de áreas endêmicas de malária no Brasil”**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz D. Machado**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos**

**São José do Rio Preto**

**2007**

Cavasini, Carlos Eugênio

Caracterização fenotípica dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy e genotipagem do grupo Duffy nos indivíduos de áreas endêmicas de malária no Brasil./ Carlos Eugênio Cavasini

São José do Rio Preto, 2007.

118p

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

1. Plasmodium; 2. Malária; 3. Grupos sanguíneos ABO, MNS, Duffy;  
4. Fenótipos; 5. Genótipos; 6. Amazônia Brasileira

**CARLOS EUGÊNIO CAVASINI**

**“Caracterização fenotípica dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy e genotipagem do grupo Duffy nos indivíduos de áreas endêmicas de malária no Brasil”**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador:	Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
2º Examinador:	Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira
3º Examinador:	Profa. Dra. Marinete Marins Póvoa
4º Examinador:	Profa. Dra. Érika Christina Pavarino-Bertelli
5º Examinador:	Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza
Suplentes:	Profa. Dra. Ana Elisabete Silva
	Profa. Dra. Cláudia Regina Domingos Bonini

**São José do Rio Preto, 13 de agosto de 2007**

---

**SUMÁRIO**

Dedicatória .....	i
Agradecimentos .....	ii
Epígrafe .....	vii
Lista de figuras e tabelas .....	viii
Lista de abreviaturas e símbolos .....	ix
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
Introdução .....	1
1. Malária .....	1
2. Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i> .....	3
2.1 Processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos de plasmódios humanos .....	5
3. Aspectos da composição étnica brasileira .....	9
4. Sistemas de grupos sanguíneos .....	10
4.1 Sistema de grupo sanguíneo ABO .....	11
4.2 Sistema de grupo sanguíneo MNS .....	13
4.3 Sistema de grupo sanguíneo Duffy .....	16
4.3.1 Antígenos Duffy como receptores de quimiocinas .....	18
4.3.2 O gene Duffy ( <i>FY</i> ) .....	19
4.3.3 Antígenos Duffy .....	20
4.3.4 O sistema de grupo sanguíneo Duffy nas populações .....	27
5. Malária e os sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy .....	28
5.1 Malária e o grupo sanguíneo ABO .....	29
5.2 Malária e o grupo sanguíneo MNS .....	32
5.3 Malária e o grupo sanguíneo Duffy .....	33
Justificativa .....	36
Objetivos .....	38
Resultados – Artigos e Resumos .....	39
Artigo 1 .....	42
Artigo 2 .....	48

---

Artigo 3 .....	51
Artigo 4 .....	78
Resumos apresentados em congressos .....	82
Resumo 1 .....	82
Resumo 2 .....	84
Resumo 3 .....	86
Resumo 4 .....	88
Conclusões .....	90
Referências bibliográficas .....	91
Apêndices .....	113
Apêndice I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	113
Apêndice II – Termo de Consentimento Esclarecido e Informado .....	114
Apêndice III – Ficha Epidemiológica .....	115
Anexo I – Protocolo de Fenotipagem dos Sistemas de Grupos Sangüíneos ABO, MNS e DUFFY. ....	116

## DEDICATÓRIAS

- Aos meus pais, Antônio, Edith e Vany, os quais me proporcionaram os alicerces morais básicos da formação e manutenção de uma família.
  
- À Marisa, minha adorada esposa que, com muita paciência, carinho e amor, soube ser compreensiva, tolerante e respeitar meus momentos difíceis e de ausência, além de, diariamente, me motivar com palavras carinhosas, como também, redobrar a dedicação na administração familiar e profissional.
  
- Às minhas adoráveis e maravilhosas filhas, Camila e Bárbara que, carinhosamente, me incentivaram, além de graciosamente compreenderem a minha falta de atenção em muitos momentos e as ausências que foram necessárias.

## AGRADECIMENTOS

- A Inteligência suprema causa primeira de todas as coisas, **DEUS**, pela oportunidade da vida.
  
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, docente do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Famerp e membro do CIM – Centro de Investigação de Microrganismos, por transmitir muito dos seus conhecimentos com dedicação e, principalmente, por ter sido compreensivo, tolerante e incentivador, além de ter redobrado sua dedicação às atividades didáticas durante o processo de execução desse trabalho. Muito obrigado.
  
- Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, amigo e docente do Departamento de Biologia Molecular da Famerp, por suas contribuições científicas que foram fundamentais, como também pelo constante incentivo e amizade.
  
- À diretoria geral da Famerp, Dr. José Victor Maniglia e Dr. Humberto Liedtke Junior pelo investimento no programa de Pós-Graduação e nos Pós-Graduandos.
  
- Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação da Famerp, os Profs. Drs. Marcolino Domingo Braile, Reinaldo Azoubel e Emmanuel de Almeida Burdmann pela motivação, apoio e amizade.

- À Profa. Dra. Eny Maria B. Goloni, Diretora Adjunta de Pesquisa, pelo apoio administrativo e, especialmente pelo incentivo e amizade.
  
- Às Chefias do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Famerp que, durante todo o período de realização desse trabalho, me apoiaram e me incentivaram.
  
- À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, docente do Departamento de Biologia Molecular da Famerp, pela disposição carinhosa em me orientar.
  
- À Profa Dra. Andréa Regina B. Rossit, docente do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias e membro do CIM – Centro de Microrganismo da Famerp, pela amizade e, principalmente, pela forma carinhosa e dedicada com que transmitiu conhecimentos técnicos/científicos e colaborou com este trabalho.
  
- Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, docente do departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva da Famerp, pelos tratamentos e ensinamentos estatístico dispensados a este projeto, sempre com muita atenção e amizade.
  
- A Prof. Dra. Lílian Castilho e alunas de mestrado, doutorado e estagiárias do Hemocentro II - Laboratório de Ensino e Pesquisa da Unicamp, por todo apoio e dedicação, de forma carinhosa, dispensados durante parte do aprimoramento técnico no processo de padronização dos métodos moleculares.

- Aos coordenadores dos Hemocentros: Anália Milani, Conceição Silva e Roberto Duarte Maroso do Hemeron; Juvanete Távora Amora do Hemoapa; Ana Sueli Saraiva do Hemopa e Rita Uchoa da Silva do Hemacre, pela imprescindível autorização e apoio logístico para a coleta de sangue dos doadores.
- Aos Gerentes de Controle de Endemias de Novo Repartimento – PA e de Plácido de Castro – AC, pela colaboração e disponibilização dos seus serviços.
- Aos Profs. Drs. Álvaro Couto e Vanja Calvosa pelo imprescindível apoio logístico e colaboração para as coletas de sangue dos pacientes, além do caloroso acolhimento.
- À Profa. Dra. Marinete Marins Póvoa pelo acolhimento carinhoso, amizade e apoio dispensados.
- Ao casal Maria Figueredo e Anissé Alves, pessoas amigas que, com extrema dedicação me acolheram e me deram total apoio logístico no período de coletas em Novo Repartimento, no Estado do Pará.
- A todos os doadores de sangue e pacientes maláricos pela compreensão e colaboração com esse projeto, pois sem eles esse trabalho não existiria.

- Prof. Dr. Marcelo U. Ferreira por me inserir de maneira sábia no mestrado e me incentivar a fazer o doutorado, sempre com demonstração de apoio e amizade.
  
- Aos funcionários da Pós-Graduação da Famerp, Rose C. S. Desidério, Fabiana Cristina Godoy e José Antonio Silistino pela atenção carinhosa e clareza nas informações dispensadas.
  
- A Profa. Dra. Cláudia Bonini do Laboratório de Hemoglobinopatias do IBILCE – Unesp, pela amizade, constante colaboração e apoio.
  
- À Profa. MSc. Renata Tomé Alves pelo exemplo de dedicação nas fenotipagens das amostras e pela especial amizade.
  
- Profa. MSc. Wanessa Cristina de Souza-Neiras pela colaboração em parte das coletas e pelo convívio alegre e carinhoso.
  
- Ao Laurence Jorge Moretti pela fundamental colaboração e dedicação aos procedimentos técnicos e pela intensa demonstração de amizade.
  
- Ao Yuri Gollino por sua dedicação exemplar em parte desse projeto, além da demonstração de apreço, consideração e amizade.

- À Valéria Fraga e Luciana Moran pela maneira sempre atenciosa e carinhosa com que deram apoio técnico/laboratorial para a realização desse trabalho, como também pelo constante incentivo.
  
- Aos alunos de Iniciação Científica e Pós-Graduação do CIM que, em determinados momentos, cooperaram tecnicamente, além do convívio harmonioso e alegre.
  
- Aos membros do UPGEM da Famerp, a Profa. Dra. Erika C. Pavarino-Bertelli, a Profa. Dra. Maria Paula Sanches e a Mariângela Torreglosa Ruiz pelas sugestões, colaborações técnicas e amizade, como também ao Celso P. Reis Filho que, com paciência e amizade sempre nos auxiliou nas dificuldades de informática.
  
- À minha irmã Carmem Silvia e cunhado Márcio, pelo entusiasmado apoio e motivação.
  
- Ao 8º Seminário Laveran 2003, coordenado pelo Dr. Cláudio T. D. Ribeiro, pelas fundamentais críticas e sugestões feitas a esse projeto.
  
- Às instituições de fomento a pesquisa, Fapesp, CNPq e ao Programa de Auxílio à Pesquisa da Famerp – BAP, pelos recursos financeiros que foram imprescindíveis para a execução desse trabalho.

**EPIGRAFE**

**“Poucos terão a grandeza para dobrar a história,  
mas cada um de nós pode trabalhar para mudar uma  
pequena parte dos acontecimentos... A história é feita  
de inúmeros atos de coragem e crença”.**

Robert F. Kennedy

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

<b>Figura 1.</b>	Representação esquemática da organização estrutural do gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e seus polimorfismos .....	21
<b>Tabela 1.</b>	Alelos e as substituições nucleotídicas que determinam os genótipos e fenótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy .....	26

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>A, B, O, H e h</b>	Genes (alelos) do sistema de grupo sanguíneo ABO
<b>ABO</b>	Sistema de grupo sanguíneo
<b>C- C</b>	Beta quimiocinas – membro da família de quimiocinas
<b>CSP</b>	Proteína que circunda o esporozoíto do <i>Plasmodium</i>
<b>C-X-C</b>	Alfa quimiocinas – membro da família de quimiocinas
<b>DARC</b>	Antígeno receptor de quimiocinas Duffy ( <i>Duffy Antigen Receptor for Chemokines</i> )
<b>DHRN</b>	Doença hemolítica do recém-nascido
<b>EBL/EBA/DBP</b>	Famílias de proteínas de ligação aos eritrócitos ( <i>Erythrocyte-Binding-Like / Erythrocyte-Binding-Antigen / Duffy-Binding-Protein</i> )
<b>FY</b>	Alelo do sistema de grupo sanguíneo Duffy
<b>FYA, FYB,</b> <b>FY<sup>x</sup>/FYB<sup>wk</sup>,</b> <b>FYB-33, FYA<sup>null</sup></b>	Genes (alelos) do sistema de grupo sanguíneo Duffy
<b>Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy<sup>x</sup>/Fy<sup>wk</sup></b>	Antígenos do sistema de grupo sanguíneo Duffy
<b>GATA-1</b>	Região promotora do gene constituída de seqüência dos nucleotídeos G, A, T, A
<b>Glu</b>	Aminoácido ácido glutâmico
<b>Gly</b>	Aminoácido glicina
<b>GP</b>	Glicoforina
<b>GPA, GPB, GPE</b>	Genes das glicoforinas A, B e E
<b>GPA</b>	Glicoforina A

<b>GPB</b>	Glicoforina B
<b>GPE</b>	Glicoforina E
<b>gpFY</b>	Glicoproteína do sistema de grupo sanguíneo Duffy
<b>Leu</b>	Aminoácido leucina
<b>MNS</b>	Sistema de grupo sanguíneo
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>PvRBP/PvDBP</b>	Famílias de proteínas de ligação a reticulócitos do <i>Plasmodium vivax</i> ( <i>P. vivax Reticulocyte Binding Protein/P. vivax Duffy Binding Protein</i> )
<b>Ser</b>	Aminoácido serina
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleotídeo
<b>SVS</b>	Serviço de vigilância sanitária
<b>UDP</b>	Uridinadifosfato

---

## RESUMO

**Introdução:** A resistência inata a infecções maláricas, em humanos, tem sido atribuída a polimorfismos de grupos sanguíneos. Nós comparamos as frequências fenotípicas de ABO, MNS e Duffy e genotípicas de Duffy em doadores e pacientes maláricos de quatro áreas da Amazônia Brasileira. A identificação das espécies de *Plasmodium* foi feita por métodos morfológicos e moleculares. **Materiais e métodos:** Os grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy foram fenotipados por meio de testes sorológicos e a genotipagem do grupo Duffy por PCR/RFLP. Para as análises de significância e para obter a independência entre as proporções foi usado o teste exato de Fisher, com nível de significância de 0,05%. **Resultados:** Nossos resultados não mostraram correlação entre os fenótipos de ABO e infecções maláricas nas áreas estudadas. Foi observada uma significativa associação entre doadores de sangue e pacientes maláricos com os fenótipos S+s+ e S+s-. Em áreas distintas foi detectada correlação significativa entre esses dois grupos de indivíduos com alguns fenótipos de Duffy. **Discussão e Conclusões:** Nós identificamos dois indivíduos homocigotos para o alelo *FYB-33* (Duffy negativo) infectados por *P. vivax*, cujas variantes genéticas desse parasito foram VK210 e ou *P. vivax-like*. Os resultados de genotipagem do Duffy, nos grupos de estudos, mostraram alta frequência do genótipo *FYA/FYB*, seguidos pelos homocigotos *FYA*, *FYB*, e os heterocigotos *FYA/FYB-33* e *FYB/FYB-33*. Foram detectadas baixas frequências dos genótipos *FYA/FY<sup>x</sup>*, *FYB/FY<sup>x</sup>*, *FY<sup>x</sup>/FY<sup>x</sup>* e *FY<sup>x</sup>FYB-33*. Em ambos os grupos, indivíduos doadores de sangue e pacientes maláricos, foram encontrados o genótipo Duffy negativo (*FYB-33/FYB-33*). Nenhum indivíduo apresentou o genótipo *FY<sup>x</sup>/FYB-33*. Nossos dados sugerem que indivíduos com o genótipo *FYA/FYB* apresentam maior susceptibilidade à malária por *P. vivax*. A

presença do alelo *FYB-33* pode ser uma vantagem seletiva na população, o que poderá reduzir a taxa de infecção por esse *Plasmodium* nessa região.

**Palavras chave:** Malária, Amazônia Brasileira, Sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy, Fenotipagem, Genotipagem.

**ABSTRACT**

**Background:** Thus far, innate resistance to malaria infections in humans has been attributed to blood group polymorphisms. We have compared ABO, MNS and Duffy frequencies in blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas. The *Plasmodium* identification was determined by non-genotypic and genotypic screening tests. **Methods:** The ABO, MNSs and Duffy blood group was phenotyped using a microtyping kit and Duffy blood group genotyped by PCR/RFLP. In order to assess the variables significance and to obtain independence among the proportions, the Fisher's exact test was used. **Results:** Our results suggest no correlation between ABO phenotypes and malaria infection in all areas studied. We observed significant correlation between S<sup>+</sup>s<sup>+</sup> and S<sup>+</sup>s<sup>-</sup> phenotypes and malaria infection in three areas. Some of the Duffy phenotypes and genotypes showed significant correlation between donors and malaria patients in different areas. **Conclusions:** We detected two homozygous *FY\*B-33* carriers infected by *P. vivax*, whose circumsporozoite protein genotypes were VK210 and/or *P. vivax*-like. The data show a high frequency of the *FYA/FYB* genotype, followed by *FYB* and *FYA* homozygotes, *FYA/FYB-33* and *FYB/FYB-33*. Low frequencies were detected for the *FYA/FY<sup>X</sup>*, *FYB/FY<sup>X</sup>*, *FYX/FY<sup>X</sup>* and *FYB-33/FYB-33* genotypes. Negative Duffy genotype (*FYB-33/FYB-33*) was found in both groups: individuals infected and non-infected (blood donors). No individual carried the *FY<sup>X</sup>/FYB-33* genotype. Our data suggest that individuals with the *FYA/FYB* genotype have higher susceptibility to malaria. The presence of the *FYB-33* allele may be a selective advantage in the population, reducing the rate of infection by *P. vivax* in this region. These data represent an additional contribution towards the establishment of differential host susceptibility to malaria. Additional efforts are necessary in order to

clarify the evidence that *P. vivax* is being transmitted among Duffy blood group-negative and may contribute to better elucidate the physiopathologic differences in this parasite/host relationship in regions endemic for *P. vivax* malaria, in particular the Brazilian Amazon region.

**Key Words:** Malaria; Brazilian Amazon region; ABO, MNS and Duffy Blood Group Systems; Phenotyping; Genotyping.

## I. Introdução

### 1. Malária

A malária é uma doença parasitária, na maioria dos casos febril e aguda, de elevada prevalência e morbidade, produzida no homem por quatro espécies de plasmódio: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, a última das quais encontradas apenas na África tropical e alguns países do sudeste asiático<sup>1</sup>. A transmissão ocorre de pessoa a pessoa pela fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*. Em sua forma típica, a malária se caracteriza por acessos febris com intervalos de 24, 48 ou 72 horas, de acordo com a espécie de plasmódios infectantes. Os sinais e sintomas mais evidentes são cefaléia, calafrio, tremor, rubor e sudorese intensa. Formas leves da infecção, e mesmo a assintomática podem ocorrer em casos com baixa parasitemia e ou em pacientes com imunidade, premunição e outros fatores impeditores da doença.

Recaídas e cronicidade da malária são freqüentes, particularmente nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, quando não se esgotam as formas tissulares, por falta de tratamentos não erradicantes ou ainda por resistência a drogas como no caso do *P. falciparum*<sup>2</sup>. Apesar dos esforços de erradicação empreendidos entre 1955 e 1970, esta parasitose permanece entre as principais doenças tropicais da atualidade. Acontece anualmente de 300 a 500 milhões de casos clínicos em todo o mundo, dos quais mais de 90% estão nas regiões de savana e floresta equatorial da África e ao sul do deserto do Saara. Estima-se que, no mundo, uma criança morre de malária a cada 40 segundos, resultando em mais de 2.000 mortes diárias<sup>3</sup>, totalizando mais de dois milhões de mortes anuais, principalmente crianças abaixo de cinco anos de idade, e gestantes<sup>4</sup>. Cerca de 40% da população mundial habita áreas com risco de transmissão de malária.

O *P. falciparum* é a espécie responsável pela doença mais grave e pela maior mortalidade por malária.

Vários fatores contribuem para o grande número de casos de malária por *P. falciparum* na África, incluindo a transmissão pelo mosquito *Anopheles gambiae*, prevalente no continente e de difícil controle. Somando-se a isso, a falta de infraestrutura básica de saúde, dificuldade de acesso a serviços médicos e a antimaláricos, contribuem para o agravamento desse cenário, fazendo com que a doença seja de difícil controle, o que leva ao aumento do risco de casos de malária grave e morte<sup>5</sup>. O *P. vivax* é o parasito mais disperso e prevalente em algumas regiões endêmicas, sendo responsável por 70 a 80 milhões de casos anualmente<sup>6,7</sup>. Algumas características da biologia da transmissão do *P. vivax* conferem a esta espécie maior capacidade de adaptação a ambientes desfavoráveis. Como consequência, na medida em que as técnicas de controle da doença se tornam mais efetivas, a infecção pelo *P. vivax* tende a sobrepor aquela causada pelo *P. falciparum*. Um outro agravante das infecções causadas pelo *P. vivax*, é que recentemente essa espécie tem sido responsabilizada por muitos casos de malária grave, inclusive no Brasil<sup>8-10</sup>.

No Brasil, a transmissão dos plasmódios se restringe praticamente à Amazônia, onde se registram 99,5% dos casos no país. Entre 1970 e meados da década de 1990, a incidência anual de malária multiplicou-se por dez, com o registro de 635.646 casos no ano de 1999. Daí em diante, foi observada a uma média de 500 mil casos anuais, sendo registrados 540.047 casos no ano de 2006. Destes, 73,4% pelo *P. vivax*, seguido de 24,9% das infecções por *P. falciparum* e 1,6% de infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*). A ocorrência dos casos de malária na Amazônia legal não é homogênea, sendo que em 2006 os casos notificados, por Unidade Federal, para os Estados do Amazonas

(33,4%), do Pará (18,6%), de Rondônia (28,6%) e do Acre (17,3%) são responsáveis pelo maior número de casos registrados<sup>11</sup>. Nos primeiros cinco meses de 2007 foram notificados 157.163 novos casos de malária, dos quais 123.221 (78,4%) por *P. vivax*, 32.238 (20,5%) por *P. falciparum*, 49 (0,03%) por *P. malariae* e 1.653 (1,0%) foram de infecções mistas. Além disso, foram encontrados 2 casos de infecções por *P. ovale*, provavelmente de migrantes africanos<sup>11</sup>.

### **1.1 Ciclo biológico dos plasmódios humanos**

O homem se infecta com esporozoítos alojados nas glândulas salivares dos mosquitos. Inoculados na pele, esses esporozoítos podem permanecer várias horas antes alcançarem a corrente sanguínea<sup>12</sup>, de onde chegam aos hepatócitos em menos de 30 minutos. O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e depende de várias interações entre proteínas ligantes do parasito e proteínas receptoras do hospedeiro. Uma delas, a proteína circunsporozoítica (CSP) possui uma região de adesão, presente na superfície de esporozoítos, reconhece moléculas sulfatadas da membrana dos hepatócitos, permitindo a interação com a célula hospedeira e sua posterior invasão<sup>13</sup>. Recentemente, foi demonstrado por Mota & Rodrigues (2002)<sup>14</sup> que os esporozoítos invadem vários hepatócitos, migrando através deles, antes de finalmente se desenvolver em seu interior. No fígado ocorre a primeira esquizogonia que, ao final de 8 a 15 dias, dará origem a milhares de estágios invasivos, os merozoítos. Nos *P. vivax* e *P. ovale*, esses estágios mantêm-se nos hepatócitos sob formas quiescentes (hipnozoítos). Alguns meses depois da infecção primária, os hipnozoítos podem reativar-se e originar recaídas tardias. Os merozoítos produzidos ao final da esquizogonia tecidual invadem hemácias.

O processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto é complexo e envolve inúmeras etapas, sendo necessárias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores na superfície da célula hospedeira<sup>15</sup>. A invasão ocorre quando o merozoíto adere à superfície de hemácias não parasitadas. Esse mecanismo, que é rápido, aproximadamente vinte segundos, inclui fases de reconhecimento e adesão seguidas por reorientação e entrada<sup>16</sup>. No interior das hemácias ocorre nova esquizogonia, que produz esquizontes maduros que darão origem a merozoítos. Ao término da esquizogonia rompem-se as hemácias parasitadas e estas caem na corrente sangüínea. Ocorrem, nesse momento, os paroxismos febris a cada 48 ou 72 horas, que caracterizam a doença malária. Os merozoítos, ao invadirem novas hemácias, podem transformar-se em trofozoítos e posteriormente em esquizontes, ou alternativamente, podem diferenciar-se em formas de reprodução sexuada (gametócitos) infectantes para os mosquitos vetores. Não se conhecem os estímulos bioquímicos que levam à formação de gametócitos masculinos e femininos em infecções naturais, mas diversas moléculas, além de condições de estresse, podem produzir a gametocitogênese *in vitro*<sup>17</sup>.

A esporogonia ocorre integralmente no mosquito. Os gametócitos, ingeridos durante o repasto sangüíneo, originam gametas, cuja fusão forma um ovo ou zigoto. Este se transforma logo em um estágio móvel (oocineto), que penetra na parede do estômago do mosquito e origina um oocisto, alojado entre o epitélio e a membrana basal<sup>18</sup>. O zigoto, o oocineto e o oocisto recém-formados são os únicos estágios diplóides dos plasmódios. No interior do oocisto ocorre uma divisão meiótica seguida de várias divisões mitóticas, resultando na formação de esporozoítos. A ruptura do oocisto libera milhares de esporozoítos na hemocele, que migram para as glândulas

salivares, quando, então, o inseto ao fazer o repasto sanguíneo, inocula na pele do hospedeiro humano os esporozoítos, reiniciando assim, o ciclo biológico<sup>19</sup>.

## **1.2 Processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos de plasmódios humanos**

A habilidade para o reconhecimento, aderência, invasão e formação do vacúolo parasitóforo se deve à presença abundante de organelas especializadas (micronemas e roptrias) no pólo apical do merozoíto e com excreção seqüencial de proteínas específicas. O processo de invasão é complexo e envolve muitas etapas incluindo: I. reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; II. reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; III. movimento da junção ao redor do merozoíto com simultânea invaginação da membrana do eritrócito, até que o parasito se encontre dentro da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo<sup>20-23</sup>. O contato inicial é aleatório e se dá em qualquer área da superfície do merozoíto e da hemácia; em seguida o merozoíto, ativamente, se reorienta justapondo o pólo apical em contato com a membrana da hemácia, utilizando para isso moléculas de adesinas, polimerização/despolimerização de actina e componentes de um complexo motor de miosina<sup>24</sup>. Essas duas primeiras etapas são, aparentemente, de baixa afinidade e reversíveis. Ambas as fases permitem ao parasito distinguir entre um eritrócito competente para a invasão e outro tipo celular<sup>25</sup>. No local de contato uma zona juncional é formada e pode-se observar uma densa camada na membrana do eritrócito, o que se deve à interação do tipo ligante-receptor de alta afinidade, sendo essa interação irreversível<sup>26</sup>. A entrada do merozoíto na hemácia ocorre pela ação de proteases, fosfolipases e lipídios que promovem, no ponto de contato, uma fosforilação com o desarranjo dos componentes estruturais da membrana eritrocitária. Com isso,

novamente, o complexo motor de actina-miosina age para a formação do vacúolo parasitóforo<sup>24</sup>.

As espécies de plasmódios têm diferenças quanto à interação dos merozoítos com as hemácias. O *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades, enquanto que o *P. vivax* invade exclusivamente reticulócitos. Os merozoítos de *P. falciparum* invadem hemácias por meio de múltiplas interações entre proteínas ligantes e receptores. Na sua superfície, diversas moléculas são capazes de exercer o papel de ligantes a receptores eritrocitários<sup>27</sup>. Famílias de proteínas ligantes como as *Erythrocyte-Binding-Like* (EBL), tais como EBA-175, BAEBL (EBA-140), JESEBL (EBA-181), EBL-1 e PEBL (EBA-165) são expressas na superfície da membrana dos merozoítos<sup>28</sup>. Essas proteínas se ligam a glicoproteínas específicas dos eritrócitos para iniciar o processo de invasão. O *P. falciparum* pode utilizar diversos receptores presentes na superfície dos eritrócitos para invadi-los. Parece evidente que a EBA-175 se liga à Glicoforina A do sistema sanguíneo MNS, provavelmente o principal receptor<sup>29</sup>, a EBA-181 pode se ligar à Glicoforina B desse sistema de grupo sanguíneo e a outros receptores, enquanto que a EBA-140 se liga à glicoforina C do grupo sanguíneo Gerbich<sup>30</sup>. Uma característica importante do *P. falciparum* é a habilidade de alterar o processo de invasão eritrocitária, utilizando vias alternativas, permitindo a esta espécie inúmeras vantagens. A primeira delas é que o parasito pode invadir eritrócitos de todas as idades; outra vantagem é a capacidade de evasão do sistema imune, uma vez que nas diferentes vias de invasão celular há envolvimento de diferentes moléculas ligantes do parasito<sup>31</sup>.

Em relação ao *P. vivax*, a formação da junção e a conseqüente invasão do merozoíto são mediadas pela interação de proteínas de superfície de membrana pertencente a família de proteínas ligantes conhecidas como *P. vivax Duffy Binding*

*Protein* (PvDBP), também denominadas de *P. vivax reticulocyte-binding proteins* (PvRBP1 e 2), que se ligam a receptores de reticulócitos para ativar o processo de invasão eritrocitária<sup>32, 33</sup>. Esse plasmódio é capaz de invadir somente reticulócitos que expressam em sua superfície o determinante antigênico do grupo sanguíneo Duffy, um antígeno receptor de quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines* - DARC), o qual é o receptor da molécula ligante PvDBP<sup>34</sup>. Indivíduos Duffy-negativos parecem ser completamente refratários a essa infecção<sup>35</sup>. Embora o *P. vivax* seja completamente dependente de DARC para invadir reticulócitos, evidências recentes na África sugerem que indivíduos Duffy negativos possam se infectar com *P. vivax*<sup>36</sup>, provavelmente por meio de outros receptores envolvidos no reconhecimento eritrocitário<sup>32</sup>.

Os merozoítos de *P. vivax* invadem primariamente os reticulócitos, eritrócitos jovens, os quais compreendem uma minoria (~1%) da população de células circulantes que, evidentemente, expressam glicoproteína Duffy em suas membranas, como as hemácias maduras e outros receptores adicionais essenciais ao parasito<sup>37</sup>. Esse processo é o resultado da interação entre tais receptores e regiões da PvDBP<sup>38</sup>. Isto significa que os merozoítos de *P. vivax* interagem com inúmeros eritrócitos maduros na circulação antes de invadirem um reticulócito. Barnwell et al. (1989)<sup>39</sup> sugeriram que interações prematuras entre PvDBP e o antígeno do grupo sanguíneo Duffy em eritrócitos maduros poderiam ser prejudiciais para a sobrevivência do parasito. Portanto, acredita-se que anteriormente à junção merozoíto-eritrócito haveria uma seleção da célula hospedeira, impedindo assim, a interação da PvDBP com uma célula não-alvo<sup>32,40</sup>. Se essa suposição estiver correta, ou seja, se a seleção dos reticulócitos é um passo que antecede a formação da junção, algumas PvDBP, como a PvRBP-1 e PvRBP-2, seriam essenciais para esse processo. Entretanto, os papéis dessas proteínas ainda necessitam ser

devidamente esclarecidos, já que proteínas homólogas das PvDBP também já foram encontradas em *P. falciparum* e *P. yoelli*, duas espécies de *Plasmodium* que não infectam apenas reticulócitos<sup>32</sup>.

As proteínas ligantes (PvDBP) localizadas dentro dos micronemas dos merozoítos, que atuam no processo de invasão<sup>41</sup> são moléculas de 140kDa no *P. vivax* e de 135kDa no *P. knowlesi*<sup>42</sup>. Os genes que as codificam têm estruturas similares e proteínas com segmentos de regiões com seqüências de aminoácidos homólogas, sugerindo que eles pertencem a uma família que codifica proteínas de ligação de eritrócitos<sup>43</sup>. A área extracelular dessas proteínas pode ser dividida em seis regiões, baseadas na homologia dessas seqüências de aminoácidos. Cada proteína tem duas regiões ricas em cisteína (regiões II e VI, também referidas com 5' e 3', respectivamente), as quais têm resíduos de amino-ácidos aromáticos e cisteínas altamente conservados<sup>43</sup>. Uma dessas regiões, a região II, foi definida como a de ligação para os ligantes de *P. vivax* e *P. knowlesi*. Os ligantes de *P. knowlesi* têm diferentes especificidades de ligação que podem determinar redundância no processo de invasão, resultando numa vantagem de sobrevivência em casos de mutações nos receptores do hospedeiro<sup>38</sup>. A região funcional de ligação das PvDBPs localiza-se na região II e contém 330 aminoácidos, sendo seu sítio de ligação ao eritrócito situado no segmento de 170 aminoácidos que contém as cisteínas 5 a 8<sup>44</sup>. Embora a posição dos resíduos de cisteínas seja conservada nessa região, outros aminoácidos já mostraram ser altamente polimórficos<sup>45</sup>, sugerindo, portanto, estar sujeitos à pressão positiva do sistema imune do hospedeiro<sup>46</sup>. Essa região da PvDBP do *P. vivax* liga-se especificamente ao antígeno Duffy humano, e a do *P. knowlesi* liga-se aos antígenos Duffy humanos e de *Rhesus*. Portanto, as regiões são encontradas em ligantes de

parasitas que intermedeiam a citoaderência e a invasão de eritrócitos; dois processos que realçam a patogênese da malária. Para entender as bases estruturais dessas interações, é importante determinar as estruturas tridimensionais e mapear regiões dentro das PvDBLs que contém resíduos de ligação aos receptores e, também, identificá-los<sup>47</sup>.

## **2. Aspectos da Composição Étnica Brasileira**

O Brasil foi inicialmente colonizado por portugueses no século XVI, período em que teve início a miscigenação entre colonizadores e ameríndias nativas. Posteriormente, com o tráfico de escravos, o negro passou a ser o principal grupo de miscigenação com o branco. Somente nos séculos XIX e XX, o país passou a receber imigrantes de diversas nacionalidades, principalmente europeia, mas também asiáticas e do oriente médio. Hoje, o Brasil é um país altamente miscigenado e apresenta intensa heterogeneidade entre suas diferentes regiões<sup>48</sup>. Essa heterogeneidade é devida ao padrão peculiar de colonização dessas regiões, uma vez que variou o número de indivíduos que compuseram o estoque genético de cada grupamento étnico parental. A região Norte, por exemplo, é a que exibe a maior contribuição ameríndia, enquanto que no Sul do país é observada a maior proporção de caucasóides<sup>49</sup>. O padrão regional de miscigenação foi consideravelmente alterado pelas correntes de migração interna, fazendo da região Sudeste o principal destino de grande contingente desses imigrantes. Portanto a população do Sudeste brasileiro apresenta características que se assemelham às do Brasil como um todo<sup>48,50</sup>.

Considerando a sugestão de que os genes que codificam os determinantes antigênicos dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy exibem diferenças

étnicas, torna-se imprescindível o estudo de polimorfismos genéticos em populações de diferentes regiões brasileiras<sup>51</sup>.

### **3. Sistemas de Grupos Sangüíneos**

Os grupos sangüíneos são antígenos da superfície dos eritrócitos, correspondentes a proteínas, glicoproteínas e glicolípídeos, cujas variações podem ser detectadas por anticorpos que ocorrem naturalmente, devido à imunização por outros presentes no ambiente, ou como resposta a processos de aloimunização induzidos por gravidez ou transfusões sangüíneas<sup>52</sup>. Um total de 29 sistemas de grupos sangüíneos humanos são reconhecidos pela *International Society of Blood Transfusion*<sup>53,54</sup>, com mais de 600 diferentes antígenos determinados, muitos dos quais são raros ou encontrados apenas em alguns grupos étnicos.

A diversidade antigênica de grupos sangüíneos é resultado de diferentes mecanismos de troca de material genético entre genes homólogos, substituição simples de nucleotídeo – SNP (polimorfismos de nucleotídeos únicos), recombinação ou conversão de genes; duplicação de um exon; deleção de gene, exon ou nucleotídeo e inserção de nucleotídeo. Os SNPs são as alterações genômicas que geram a maioria da variabilidade genética antigênica e determinam a maioria da diversidade observada entre os grupamentos étnicos<sup>55,56</sup>.

A distribuição dos sistemas de grupo sangüíneos varia nas diferentes áreas do mundo, de acordo com a população ou grupamento étnico, ocorrendo, também, variações da distribuição dentro de subpopulações humanas<sup>57</sup>. Pouco se conhece sobre o significado biológico dos polimorfismos de grupos sangüíneos, porém o papel de muitas dessas moléculas antigênicas (proteínas e carboidratos) é de importante função

fisiológica, como receptores para várias citocinas e outros ligantes, podendo, também, ser alvos de processos fisiopatológicos, infecções e receptores para microorganismos<sup>55,58,59</sup>.

### 3.1 Sistema de Grupo Sangüíneo ABO

O sistema de grupo sangüíneo ABO, foi descoberto por Karl Landsteiner no início do século XX e, até hoje, é o principal sistema de grupos sangüíneos identificado juntamente com o sistema Hh, e juntos envolvem três antígenos mais importantes A, B e H. A herança é geneticamente determinada pelos genes *A*, *B* e *O*, sendo que *A* e *B* são co-dominantes entre si e dominantes em relação à *O*. Os alelos *H* e *h* são herdados independentemente dos genes que determinam o tipo ABO. O gene *H* é comum e o *h* é raro, quando em homozigose ou heterozigose<sup>52</sup>.

Os antígenos A e B são estruturas de carboidratos presentes em glicolípídeos e glicoproteínas da membrana dos eritrócitos. Essas cadeias de carboidratos são sintetizadas pela ação das glicosiltransferases, que são enzimas que catalisam a transferência de monossacarídeos específicos de um nucleotídeo substrato doador para um substrato receptor. As transferases A e B são produtos dos alelos *A* e *B*, respectivamente. O substrato receptor para essas transferases (A e B) é uma estrutura denominada de antígeno H (“H transferase”) expressa pelo alelo *H*, que contém, como resíduo terminal, o monossacarídeo fucose<sup>56</sup>.

O produto do gene *A* é uma enzima que transfere o monossacarídeo *N*-acetilgalactosamina ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ -*N*-acetil-galactosamina) do substrato doador, a uridinadifosfato (UDP)-*N*-acetilgalactosamina para um resíduo de galactosefucosil do antígeno H, gerando, assim, uma estrutura A ativa. O produto do gene *B* é uma enzima

que transfere o monossacarídeo *N*-galactosil ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ -*N*-galactosil) do substrato doador (UDP)-galactose para a galactosefucosil do antígeno H, produzindo, também, uma substância B ativa. As *N*-acetilgalactosamina e *N*-galactosamina são açúcares imunodominantes dos antígenos A e B, respectivamente, gerando uma diferença estrutural entre essas moléculas, determinando, por isso, a maior diferença entre as hemácias dos grupos A e B. Já o alelo *O* não produz enzima ativa, assim, nos eritrócitos do grupo O, o antígeno H não é convertido<sup>52,56</sup>.

As transferases A e B são codificadas por um único gene localizado no braço longo do cromossomo 9 (9q34.1-2)<sup>60,61</sup>. Assim, com base nas alterações nucleotídicas e na detecção sorológica das substâncias A, B e H, foi possível classificar fenotípica e genotipicamente o sistema de grupos sanguíneo ABO. O grupo sanguíneo A é determinado pelos genótipos  $A_1A_1$ ,  $A_1O$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_2A_2$  e  $A_2O$  e geram os fenótipos (antígenos nas hemácias)  $A_1$  e  $A_2$ . Dos indivíduos do grupo A, 80% são  $A_1$ , enquanto que o restante é  $A_2$ . O grupo B é determinado pelos genótipos  $BB$  e  $BO$ , gerando o fenótipo B. O grupo AB é determinado pelos genótipos  $A_1B$  e  $A_2B$ , sendo os seus fenótipos  $A_1B$  e  $A_2B$  (A + B). Finalmente o grupo O tem como genótipo  $OO$  ( $HH$  ou  $Hh$ ) e fenótipo O ou H<sup>62</sup>.

A determinação do grupo sanguíneo ABO tem amplas implicações, principalmente em hemoterapia. A identificação fenotípica pode ser feita pela detecção sorológica com a utilização de reagentes imuno-hematológicos, que identificam a presença ou ausência dos antígenos A, B e H. Podem-se detectar diferentes níveis de expressão dos antígenos A ou B nos eritrócitos e, por isso, podem ser classificados em subgrupos de A ou B, de acordo com a intensidade de aglutinação dos eritrócitos com os reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti- $A_1$  e anti-H. Devido a diferentes quantidades

de locais antigênicos na superfície das hemácias dos diferentes grupos sanguíneos ABO, a reatividade entre anti-H e hemácias tendem a ser:  $O > A_2 > B > A_2B > A_1 > A_1B$ <sup>63</sup>. É possível diferenciar, sorologicamente, os dois principais alelos de A,  $A^1$  e  $A^2$ , utilizando-se o reagente lectina anti- $A_1$ <sup>64</sup>.

### 3.2. Sistema de Grupo Sanguíneo MNS

O sistema de grupo sanguíneo MNS é um complexo de 43 antígenos distribuídos em duas moléculas híbridas de duas proteínas<sup>53</sup>. Os antígenos desse sistema pertencem a uma família de sialoglicoproteínas de transmembrana tipo 1 das hemácias, denominadas de glicoforinas (GP), cujas estruturas podem ser subdivididas em três domínios extracelulares distintos, a glicoforina A (GPA), a glicoforina B (GPB) e a glicoforina E (GPE). O antígeno MN está associado à GPA que, juntamente com a proteína de banda 3 (proteína de transporte de ânions), forma o mais importante grupo de glicoproteínas intrínsecas da membrana eritrocitária. As glicoforinas C e D não estão relacionadas com o grupo sanguíneo MNS e sim com o sistema Gerbich. A GPA, a maior sialoglicoproteína presente na membrana do eritrócito, contém 131 aminoácidos, com um domínio extracelular, uma região hidrofóbica transmembrana e um domínio intracitoplasmático. Cada eritrócito contém de 300.000 a 1.200.000 moléculas de GPA. Da mesma forma, o antígeno Ss está localizado na GPB, com estrutura semelhante à GPA, porém possui apenas 76 aminoácidos e é menos abundante, com 30.000 a 250.000 moléculas por célula<sup>53,65</sup>.

As glicoforinas A, B e E são produtos de três genes homólogos *GPA*, *GPB* e *GPE* localizados no cromossomo 4 q31-34 humano, na seguinte ordem 5'-*GPA*-*GPB*-*GPE*-3' (Cook et al., 1980 – apud<sup>13</sup>). O produto do gene *GPE* não foi identificado<sup>65</sup>. O

gene *GPA* tem 7 exons ativos enquanto que o gene *GPB* possui apenas 6 exons, sendo o exon B3 não transcrito, devido a uma mutação na região de *splicing*, que não o inclui no mRNA, resultando em GPB mais curta. Já o gene *GPE* apresenta uma estrutura semelhante ao *GPB*, porém possui dois pseudo-exons (E3 e E4) gerando uma proteína de 59 aminoácidos<sup>65</sup>. Os genes *GPA* e *GPB* possuem, respectivamente, dois pares de alelos *M*, *N* e *S*, *s*. Esses alelos estão de tal forma ligados que podem ser considerados como pseudo-alelos, e agrupados de tal modo que são herdados como haplótipos<sup>66</sup>.

Os antígenos *M* e *N* diferem pela substituição de dois aminoácidos no início da cadeia da *GPA*, <sup>Ser</sup>M<sup>Leu</sup> e <sup>Gly</sup>N<sup>Glu</sup>, nas posições 1 e 5, respectivamente. O polimorfismo *Ss* é definido pela presença do aminoácido Met ou Thr na posição 29 de seus respectivos polipeptídios da *GPB*<sup>65</sup>. A atividade antigênica *M* e *N* depende da presença e conformação dos resíduos de ácido siálico anexados. As hemácias podem expressar os antígenos *M*, *N* ou ambos<sup>66</sup>. As células *M* também expressam um antígeno “*N-like*” fraco. Reações entre esses antígenos e seus respectivos anticorpos podem exibir um efeito de dosagem, isto é, células homozigotas dão uma reação de aglutinação mais forte que as heterozigotas. Os antígenos *S* e *s* são antitéticos e estão localizados na sialoglicoproteína (*GPB*) da membrana eritrocitária<sup>62</sup>.

Recombinações não homólogas entre os genes *GPA*, *GPB* e *GPE* com conseqüentes deleções parciais ou totais destes genes (*En(a-)*, *M<sup>g</sup>*, *M<sup>k</sup>* e *S<sup>u</sup>*), produzem variantes de *MN* e de *S*. Nesses casos, o portador desenvolve anticorpos contra determinantes antigênicos de segmentos de proteínas que ele não possui<sup>67</sup>.

O anticorpo anti-*En<sup>a</sup>* reage contra determinantes não polimórficos de várias regiões da *GPA*. Esse anticorpo é raro e ocorre em indivíduos homozigotos para a deleção do *GPA*, não expressando a *GPA*, por isso, não possuem os antígenos *M* ou *N*.

O anti-En<sup>a</sup> aglutina células da maioria dos indivíduos, cujo fenótipo é descrito como En(a+), mas não aglutina hemácias dos portadores dessa deleção, determinando, dessa forma, o fenótipo En(a-). O antígeno M<sup>s</sup> parece estar praticamente ausente na maioria das populações, porém o anticorpo anti-M<sup>s</sup>, aparentemente, é o anticorpo do sistema MNS mais frequentemente encontrado na espécie humana. Os indivíduos com genótipo M<sup>s</sup>N simulam ser do grupo N quando suas hemácias são testadas apenas com os anti-soros anti-M e anti-N. O mesmo ocorre em indivíduos com o genótipo MM<sup>s</sup>, que aparentam ser do grupo M. A variante M<sup>k</sup> é rara e, por mecanismos desconhecidos, o gene M<sup>k</sup> suprime a síntese das glicoforinas A e B. Nos indivíduos homocigotos para este gene, os antígenos M, N, S, U, En<sup>a</sup> estão ausentes nos eritrócitos, determinando, portanto, o fenótipo M-N-S-s-En(a-)<sup>69</sup>. Assim, indivíduos com genótipos MS/M<sup>k</sup> ou Ms/M<sup>k</sup> investigados com os anti-soros anti-M, anti-N, anti-S e anti-s simularão ser MS/MS ou Ms/Ms, da mesma maneira que, nas condições semelhantes, os indivíduos NS/M<sup>k</sup> ou Ns/M<sup>k</sup> simularão ser NS/NS ou Ns/Ns<sup>67</sup>.

Nos grupamentos étnicos negróides observou-se a ocorrência, com frequência em torno de 10%, do gene S<sup>u</sup>, alelo de S e s. Esse alelo, que é inexistente ou muito raro em populações que não têm origem africana, quando em homocigose condiciona a incapacidade de as hemácias serem aglutinadas por anti-soros anti-S e anti-s, determinando, assim, o fenótipo S-s-. Dessa maneira, indivíduos com esse fenótipo podem apresentar um anticorpo imune, denominado de anti-U. Hemácias que não reagem com anti-U são designadas de u, em contraposição, a maioria das pessoas reage contra esse anti-soro e é denominada de U<sup>67</sup>. O antígeno U também está localizado na glicoforina B, mas não é antitético ao S ou s<sup>52</sup>. Anti-U é um anticorpo que pode ser produzido em menos de 1% de etnia negróide e reage contra determinantes antigênicos

de grande parte da molécula de GPB e contra as células da grande maioria das pessoas<sup>18</sup>. A ausência do antígeno U é resultado de uma deleção do gene da GPB, que origina, também, a ausência de determinantes antigênicos de S e s, de modo que o fenótipo desses indivíduos é S-s-U-<sup>70</sup>. Os antígenos S e s estão ausentes em aproximadamente 1% dos indivíduos negróides e a ausência do antígeno U ocorre em 84% dessas pessoas, ou seja, elas apresentam o fenótipo S-s-U-. Esse fenótipo não é detectado em grupamentos étnicos caucasóides<sup>52</sup>.

### 3.3. Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy

Os antígenos do sistema de grupo sangüíneo Duffy são glicoproteínas de transmembrana que funcionam como receptores para quimiocinas (*Duffy Antigen/Receptor for Chemokine – DARC*) e para os merozoítos de *Plasmodium vivax*<sup>71</sup>. A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não eritróides como rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cerebelo<sup>71-73</sup>.

A existência do sistema sangüíneo Duffy foi inicialmente postulada por Cutbush e Mollison, em 1950, que encontraram anticorpos de especificidade até então desconhecida no soro de um paciente hemofílico politransfundido de sobrenome Duffy. O determinante antigênico reconhecido por esses anticorpos foi denominado Fy<sup>a</sup>, em homenagem ao paciente, cujo sobrenome era Duffy. Posteriormente, Ikin e colaboradores observaram no soro de uma mulher múltipara não-transfundida, cujos filhos não manifestaram a doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), anticorpos contra outro determinante antigênico relacionado, que denominaram Fy<sup>b</sup>. Com o auxílio desses anticorpos que reconhecem os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, as populações caucasóides

passaram a ser classificada em três grupos: Fy(a+b-), Fy(a+b+) e Fy(a-b+), sendo a transmissão hereditária desse fenótipo explicada por intermédio da admissão de dois alelos autossômicos, *FYA* e *FYB*<sup>74</sup>.

Como referido por Beiguelman (1983)<sup>74</sup>, Sanger et al. (1955) verificaram que entre os indivíduos negróides, predomina a reação negativa tanto com soro anti-Fy<sup>a</sup> quanto com soro anti-Fy<sup>b</sup>, ou seja, nos que apresentam o fenótipo Fy(a-b-). Em 1965, Chown e colaboradores<sup>75</sup> relataram a existência de uma variante de Fy<sup>b</sup>, cujas hemácias reagem fracamente com soros anti-Fy<sup>b</sup>, com uma frequência de 2% em indivíduos caucasianos. Essas hemácias apresentam baixa expressão da glicoproteína Duffy em sua superfície, determinando o fenótipo Fy(a-b-)<sup>76</sup>. Em 1971, estudos sorológicos com a utilização do anticorpo anti-Fy3 definiram outro determinante antigênico, o Fy3 que está sempre presente em hemácias Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, mas ausente em eritrócitos Fy(a-b-)<sup>77</sup>. Posteriormente, foram definidos outros determinantes antigênicos, os Fy4 e Fy5 que, talvez não estejam relacionados ao sistema Duffy, visto que reagem com eritrócitos em que falta a proteína Duffy. O soro anti-Fy5 define o domínio Fy5, encontrado nos antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> e proteínas do sistema RH<sup>78,79</sup>.

No ano de 1987, o primeiro anticorpo monoclonal murino anti-Fy6 foi obtido e definiu outro determinante antigênico Duffy (Fy6) presente em todas as células Duffy-positivo, mas ausente em células Fy(a-b-). Esse epítipo se revelou importante reagente para purificação, caracterização e clonagem do alelo *FY*. Esses determinantes não são expressos em indivíduos Fy(a-b-). Raramente detectam-se anticorpos com essas especificidades entre doadores de sangue<sup>80,81</sup>. A partir de 1989, os estudos referentes ao sistema Duffy avançaram. A purificação da glicoproteína Duffy e a clonagem do cDNA permitiram a abordagem de estudos estruturais e funcionais<sup>34,89</sup>. A homologia dessa

proteína com os receptores de quimiocinas, peptídeos implicados na resposta inflamatória permitiram avanços na compreensão da função biológica do sistema de grupo sanguíneo Duffy<sup>82,83</sup>.

### **3.3.1. Antígenos Duffy como receptores de quimiocinas**

As pesquisas sobre citocinas e seus receptores convergiram na investigação dos antígenos de grupo sanguíneo Duffy. Muitos aspectos da biologia dos antígenos Duffy devem ser considerados para determinar suas funções e significados. A princípio, a proteína não é essencial para a estrutura e função normal dos eritrócitos, pois hemácias com ausência da glicoproteína Duffy não manifestam alterações, e indivíduos com fenótipo Duffy negativo são, aparentemente, normais<sup>72</sup>. Embora a proteína seja expressa em células endoteliais de capilares, um sítio importante para tráficos de leucócitos induzidos por quimiocinas é, também, em células epiteliais de ductos coletores dos rins, células epiteliais (tipo I) de alvéolos pulmonares e células de Purkinje do cerebelo<sup>84</sup>.

As quimiocinas são peptídeos de uma família de moléculas com capacidade quimiotática, atividades proinflamatórias que ativa neutrófilos por quimiotaxia<sup>71</sup>. As quimiocinas são divididas em duas grandes subfamílias, as C-X-C ( $\alpha$  quimiocinas) e as C-C ( $\beta$  quimiocinas), que diferem na posição dos amino-ácidos da região amino-terminal<sup>71,85,86</sup>. O efeito das quimiocinas nas células-alvo é mediado por receptores específicos e de alta afinidade nas superfícies celulares. Esses receptores podem se ligar em mais de que uma quimiocina dentro da família C-X-C ou C-C, pois não há reações cruzadas, ou seja, receptores para C-X-C não se ligam a C-C e vice-versa<sup>87</sup>.

Estudos sobre receptores de quimiocinas multiespecíficos em eritrócitos humanos mostraram que a IL-8 liga-se minimamente a hemácias Duffy-negativos e que

anticorpos monoclonais para antígenos Duffy bloqueavam a ligação de IL-8 em eritrócitos Duffy positivo, indicando que os antígenos de grupo sanguíneo Duffy são receptores de quimiocinas<sup>82</sup>. Com isso, caracterizou-se que o *Duffy Antigen/Receptor for Chemokine* (DARC) age como um receptor multiespecífico para ambas as famílias de quimiocinas, C-X-C e C-C com alta afinidade<sup>82,87</sup>. Outros estudos estabeleceram a relação entre receptores de quimiocinas nos eritrócitos humanos e antígenos Duffy, por alinhamento da seqüência da proteína Duffy com outros membros da família de quimiocinas. Observaram, também, que a organização dos dois exons *FY* é a mesma encontrada nos genes de outros receptores de quimiocinas. Ficou demonstrado, assim, que esses receptores são idênticos aos antígenos do grupo sanguíneo Duffy e, também, receptores para a invasão do *P. vivax*<sup>88-90</sup>. Por isso, a proteína Duffy é alternativamente denominada DARC<sup>86</sup>. O significado biológico do DARC nos eritrócitos, inicialmente, pareceu questionável, devido à falta de associação entre doenças e fenótipo Duffy negativo. Contudo, a função-estrutura e localização precisa do DARC em fisiologia normal e patológica ainda não é totalmente esclarecida, e a análise do papel biológico na interação receptores/ligantes necessita de mais pesquisas<sup>76</sup>.

### 3.3.2. O gene *Duffy* (*FY*)

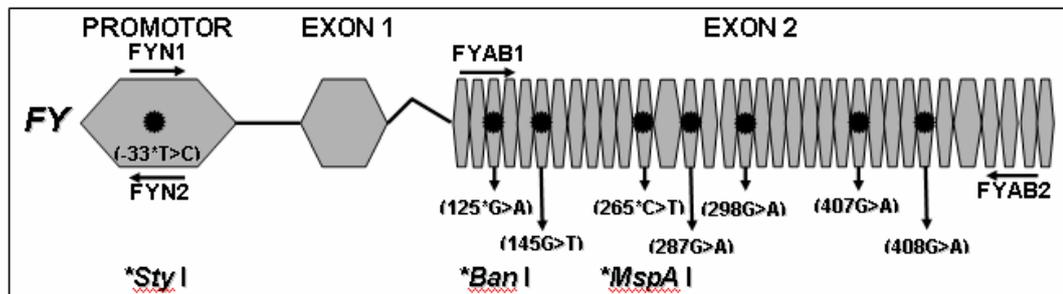
O gene que codifica a proteína Duffy foi o primeiro *locus* autossômico a ter sua localização definida, corretamente, no cromossomo 1 humano<sup>91</sup>, na região 1q21-q23<sup>92</sup>. Posteriormente, por meio de hibridização *in situ*, em um clone de cDNA que codifica a subunidade maior da proteína Duffy, o gene foi mapeado em 1q22-q23<sup>34,96</sup>. Imaginava-se que o gene *FY* era constituído de apenas 1 exon, que expressava uma estrutura primária polipeptídica altamente hidrofóbica, com uma seqüência nanopeptídica N-

terminal (MASSYVLQ), composta de 338 aminoácidos, denominado de transcrito menor<sup>72,88</sup>. O locus de *FY* e o do sistema sanguíneo *RH* são sintênicos, pois ambos se localizam no cromossomo 1, porém o *RH* está na extremidade do braço curto e o *FY*, no braço longo<sup>72</sup>. Estudos posteriores mostraram a existência de um outro exon que possui seqüências codificadoras não traduzidas. Esse exon pode ser unido ao segundo exon (após *splicing*), que origina um transcrito de 336 aminoácidos, com uma seqüência de um heptapeptídeo N-terminal (MGNCLHR) chamado de transcrito maior<sup>94,95</sup>.

Após a caracterização do gene *FY*, os nucleotídeos passaram a ser numerados utilizando o mRNA *spliced*. Portanto, o primeiro nucleotídeo do códon de iniciação da tradução (AUG) é o nucleotídeo número 1<sup>76</sup>. Dessa forma, evitam-se as inconsistências geradas por tamanhos variados de 5'-UT aos diferentes sítios de iniciação de transcrição como descrito por Tournamille et al. (1995)<sup>96</sup> e por Iwamoto et al. (1996)<sup>95</sup>. A Figura 1 representa, esquematicamente, o gene *FY* do sistema sanguíneo Duffy.

### **3.3.3. Antígenos Duffy**

O produto do gene Duffy (*FY*) é uma glicoproteína (gp-FY) N-glicosilada de transmembrana de 35 a 43 kDa, moderadamente imunogênica<sup>71</sup>, com variação no grau de N-glicosilação que deve contribuir para essa faixa de peso molecular (35 a 45 kDa)<sup>34</sup>. Essa proteína é constituída de sete hélices hidrofóbicas, com uma topologia na qual existe um domínio amino-terminal extracelular, três alças extracelulares, três alças citoplasmáticas e uma área carboxi-terminal citoplasmático, ou seja, a glicoproteína Duffy apresenta sete passagens transmembrânicas<sup>88</sup>.



**Figura 1.** Representação esquemática do gene (*FY*) do sistema de grupo sanguíneo Duffy incluindo a região promotora e os dois exons e seus polimorfismos, modificado de Cavasini et al, 2001<sup>131</sup>. As estrelas pretas representam as substituições dos nucleotídeos e as setas verticais indicam os números e os nucleotídeos substituídos. As setas horizontais indicam a localização e orientação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem. As substituições dos nucleotídeos 125G>A e 265C>T no exon 2 e -33T>C na região promotora, marcadas com asteriscos podem ser detectadas por análises do RFLP usando as enzimas de restrição *Ban*I, *Msp*A I e *Sty*I, respectivamente.

Masouredis et al. (1980)<sup>97</sup>, utilizando-se de soros humanos anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup> e anti-IgG ferritina marcada, estimaram que as hemácias Fy(a+b-) e Fy(a+b+) carregam entre 13.000 e 14.000 sítios antigênicos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, respectivamente. Como esperado, hemácias Fy(a+b+) têm metade do número de sítios Fy<sup>a</sup> que as hemácias de fenótipo Fy(a+b-). Talvez isso possa explicar, parcialmente, os resultados encontrados por Wooley et al., (2000)<sup>98</sup>, com análises de citometria de fluxo, ao observar que a expressão de antígenos Fy era maior em reticulócitos e, que aqueles com fenótipo Fy(a+b+), apresentaram maior nível de expressão da proteína Duffy, quando comparados aos de fenótipos Fy(a+b-) e Fy(a-b+).

Os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> são codificados por duas formas alélicas do gene *FY*, os alelos *FYA* e *FYB*, respectivamente. Diferem entre si por uma única substituição Gly → Asp no aminoácido 42 que, no gene corresponde a uma substituição G → A na posição 125<sup>34</sup>. Essa substituição de um aminoácido no domínio amino-terminal da proteína é suficiente para definir os dois antígenos antitéticos<sup>72,94,99</sup>. Com base nessa variação, é possível determinar os fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+)<sup>96</sup>. Wasniowska et al. (2004)<sup>100</sup>, utilizando-se de anticorpos monoclonais, mostraram que os antígenos Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup> possuem o sítio de maior imunogenicidade nos aminoácidos 37 e 47.

Os indivíduos, cujas hemácias não reagem com soros anti-Fy<sup>a</sup> e nem com anti-Fy<sup>b</sup>, são fenotipados como Duffy negativo [Fy(a-b-)], portanto, são homocigotos para o alelo *FY*, resultado de uma variante do alelo *FYB* (*FYB-33*) que apresenta uma mutação pontual em que a timina é trocada pela citosina, na região promotora do gene, no nucleotídeo -33, (-33T>C)<sup>95,96</sup>. Essa alteração promove uma interrupção no fator de transcrição eritróide GATA-1, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy<sup>b</sup> apenas no eritrócito, não interferindo na expressão dessa proteína em outros tecidos.

Conseqüentemente, esses indivíduos podem vir a desenvolver anti-Fy<sup>a</sup>, mas não anti-Fy<sup>b</sup> <sup>101</sup>. Nos estudos realizados por Castilho et al. (2004) <sup>102</sup>, foi detectada uma frequência de 12,5% da mutação -33T>C em doadores com ancestrais caucasianos. Observaram, também, a ocorrência simultânea das mutações -33T>C, 265C>T e 298G>A em 1,7% dos indivíduos estudados, bem como a ocorrência das mutações 265C>T e 298G>A em doadores de descendência africana. Esses dados diferem de outros relatos na literatura, que detectaram essas mutações em 2 a 5% da população caucasiana, mas não em negróides <sup>103-105</sup>.

Um outro antígeno Fy<sup>b</sup> que reage fracamente com soro anti-Fy<sup>b</sup> <sup>75</sup>, por isso foi denominado de Fy<sup>b</sup>*weak*, é resultado da mudança do aminoácido arginina pela cisteína na posição 89 da proteína, gerando uma baixa expressão da glicoproteína Duffy na superfície do eritrócito, o que pode resultar numa fenotipagem Duffy negativo <sup>76</sup>. Essa variação na proteína se deve a SNPs concomitantes nos nucleotídeos 265 e 298 do alelo *FYB*. Na posição 265 desse alelo há uma substituição da citosina pela timina (265C>T) e, no nucleotídeo 298, a guanina é substituída pela adenina (298G>A), essa última, resulta na troca do aminoácido alanina por treonina na posição 100 da proteína, que tem menor impacto sobre a estrutura da glicoproteína. Esses SNPs geram, então, um outro alelo, o *FY<sup>x</sup>* (*FYB<sup>wk</sup>*) e, conseqüentemente, o fenótipo Fy<sup>x</sup> (Fyb<sup>wk</sup>) <sup>104,106,107</sup>. A mutação 298G>A pode estar presente no alelo *FYB* ou *FYA* de indivíduos Fy(a-b+) e Fy(a+b+), e não está associada ao fenótipo Fy(a-b<sup>wk</sup>) <sup>103</sup>. A capacidade de ligação das hemácias Fy(a-b<sup>wk</sup>) ou (Fy<sup>x</sup>) aos anticorpos anti-Fy e quimiocinas mantém-se, ainda que em níveis reduzidos, sugerindo que a alteração estrutural da proteína seja relativamente sutil. Estudos realizados em diferentes grupamentos étnicos sugerem que a redução na

expressão da proteína pode ser por transcrição silenciosa em um dos alelos *FYB*, ou por alterações na transcrição e na estabilidade protéica<sup>105,106</sup>.

Um novo alelo foi identificado por Zimmerman et al. (1999)<sup>108</sup>, em Papua Nova Guiné, o qual é resultado de SNP no nucleotídeo -33 da região promotora do gene *FYA*, sendo então, denominado de *FYA<sup>null</sup>*, determinando o fenótipo Fy(a<sup>null</sup>b-) ou Fy(a<sup>null</sup>b+). Essa mutação abole a expressão da proteína Duffy nas hemácias de indivíduos portadores desse alelo. Como esperado, os indivíduos heterozigotos para o alelo *FYA<sup>null</sup>* apresentaram, aproximadamente, metade da expressão do antígeno Duffy<sup>108-110</sup>. Estudos realizados em vários grupamentos étnicos da Tailândia e Indonésia, mostraram alta frequência do alelo *FYA* (>0,9) e a presença de um novo fenótipo Fy(a<sup>wk</sup>b-). Interessante que, estes estudos mostraram que os indivíduos com de fenótipo Fy(a<sup>wk</sup>b-) apresentaram o genótipo *FYA/FYA*, enquanto que os indivíduos de fenótipo Fy(a-b-), tinham o genótipo *FYA/FYA* ou *FYA/FYB*<sup>111,112</sup>. Contudo, os mecanismos genéticos que causam esse fenótipo não foram ainda determinados.

Rios et al. (2000)<sup>113</sup> sequenciando o DNA de três indivíduos caucasóides que apresentavam o fenótipo Fy(a-b-), com elevado título de anti-Fy3, encontraram em um deles, o genótipo *FYA/FYA* sem as mutações 265C>T, 298G>A e -33T>C, porém uma mutação pontual 287G>A observada determinava a substituição de um único nucleotídeo, gerando um códon de parada (“stop” códon). Em outro, o genótipo determinado foi *FYB/FYB*, também sem as mutações 265C>T, 298G>A e -33T>C, mas no seqüenciamento do exon 2 do gene *FY* foi encontrada uma mutação 407G>A que causa um códon de parada prematuro no aminoácido da posição 136. No último, cujo genótipo era *FYA/FYA*, as mutações acima não foram percebidas, porém observou-se uma mutação 408G>A que, também promove um códon de término prematuro no

aminoácido 136. Os autores concluíram que essas mutações foram eventos espontâneos observados tanto no alelo *FYA* como no alelo *FYB*.

O antígeno Fy3 apresenta o epítipo conformacional localizado na terceira alça extracelular da glicoproteína Duffy e, por ensaios com anticorpos monoclonais, foi possível demonstrar que seus determinantes antigênicos localizam-se entre os aminoácidos 281 e 285. Os epítipos dos antígenos Fy4 e Fy5 foram definidos, mas seus respectivos anticorpos são raros e, por isso, a caracterização dos epítipos correspondentes se torna imprecisa<sup>100,114</sup>. O antígeno Fy6, reconhecido por anticorpos monoclonais IgG1 Kappa, foi mapeado na alça amino-terminal da proteína Duffy e mostraram que a região imunodominante do epítipo linear é o heptapeptídeo QLDFEDV na posição 19-15 da proteína. Esse antígeno está presente em todas as hemácias, com exceção das Fy(a-b-), assim como é relacionado com a susceptibilidade à invasão do *P. vivax*<sup>71,80</sup>.

Uma nova variante do alelo *FYB* foi detectada em doadores de sangue, não parentados, sendo um caucasiano e outro negro da região Sudeste do Brasil. Trata-se de um SNP que consiste na troca da guanina por tiamina na posição 145 (145G>T), associada aos SNPs dos nucleotídeos 265C>T e 298G>A, esse alelo foi denominado de *FYB*<sup>3</sup> (*FY<sup>x</sup>*). Esses indivíduos apresentavam, sorologicamente, o fenótipo Fy(a-b-) e o fenótipo determinado foi Fy(b+<sup>wk</sup>) ou (Fy<sup>x</sup>). Nesse estudo a mutação 298G>A foi encontrada, separadamente, em 7,5% dos indivíduos, enquanto que, nenhum doador apresentou a mutação 265C>T isoladamente<sup>102</sup>. A Tabela 1 sumariza o polimorfismo do sistema de grupo sanguíneo Duffy.



### 3.3.4 O sistema de grupo sanguíneo Duffy nas populações

A distribuição de determinantes antigênicos Duffy entre grupos étnicos é um aspecto característico desse sistema sanguíneo. Como exemplo, *FYA* é prevalente em europeus, chineses, japoneses e malasianos, mas é raro em grupamentos negróides africanos, contrariamente, *FYB* é mais abundante em populações caucasianas do que em asiáticos e negros africanos<sup>47,76</sup>. Por outro lado, indivíduos homozigotos para o alelo *FYB-33* (Duffy negativos) são extremamente raros fora de grupamentos étnicos negróides. A frequência deste fenótipo (Fy(a-b-)) em populações negras africanas varia de 88 a 100% e, nos Afro-americanos é de 68%<sup>70,115</sup>.

Estudos sobre a diversidade genética intra-étnica das cinco regiões geográficas brasileiras mostraram que há variações na origem e composição étnica dos três subgrupos (derivados europeus, africanos e miscigenados) nas diferentes regiões do país<sup>51</sup>. Vários autores ao compararem as frequências alélicas de *FY* dos distintos grupamentos étnicos, não observaram diferenças significantes, no entanto, há variações significantes na distribuição das composições fenotípicas e genotípicas<sup>50,102,116-118</sup>. Como exemplo, análises realizadas em vários grupamentos étnicos indígenas mostraram que os alelos *FYA* e *FYB* estão presentes, porém a frequência do alelo *FYA* é elevada<sup>119</sup>. Estudos de fenotipagem dos sistemas de grupos sanguíneos em 2.462 doadores de sangue, voluntários, de ambos os sexos, na cidade de São Paulo, determinaram que a frequência do fenótipo Fy(a+b-) em indivíduos caucasóides foi de 19,8%, enquanto que nos de etnia negróide foi de 14,0%. Quanto ao fenótipo Fy(a+b+), a frequência foi de 41,4% para os caucasóides e 1,6% para os negróides. O fenótipo Fy(a-b+) foi observado em 37,8% dos doadores caucasóides e em 17,5 nos negróides. Em caucasóides, a

freqüência de indivíduos Duffy negativo foi de 1,1%, enquanto que nos doadores negróides foi de 66,9%, sendo esse fenótipo considerado um marcador de grupamentos étnicos negróides<sup>120</sup>. Recentemente, um estudo de genotipagem, realizado na cidade de Campinas, estado de São Paulo, em doadores de sangue, mostrou que as freqüências dos fenótipos determinados foram as seguintes: 25,8% de Fy(a+b-); 28,3% de Fy(a-b+); 24,7% de Fy(a+b+) e 21,3% de Fy(a-b-). No entanto, as freqüências genótípicas foram diferentes, sendo distribuídas nas seguintes proporções: *FYA/FYA* (11,3%); *FYB/FYB* (29,9%); *FYA/FYB* (39,9%) e *FYB-33/FYB-33* (19,7%). Essas diferenças se devem a mutações encontradas no alelo *FYB* que acabam por determinar variações na expressão dos antígenos Fy<sup>b</sup><sup>102</sup>. Isso mostra que, no Brasil essa multiplicidade de freqüências fenótípicas e genótípicas ocorre, possivelmente, pela composição étnica durante a colonização, além dos grandes movimentos migratórios dentro do país, proporcionando uma alta taxa de miscigenação.

#### **4. Malária e os Sistemas de Grupos Sangüíneos ABO, MNSs e Duffy**

A associação entre grupos sangüíneos e algumas doenças tem sido relatada. O *P. falciparum*, que causa malária grave em humanos, requer uma ligação específica com o ácido siálico da neuraminidase sensitiva da glicoforina eritrocitária determinada pelo sistema sangüíneo MNS e, também, com prováveis receptores determinados pelo sistema ABO. O *P. vivax* interage com a glicoproteína Duffy do sistema sangüíneo Duffy, e os indivíduos Duffy negativos são resistentes à malária por esta espécie<sup>71,121,122</sup>. Essa seletividade do *P. vivax* não está na dependência única da proteína Duffy, mas provavelmente envolve, no mínimo, uma interação específica, adicional, necessária para direcionar a subpopulação de eritrócitos jovens circulantes, os quais

representam 1% da população de células vermelhas<sup>123</sup>. As informações relativas ao polimorfismo eritrocitário na população brasileira, resultante da investigação em doadores de sangue, estão bem estabelecidas para os sistemas ABO, RH, MNS e Duffy<sup>120</sup>. mas suas relações com doenças tropicais são raras e carecem de mais investigações, sobretudo, com a utilização de metodologias que possam elucidar os aspectos moleculares desses polimorfismos.

#### **4.1. Malária e Grupos sanguíneos ABO**

Cserti & Dzik (2007)<sup>124</sup> realizaram uma revisão criteriosa da literatura publicada nos últimos 28 anos, sobre a associação entre o sistema de grupos sanguíneos ABO e infecções por *Plasmodium falciparum*. Esses autores encontraram 22 estudos que exploraram a possível relação entre grupos sanguíneos ABO e malária por esse plasmódio; no entanto, não foi notada uma relação consistente. Os autores observam que a maioria dos estudos falhou em aspectos como o tamanho amostral, a ausência ou grupo controle inadequado, a deficiência de dados clínicos/laboratoriais sobre indivíduos infectados por *P. falciparum*, a presença de indivíduos com infecções assintomáticas ou com malária branda e, por último, a ausência ou inespecificidade da gravidade da doença. Como exemplo disso, podemos observar que estudos fenotípicos em uma população afro-descendente, na região central do Sudão<sup>125</sup>, não demonstraram correlação entre o ABO e a malária.

Por outro lado, outros trabalhos mostram associação significativa entre esse agente da malária e grupos sanguíneos ABO. No Brasil, Santos et al. (1983)<sup>126</sup> evidenciaram associação significativa entre o antígeno B e o número de episódios de malária em pacientes de Manaus. Apesar de os resultados pontuarem na mesma direção,

Beiguelman et al.(2003)<sup>127</sup> não foram capazes de confirmar essa observação, avaliando a frequência de indivíduos B e AB de uma população de área rural de Rondônia.

A análise do sistema ABO realizada por Montoya et al.(1994)<sup>121</sup>, em populações de diferentes grupos étnicos da Colômbia, infectados por *P. falciparum* e *P. vivax*, mostrou que o grupo “O” foi predominante, não envolvendo grande risco de infecção para qualquer uma dessas espécies, exceto em indivíduos negróides, cujo risco relativo de infecção por *P. vivax* foi de 4,25. Foi observado, também, risco relativo significativo nos indivíduos dos grupos “A” e “B”. Nas populações miscigenadas, pessoas do grupo sanguíneo B mostraram uma frequência menor para malária, especialmente por *P. vivax*.

No entanto, esses achados diferem dos relatos de Gupta & Choudhuri (1977) apud Montoya et al. 1994<sup>121</sup>, em populações da Índia. Esses autores observaram uma alta incidência de malária *vivax* em indivíduos do grupo sanguíneo B, enquanto que infecções por *P. vivax* foram menos frequentes em indivíduos do grupo A. Em outros estudos ficou demonstrada a influência dos polimorfismos dos grupos sanguíneos A e B na formação de rosetas<sup>128-132</sup> e, principalmente, o grupo sanguíneo A tem sido considerado como um fator de risco para o desenvolvimento de malária grave por *P. falciparum*<sup>122,133,134</sup>, enquanto que indivíduos do grupo O parecem ter uma vantagem protetora contra a severidade da doença, como já havia sido proposto por Hill (1992)<sup>135</sup>.

Os mecanismos dessa suscetibilidade permanecem incertos, no entanto, há associação entre a taxa de formação de rosetas e malária por *P. falciparum* e isso se reflete nas pessoas do grupo A, infectadas por essa espécie. Porém, outros mecanismos imunológicos podem estar envolvidos, como a habilidade de anticorpos do grupo A de reagirem com produtos antigênicos do parasito. Postula-se, no entanto, que pelo fato de a frequência dos alelos ser alta, há forte influência seletiva positiva para o grupo A em

relação ao efeito negativo da malária na população<sup>122</sup>. Estudos realizados por Barragan et al. (2000)<sup>136</sup> mostraram que os antígenos A e B atuam como co-receptores para a invasão do eritrócito pelo *P. falciparum* e determinantes para a formação de rosetas, sem, contudo, diferenciarem os antígenos A1 e A2. Isso representa mais um indício, não somente do papel biológico desempenhado pelos antígenos desse sistema, como, também, reforça a importância do polimorfismo fenotípico eritrocitário na relação parasita-hospedeiro. Essa demonstração parece falar a favor da pressão biológica à qual o hospedeiro é submetido em seu ambiente.

Recentemente, foi demonstrado que a distribuição dos grupos ABO foi estatisticamente diferente em síndrome de malária grave por *P. falciparum*<sup>137</sup>. Esses autores concluíram que indivíduos do grupo O tiveram menos malária grave quando comparados com os não-O e, também, que pacientes do grupo A tiveram três vezes mais malária grave do que os do grupo O. Em um estudo realizado com gestantes primíparas infectadas por *P. falciparum*, no Gâmbia/África<sup>138</sup>, determinou-se que os recém-nascidos de mães do grupo “O” tinham maior peso e comprimento, bem como as placentas mais pesadas e com menor carga parasitária quando se comparou com as mães dos grupos não O. Embora muitos estudos sobre a associação entre sistemas de grupos sanguíneos ABO e malária falciparum aparentam ser contraditórios, alguns outros mostraram resultados consistentes. Isso é uma indicação de que pesquisas mais complexas se fazem necessárias com o propósito de elucidar os mecanismos de susceptibilidade à malária por *P. falciparum*, relacionadas a esse sistema de grupo sanguíneo.

## 4.2. Malária e Sistema de grupo sanguíneo MNS

Associação entre a susceptibilidade à infecção por *P. falciparum* e glicoforinas A, B e C foi demonstrada previamente<sup>121,139,140</sup>. Os estudos realizados na Colômbia observaram que os grupos sanguíneos MN e Ss aparecem em diferentes proporções. Os indivíduos MN negativos (M-N-) infectados com baixa parasitemia pelo *Plasmodium*, mas em afro-descendentes a presença do antígeno M foi um fator de risco, tanto para infecções por *P. vivax* como para o *P. falciparum*. Em contrapartida, os indivíduos Ss negativos (S-s) eram menos infectados por parasitas da malária<sup>121</sup>, confirmando que ambas as glicoforinas (GPA e GPB) estão envolvidas na interação parasita/hospedeiro<sup>141</sup>. Em um estudo sobre a associação entre marcadores genéticos humanos e infecções maláricas, realizado na região ocidental da Amazônia brasileira, nenhuma associação pôde ser feita entre os nove fenótipos desse sistema de grupo sanguíneo, nem mesmo quando as reações com os anti-M, anti-N, anti-S e anti-s foram analisadas separadamente<sup>127</sup>, contrariando os resultados encontrados por Montoya et al. (1994)<sup>121</sup>. Recentemente, um estudo conduzido com pacientes com malária grave e não grave por *P. falciparum*, na Tailândia, mostrou que nem os genótipos, nem a frequência alélica apresentaram diferenças significantes entre esses grupos de pacientes. Os autores sugerem que os antígenos MNS não revelaram, nesse estudo, diferenças na susceptibilidade à malária cerebral<sup>142</sup>.

As variantes das glicoforinas podem ter um importante e/ou necessário papel funcional, como o de receptor para o *Plasmodium falciparum*, em que as formas polimórficas, possivelmente, podem interferir na ligação e posterior invasão do parasito<sup>143</sup>. Como exemplo, tanto a variante En(a-) quanto a U-negativo estão associadas à resistência à malária por essa espécie de *Plasmodium*, atribuindo-se às

glicoforinas A e B um importante papel na resistência à invasão desse parasito nos eritrócitos<sup>141</sup>.

### 4.3. Malária e Sistema de grupo sanguíneo Duffy

O sistema de grupos sanguíneos Duffy é utilizado há muito tempo como um importante marcador genético para avaliar as diferenças étnicas e o passado genético de populações. Neste contexto, esse sistema tem sido utilizado em estudos de associação com a malária, haja vista a quase absoluta inexistência do fenótipo Fy(a-b-) em áreas onde essa doença resulta da infecção pelo *Plasmodium vivax*<sup>35,70,115</sup>.

Miller et al. (1976)<sup>35</sup> demonstraram que os determinantes antigênicos Duffy são ligantes para o *Plasmodium vivax* e para o *P. knowlesi* durante o processo de invasão. Esses autores demonstraram que *FYA* e *FYB* predominam em populações caucasóides e asiáticas, mas em negróides originários da África Ocidental, o fenótipo Fy(a-b-) tende a ser predominante, estabelecendo uma correlação positiva entre indivíduos Duffy negativo, Fy(a-b-) e uma resistência às infecções por *P. vivax*<sup>35</sup>. O parasito *P. knowlesi* é capaz de invadir, ocasionalmente, hemácias humanas Duffy positivas, mas não de indivíduos Duffy negativos<sup>144</sup>.

Essa associação foi confirmada por estudos realizados no Gâmbia, oeste da África, mostrando que as infecções por *P. vivax* eram extremamente raras, relacionadas com a alta prevalência de Duffy negativo na população<sup>37</sup>. Spencer et al. (1978)<sup>145</sup> realizaram estudos semelhantes em populações de Honduras, corroborando com os achados anteriores. Como foi bem demonstrado, a ausência do antígeno Fy em muitos grupos étnicos Africanos e em seus descendentes, parece não exercer efeito deletério, porém confere resistência natural contra infecção por *P. vivax*<sup>32,71,76,96,146,147</sup>. Esses

resultados sugerem que o padrão da frequência desses alelos pode ser resultante de seleção natural de polimorfismo que confere resistência à malária por *P. vivax*<sup>139,147,148</sup>.

No Brasil, os dados relativos aos fenótipos eritrocitários são abundantes para a população indígena, em especial quanto aos sistemas ABO e RH<sup>120,149</sup>. Entretanto, as informações relativas aos polimorfismos eritrocitários associados à malária, na população brasileira, são escassas, indicando a necessidade de mais investigações. A frequência de variantes do sistema sanguíneo Duffy, em uma pequena amostra populacional da Amazônia brasileira exposta à malária, foi investigada por Colauto et al. (1981)<sup>150</sup>. A sorotipagem do antígeno Duffy na população de estudo mostrou predomínio de Fy<sup>a</sup> (64%), seguido de Fy<sup>b</sup> (25%) e, somente, 10% dos indivíduos tinham o fenótipo Fy(a-b-).

Nos estudos realizados por Cavasini et al. (2001)<sup>151</sup>, em uma população de pacientes com malária, de Porto Velho (Amazônia brasileira), utilizando-se de metodologia molecular, foi encontrada frequência fenotípica deduzida de 35% de Fy(a+b-); 39% de Fy(a-b+); 21% de Fy(a+b+) e 6% de Fy(a-b-). Posteriormente, foram investigados por Ferreira et al. (2002)<sup>152</sup>, utilizando-se de técnicas hematológicas padronizadas, os fenótipos do sistema sanguíneo Duffy de 181 pacientes maláricos de uma comunidade ribeirinha de Portuchuelo e de 924 indivíduos infectados da cidade de Monte Negro, ambas do Estado de Rondônia. As frequências dos alelos encontradas em Portuchuelo foram de *FYA*: 0,429; *FYB*: 0,370 e *FYB-33*: 0,201 e, em Monte Negro, de *FYA*: 0,351; *FYB*: 0,440 e *FYB-33*: 0,245. Os dados obtidos por Alves et al. (2002)<sup>153</sup>, reforçam os resultados anteriores de que há alterações nas frequências das variantes de Duffy em diferentes regiões da Amazônia brasileira. Quanto ao genótipo Duffy negativo (*FYB-33/FYB-33*), vários estudos mostraram que a frequência de indivíduos com esse

genótipo, entre os não maláricos, é baixa, mostrando que a taxa de pessoas que não contraem malária por *P. vivax* na Amazônia brasileira pode variar de zero a 12%<sup>151,152,154,155</sup>.

Assim, além dos diferentes níveis de expressão, a conformação peculiar dos antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> pode determinar diferenças na aptidão à infecção e uma das possíveis conseqüências da susceptibilidade diferencial à malária *vivax* resultante seria a modificação das freqüências alélicas de *FYA* e *FYB* nas populações expostas ao *P. vivax*, espécie mais prevalente na Amazônia brasileira. Estudos recentes realizados por Souza et al., (2007)<sup>155</sup>, em amostras de indivíduos infectados por *P. falciparum*, quando comparados aos infectados por *P. vivax*, de áreas da Amazônia brasileira, mostraram que a freqüência do alelo com a mutação GATA de *FY* (*FYB-33*) foi maior em doadores do que em pacientes maláricos, sugerindo que há uma redução na taxa de infecção nos portadores deste alelo.

Como foi demonstrado, por estudos anteriores, há correlação entre os diferentes fenótipos e genótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy com a ligação e posterior invasão de eritrócitos por *P. vivax*<sup>98,105,108-110,156</sup>. Esses resultados sugerem que o padrão da freqüência desses alelos pode ser resultante de seleção natural, e que o polimorfismo pode modificar a estrutura ou o nível de expressão dos antígenos Duffy, alterando a eficiência da invasão podendo, assim, modular a suscetibilidade à malária por *P. vivax*<sup>147,148,157</sup>. Assim, na Amazônia brasileira, onde o *P. vivax* predomina, a freqüência acima do esperado do alelo *FYB-33*, dada à composição étnica populacional, tanto em heterozigose como em homozigose pode, ao longo do tempo, direcionar para o aumento do número de indivíduos Duffy negativos na população e, como conseqüência, ocorrer diminuição na taxa de infecção por *P. vivax* nessa região.

## 5. Justificativa

É relevante ressaltar que, nas décadas de 80 e 90, grandes avanços foram alcançados na luta contra a malária, doença que está praticamente restrita à região Amazônica. No entanto, na Amazônia brasileira, a taxa da incidência dessa parasitose, nos últimos anos, tem-se elevado, e isto, sem considerar as sub-notificações, visto que o atendimento freqüentemente não está sob a responsabilidade de um profissional capacitado na área de saúde<sup>158,159</sup>. Segundo avaliação do programa nacional de controle da malária, em 2006, o número de casos da doença foi de 540 mil<sup>160</sup>. A consequência desse fato para as regiões extra amazônica é preocupante, particularmente nas áreas que as modificações ambientais e sócio-econômicas, associadas ao processo desordenado de urbanização tornaram vulneráveis à formação de novos focos ou à reativação daqueles com transmissão interrompida. Deve-se atentar para o fato de que essa fragilidade no processo de vigilância e controle da malária dentro da Amazônia pode levar a disseminação da doença novamente para as outras áreas do país, como observado na década de 80<sup>161</sup>.

A migração humana é uma realidade entre as diferentes regiões do país, e a pouca habilidade no manejo clínico dos diversos profissionais da área de saúde, bem como a falta de locais disponíveis para o diagnóstico em áreas não endêmicas, se constitui em um sério agravante para a saúde pública nessas regiões. Associado a esses aspectos sociais está o surgimento da resistência a fármacos pelo *P. falciparum* na década de 60<sup>162</sup>, o que começa a ser observado também com o *P. vivax* nos últimos anos<sup>163,164</sup>, bem como o fato de os estudos para o desenvolvimento de vacinas não terem

apresentado ainda resultados promissores<sup>165,166</sup>. Isso tem sido motivo de grande preocupação na epidemiologia da malária.

É preciso considerar também que estudos mostraram indivíduos infectados por diferentes espécies de *Plasmodium*<sup>167-169</sup>. Além disso, foi observado que em um mesmo paciente, freqüentemente, coexistem diversas variantes geneticamente distintas de cada espécie de plasmódio<sup>170-172</sup>. Essas variantes podem diferir entre si, por exemplo, quanto à sua constituição antigênica, sua virulência ou seu perfil de resistência a antimaláricos. Em um trabalho de revisão, Souza-Neiras et al. (2007)<sup>173</sup>, destacam a grande diversidade genética do *P. vivax* que resulta em polimorfismos das diferentes proteínas ligantes.

Como exemplos, há os estudos de Souza et al. (2006)<sup>174</sup>, que encontraram vários polimorfismos das DBPs em isolados do Brasil, porém sem estar envolvidos diretamente com a invasão eritrocitária, mas com habilidade para conferir resistência aos anticorpos inibitórios a essa invasão. E, mais recentemente, Ferreira et al. (2007)<sup>175</sup>, num estudo de microssatélites de *P. vivax*, em pacientes de uma área rural da Amazônia brasileira, no Estado do Acre, mostraram que há extensa diversidade genética deste parasito e que infecções de múltiplos clones são freqüentes. Assim, a diversidade genética do *P. vivax* pode resultar em polimorfismos das DBPs, o que poderá modular a competência do parasito em aderir e invadir o eritrócito.

Embora a associação entre o fenótipo Duffy negativo e a resistência à infecção por *P. vivax* seja muito estudada, relatos recentes demonstram a infecção de indivíduos Duffy negativos pelo *P. vivax*<sup>36</sup> e associações contraditórias têm sido observadas sobre as relações entre os sistemas ABO e MNS e a malária na Amazônia brasileira<sup>126,127</sup>.

## 6. Objetivos

Este estudo foi realizado em habitantes maláricos e não maláricos de regiões endêmicas da Amazônia brasileira, e teve como objetivos:

- I- verificar os fenótipos dos grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy em indivíduos com e sem malária;
- II- analisar variantes genéticas do sistema de grupo sanguíneo Duffy em indivíduos doadores de sangue e pacientes infectados por *Plasmodium vivax*.
- III - avaliar a associação entre distribuição dos polimorfismos genéticos do grupo sanguíneo Duffy e modulação de suscetibilidade à malária.

## RESULTADOS

Os resultados encontram-se descritos em artigos publicados e/ou submetidos à publicação em revistas indexadas, bem como resumos apresentados em congressos. O primeiro e terceiro artigos estão relacionados aos objetivos específicos propostos. O segundo é resultado de um dos objetivos específicos, além de um achado inédito no Brasil. O quarto artigo refere-se à metodologia aplicada para melhor caracterizar o grupo controle (amostras de doadores de sangue).

### Artigos

1. **Carlos Eugênio Cavasini**, Luiz Carlos de Mattos, Renata Tomé Alves, Álvaro Augusto Couto, Vanja Sueli Pachiano Calvosa, Cláudia Regina Bonini Domingos, Lílian Castilho, Andréa Regina Baptista Rossit, Ricardo Luiz Dantas Machado. **Frequencies of ABO, MNS, and Duffy Phenotypes among Blood Donors and Malaria Patients from Four Brazilian Amazon Áreas.** Hum Biol 2006, 78:215-219.
2. **Carlos Eugênio Cavasini**, Luiz Carlos de Mattos, Álvaro Augusto D'Almeida Couto, Cláudia Regina Bonini Domingos, Sócrates Herrera Valencia, Wanessa Christina de Souza Neiras, Renata Tomé Alves, Andréa Regina Baptista Rossit, Lílian Castilho, Ricardo Luiz Dantas Machado. ***Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from Brazilian Amazon region: na exception?** Trans R Soc Trop Med Hyg 2007 – in press.

3. **Carlos Eugênio Cavasini**, Luiz Carlos de Mattos, Álvaro Augusto Ribeiro D'Almeida Couto, Vanja Suely Calvosa D'Almeida Couto, Yuri Gollino, Laurence Jorge Moretti, Cláudia Regina Bonini Domingos, Andréa Regina Baptista Rossit, Lílian Castilho, Ricardo Luiz Dantas Machado. **Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region.** Malaria Journal 2007 – submetido.
  
4. Érika FUGIKAHA, Patrícia Aparecida FORNAZARI, Roberta de Souza Rodrigues PENHALBEL, Alexandre LORENZETTI, Roberdo Duarte MAROSO, Juvanete Távora AMORAS, Ana Sueli SARAIVA, Cláudia Regina BONINI-DOMINGOS, Luiz Carlos de MATTOS, Andrea Regina Baptista ROSSIT, **Carlos Eugênio CAVASINI**, Ricardo Luiz Dantas MACHADO. **Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region.** Rev Inst Med Trop S Paulo 2007; 49(1); 1-4.

#### **Resumos apresentados em congressos**

1. **Cavasini, Carlos E.**, Alves, Renata T., Mattos, Luiz C., Couto, Álvaro A., Maroso, Roberto D., Bonini-Domingos, Cláudia R., Machado, Ricardo LD. **Freqüência fenotípica dos grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy em doadores de sangue e pacientes maláricos de duas áreas endêmicas da Amazônia brasileira: Resultados preliminares.** Rev Soc Brás Med Trop 2004;

37(supl 1): p.51. – Trabalho apresentado no XL Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Aracajú – Sergipe.

2. **Carlos E. Cavasini**; Luiz C. de Mattos; Renata T. Alves; Kátia V. Tiso; Álvaro A. Couto; Vanja Sueli P. Calvosa; Cláudia R. Bonini Domingos; Juvanete A. Távora; Ana Sueli Saraiva; Rita Uchôa; Amália Silva; Andréa R. B. Rossit, Ricardo L. D. Machado. **Grupos sanguíneos e sua associação com infecções maláricas na Amazônia brasileira**. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38(supl 1): p. 492 - Trabalho apresentado no XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Florianópolis – Santa Catarina.

3. **C.E. Cavasini**, L.C. de Mattos, R. T. Alves, A. A. Almeida Couto, V. S. C. Almeida Couto, C. R. Bonini-Domingos, L. Castilho, R. Maroso, A. R. B. Rossit, R. L. D. Machado. **Correlation of the Three Blood Group Phenotypes Frequencies and Malaria Patients from Brazilian Amazon Region**. Int J Infect Dis 2006; 10(supl 1): p. S300 – Trabalho apresentado no 12<sup>th</sup> International Congress of Infection Diseases, Lisboa – Portugal.

4. **Cavasini C. E**; Gollino, Y; Moretti L, J; Couto A, A, A; Tapparo, A, F; Rossit A, R, B; Mattos L, C; Machado R, L, D. **Caracterização dos polimorfismos do gene do sistema sanguíneo duffy de pacientes com malária por *Plasmodium vivax* e de doadores de sangue da Amazônia brasileira**. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(supl 1) p. 151 - Trabalho apresentado no XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campos de Jordão – São Paulo.

---

### **Brief Communications**

#### ***Frequencies of ABO, MNSS, and Duffy Phenotypes Among Blood Donors and Malaria Patients from Four Brazilian Amazon Areas***

CARLOS EUGÊNIO CAVASINI,<sup>1</sup> LUIZ CARLOS DE MATTOS,<sup>2</sup> RENATA TOMÉ ALVES,<sup>1</sup> ÁLVARO AUGUSTO COUTO,<sup>3</sup> VANJA SUELI PACHIANO CALVOSA,<sup>3</sup> CLÁUDIA REGINA BONINI DOMINGOS,<sup>4</sup> LILIAN CASTILHO,<sup>5</sup> ANDRÉA REGINA BAPTISTA ROSSIT,<sup>1,6</sup> AND RICARDO LUIZ DANTAS MACHADO<sup>1,6</sup>

**Abstract** We compared the serological phenotypic frequencies of *ABO*, *MNSS*, and Duffy in 417 blood donors and 309 malaria patients from four Brazilian Amazon areas. Our results suggest no correlation between *ABO* phenotype and malaria infection in all areas studied. We observed significant correlation between the S+s+, S+s-, and S-s+ phenotypes and malaria infection in three areas. Some of the Duffy phenotypes showed significant correlation between donors and malaria patients in different areas. These data are an additional contribution to the establishment of differential host susceptibility to malaria.

A large proportion of all malaria cases in South America occurs in the Brazilian Amazon region, where the incidence increased greatly between the 1970s and the early 1990s, with approximately 500,000 cases reported annually. Of the four known human malaria parasites, only *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* have been detected in Brazil. Invasion of red blood cells (RBCs) occurs when the extracellular form of the parasite, the merozoite, attaches to the surface of an uninfected RBC. This rapid process includes phases of recognition and attachment followed by reorientation and entry (Bannister and Mitchell 2003). Malaria parasites specifically invade certain species and types of RBCs. The demonstrated specificity of malaria parasites for RBCs of particular species and

<sup>1</sup>Center for Microorganisms Investigation, Department of Dermatological, Infectious, and Parasitological Diseases, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima 5416, São José do Rio Preto 15090-000, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Imunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Amapá State Health General Office, Amapá, Amapá State, Brazil.

<sup>4</sup>Hemoglobin Diseases Laboratory, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>5</sup>Blood Bank, Campinas University, São Paulo, Brazil.

<sup>6</sup>Faculty of Medicine, São José do Rio Preto Foundation, São Paulo, Brazil.

*Human Biology*, April 2006, v. 78, no. 2, pp. 215–219.

Copyright © 2006 Wayne State University Press, Detroit, Michigan 48201-1309

KEY WORDS: MALARIA, BLOOD GROUPS, *ABO*, *MNSS*, DUFFY, BRAZILIAN AMAZON REGION.

216 / CAVASINI ET AL.

ages appears to depend on a number of ligand-receptor interactions, some of which have been recently defined. RBC receptors related to the invasion process include the *ABO* system, *MNSs* (glycophorins A and B), and the Duffy blood group antigen (Daniels 1997). The present study describes the *ABO*, *MNSs*, and Duffy phenotype frequencies among blood donors and malaria patients from four malaria-endemic regions of the Brazilian Amazon.

## Materials and Methods

To be included in the study, the malaria patients ( $n = 409$ ) had to meet the following criteria: They were seeking medical assistance because of clinical malaria symptoms, were older than 18 years old, and had thick blood exam positive results. The control group consisted of blood donors ( $n = 417$ ), and, according to the Brazilian blood bank policy, they filled the following criteria: They were older than 18 years old, of either sex, belonged to any blood group, were asymptomatic for malaria clinical signs, had thick blood film exam negative results, had a place of birth in the studied area, and showed no signs of malaria during early interview. The control subjects were matched to the patients with respect to age ( $\pm 5$  years), sex, and ethnicity. All the control subjects were genetically independent.

The study subjects came from the following four areas of the Brazilian Amazon: Macapá, Amapá State; Belém, Pará State; Porto Velho, Rondônia State; and Rio Branco, Acre State.

A blood sample was collected from both the patients and the control subjects after informed consent. The *ABO* phenotypes were classified using a hemagglutination standard test. *MNSs* and Duffy ( $Fy^a$  and  $Fy^b$  antigens) were phenotyped using a microtyping kit (DiaMed-ID Microtyping System, DiaMed AG, Morat, Switzerland). To assess the significance of the variables and to obtain independence among the proportions, we used Fisher's exact test.

The mean ages of patients and control subjects were 29 years ( $\pm 14$  SD) and 28 years ( $\pm 8$  SD), respectively. All the studied groups showed no statistically significant difference in mean ages or ethnicity, indicating a well-matched population. The same results were obtained when we compared both groups in each area.

## Results and Discussion

Our results showed similar frequencies of *ABO* phenotypes between blood donors and malaria patients. Regarding the *MNSs* system, we observed higher frequencies of the  $S+s+$  phenotype among *P. falciparum* malaria patients from Belém and Rio Branco, higher frequencies of the  $S-s+$  phenotype in blood donors from Belém, Porto Velho, and Rio Branco, and higher frequencies of the  $S+s-$  phenotype in blood donors from Belém ( $p < 0.05$ ). However, there was

*ABO, MNSs, and FY Phenotypes in Brazil / 217*

no significant association when both S phenotypes were taken into account in Macapá.

The Duffy phenotype analysis showed a higher frequency of the FY A<sup>-</sup>,B<sup>+</sup> phenotype in donors from Macapá, whereas the FY A<sup>+</sup>,B<sup>+</sup> phenotype was more frequent in *P. vivax* malaria patients from the same region and from Belém and Macapá. These findings were significant between both groups ( $p < 0.05$ ). On the other hand, we observed a significant frequency of the FY A<sup>-</sup>,B<sup>-</sup> phenotype in blood donors from Belém ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

The results presented in this study on *ABO* phenotypes are in accordance with previous reports, because they also showed no association between this blood group system and malaria infection in the Brazilian population from another Amazonian area (Beiguelman et al. 2003) and also in the Amazonian Colombian population (Montoya et al. 1994). Although the A antigen has been implicated as a coreceptor for *P. falciparum*, the effect of *ABO* phenotype on the susceptibility to malaria infection does not seem to be important (Barragan et al. 2000).

Montoya et al. (1994) observed in Colombia that the *MNSs* system seems to confer resistance to malaria infection. Interestingly, we also observed that the S<sup>-</sup>s<sup>+</sup> phenotype in Rio Branco and Porto Velho had a higher frequency among blood donors, and it is possible that this phenotype can contribute to resistance to *P. falciparum* malaria. Beiguelman et al. (2003) suggested no association between MN and Ss phenotypes and malaria infection in the rural area of Rondônia State. This may imply that this population is distinct from other populations investigated in this study.

The higher frequency of the FY A<sup>+</sup>,B<sup>+</sup> phenotype among blood donors also suggests protection against *P. vivax* malaria infection, whereas individuals with the *FY* alleles in heterozygosis (FY A<sup>+</sup>,B<sup>+</sup>) can be more susceptible. We also observed that FY A<sup>-</sup>,B<sup>-</sup> individuals were less infected by *P. vivax*, according to a previous study of malaria patients in the Western Brazilian Amazon (Rondônia State) (Cavasini et al. 2001).

To our knowledge, this study is the first evaluation of the frequencies of three important blood group phenotypes in malaria patients from four different locations in the Brazilian Amazon region. This study represents an additional contribution to the establishment of differential host susceptibility to malaria, an important public health issue. However, a limitation we acknowledge is related to the fact that, by using blood group phenotyping, we were not able to assess molecular changes, because alterations such as gene promoter disruption or deletion can abolish or reduce antigen expression (Tournamille et al. 1995; Michon et al. 2001; Storry et al. 2001). Therefore we believe that by conducting a genotyping study, we will be able to explore other aspects, such as disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter that can be related to the significant associations between blood group variants and susceptibility or resistance to malaria. Molecular investigations are being conducted in our laboratory to clarify the role of such variants in this group of patients.

218 / CAVASINI ET AL.

**Table 1.** Frequencies of ABO, MNSS, and Duffy Phenotypes Among Blood Donors and Patients Infected with *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in the Brazilian Amazon (Samples Collected in 2003–2005)

Blood Group System	Belém			Macapá			Porto Velho			Rio Branco		
	Patients (100)			Patients (108)			Patients (117)			Patients (84)		
	Donors (100)	Pv (85)	Pf (15)	Donors (117)	Pv (64)	Pf (44)	Donors (100)	Pv (83)	Pf (34)	Donors (100)	Pv (56)	Pf (28)
<b>ABO</b>												
A	19.0	25.0	2.0	27.0	17.0	10.0	19.0	22.0	9.0	33.0	15.0	4.0
B	14.0	11.0	4.0	11.0	9.0	6.0	14.0	7.0	3.0	12.0	4.0	3.0
AB	3.0	4.0	–	7.0	–	–	3.0	5.0	2.0	1.0	4.0	–
O	64.0	45.0	9.0	72.0	38.0	28.0	64.0	49.0	20.0	54.0	33.0	21.0
<b>MNSS</b>												
M+N+S+s+	18.0	22.0	7.0 <sup>b</sup>	25.0	18.0	12.0	23.0	15.0	7.0	23.0	11.0	4.0
M+N+S+s–	1.0	2.0	–	5.0	1.0	1.0	2.0	6.0	1.0	2.0	–	–
M+N+S–s+	24.0	17.0	3.0	25.0	11.0	11.0	31.0 <sup>a</sup>	13.0	7.0	31.0	10.0	7.0
M+N–S+s+	12.0	16.0	2.0	24.0	16.0	6.0	9.0	16.0	6.0	9.0	15.0	9.0 <sup>b</sup>
M+N–S+s–	7.0*	1.0	–	4.0	–	1.0	1.0	4.0	3.0	1.0	2.0	1.0
M+N–S–s+	10.0	11.0	–	8.0	6.0	2.0	13.0	17.0	5.0	13.0	11.0	3.0
M–N+S+s+	12.0	10.0	1.0	11.0	5.0	4.0	3.0	4.0	4.0	3.0	3.0	2.0
M–N+S+s–	–	1.0	–	–	–	2.0	–	–	–	–	–	–
M–N+S–s+	16.0 <sup>a</sup>	5.0	2.0	15.0	5.0	9.0	18.0 <sup>a</sup>	8.0	1.0	18.0 <sup>b</sup>	4.0	2.0
<b>Duffy</b>												
FY A+,B–	32.0	25.0	5.0	37.0	18.0	13.0	26.0	25.0	10.0	26.0	13.0	4.0
FY A–,B+	33.0	25.0	9.0	44.0 <sup>a</sup>	15.0	7.0	34.0	25.0	12.0	34.0	17.0	7.0
FY A+,B+	27.0	35.0 <sup>b</sup>	1.0	28.0	30.0 <sup>b</sup>	23.0	37.0	32.0	11.0	37.0	26.0	17.0
FY A–,B–	8.0 <sup>a</sup>	–	–	8.0	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	3.0	–	–

To obtain the independence among the proportions, we applied Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

Pv = *Plasmodium vivax*.

Pf = *Plasmodium falciparum*.

a.  $p < 0.05$  in donors.

b.  $p < 0.05$  in patients

*ABO, MNSs, and FY Phenotypes in Brazil / 219*

**Acknowledgments** We extend our thanks to all individuals enrolled in this study and to the blood bank managing directors: Juvanete Amoras in Macapá, Rita Uchôa in Rio Branco, Ana Sueli Saraiva in Belém, and Amália Silva in Porto Velho. We also thank Roberto Maroso for help with the collection of the blood donor samples. Financial support was provided by FAPESP (through grant 02/9546-1), CNPq (grant 302353/2003-8), and DIAMED-ID SA. C. E. Cavasini is a Ph.D. student at the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. The protocol for this study was reviewed and approved by the Research Board of the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

*Received 17 December 2004; revision received 20 December 2005.*

**Literature Cited**

- Bannister, L., and G. Mitchell. 2003. The ins, outs, and roundabouts of malaria. *Tr. Parasitol.* 19(5):209–213.
- Barragan, A., G. K. Peter, W. Mats et al. 2000. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect. Immun.* 68(5):2971–2975.
- Beiguelman, B., P. F. Alves, M. M. Moura et al. 2003. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian western Amazonian region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(4):455–460.
- Cavasini, C. E., F. J. T. Pereira, W. L. Ribeiro et al. 2001. Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(6):591–595.
- Daniels, G. 1997. Blood group polymorphisms: Molecular approach and biological significance. *Transfus. Clin. Biol.* 4:383–390.
- Michon, P., I. Woolley, E. M. Wood et al. 2001. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett.* 495:111–114.
- Montoya, F., M. Restrepo, A. E. Montoya et al. 1994. Blood groups and malaria. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 36:33–38.
- Story, J. R., M. E. Reid, S. MacLennan et al. 2001. The low-incidence MNS antigens MV, sD, and Mit arise from single amino acid substitutions on GPB. *Transfusion* 41:269–275.
- Tournamille, C., Y. Colin, J. P. Cartron et al. 1995. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat. Genet.* 10:224–228.



## COPYRIGHT INFORMATION

TITLE: Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy Phenotypes  
Among Blood Donors and M  
SOURCE: Human Biology 78 no2 Ap 2006  
PAGE(S): 215-19  
WN: 0609102944008

The magazine publisher is the copyright holder of this article and it is reproduced with permission. Further reproduction of this article in violation of the copyright is prohibited. To contact the publisher: <http://wsupress.wayne.edu/>

Copyright 1982-2006 The H.W. Wilson Company. All rights reserved.

#Model  
TRSTMH-645; No. of Pages 3

ARTICLE IN PRESS

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (2007) xxx, xxx–xxx



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/trst



SHORT COMMUNICATION

## *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception?

Carlos Eugênio Cavasini<sup>a,\*</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>a</sup>,  
Álvaro Augusto D'Almeida Couto<sup>b</sup>, Cláudia Regina Bonini-Domingos<sup>c</sup>,  
Socrates Herrera Valencia<sup>d</sup>, Wanessa Christina de Souza Neiras<sup>a</sup>,  
Renata Tomé Alves<sup>a</sup>, Andréa Regina Baptista Rossit<sup>a</sup>, Lilian Castilho<sup>e</sup>,  
Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medicine from São José do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil

<sup>b</sup> SEAMA Faculty, Av. Nações Unidas, 1201, 68908-170 Macapá, Amapá State, Brazil

<sup>c</sup> Hemoglobin Diseases Laboratory, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil

<sup>d</sup> Malaria Vaccine and Drug Development Center, Universidad del Valle, Cra 35, 4A-53, 25573, Cali, Colômbia

<sup>e</sup> Blood Bank, Campinas University, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Rua Carlos Chagas, 480, Barão Geraldo 13083-878, Campinas, São Paulo State, Brazil

Received 19 December 2006; received in revised form 5 April 2007; accepted 5 April 2007

### KEYWORDS

Vivax malaria;  
*Plasmodium vivax*;  
Duffy blood group;  
Duffy antigen binding protein;  
Protozoan proteins;  
Brazil

**Summary** We present evidence for *Plasmodium vivax* infection among Duffy blood group-negative inhabitants of Brazil. The *P. vivax* identification was determined by both genotypic and non-genotypic screening tests. The Duffy blood group was genotyped by PCR/RFLP and phenotyped using a microtyping kit. We detected two homozygous FY\*B-33 carriers infected by *P. vivax*, whose circumsporozoite protein genotypes were VK210 and/or *P. vivax*-like. Additional efforts are necessary in order to clarify the evidence that *P. vivax* is being transmitted among Duffy blood group-negative patients from the Brazilian Amazon region.

© 2007 Published by Elsevier Ltd on behalf of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

### 1. Introduction

Of the four human malaria parasites, only *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* have been detected in Brazil, with 99.7% of cases occurring in the Amazon region.

\* Corresponding author. Tel.: +55 17 32105736;  
fax: +55 17 32105736.  
E-mail address: cecavasini@famerp.br (C.E. Cavasini).

For the past 7 years, *P. vivax* has been the most common cause of human malaria in the Brazilian Amazon region. Its variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) are mainly found in mixed infections, but VK210 has also been described as a single infection (Machado and Póvoa, 2000). *Plasmodium vivax* merozoites use the Duffy blood group antigen as a receptor to invade human erythrocytes (Miller et al., 1976). However, a recent report suggests evidence for transmission of *P. vivax* among Duffy blood group-negative patients in Africa (Ryan et al., 2006). We report here two *P. vivax* human malaria cases in Duffy-negative individuals living in a Brazilian endemic area.

## 2. Materials and methods

In a study which is being conducted currently in the Center for Microorganisms Investigation, Faculty of Medicine from São José do Rio Preto, SP, Brazil to determine the Duffy blood group genotypic frequencies among *P. vivax* malaria patients from the Brazilian Amazon region, DNA has been extracted from total blood using the phenol-chloroform method, and a semi-nested PCR performed using *P. vivax*-specific small-subunit (SSU) rDNA primers (Kimura et al., 1997). The *P. vivax* circumsporozoite protein (CSP) variants were determined by spotting blood samples on glass fiber membranes and testing by PCR/ELISA (Machado and Póvoa, 2000). The *P. vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP1) (200L fragment) antigen was evaluated by an ELISA protocol according to Herrera et al. (1997). The Duffy antigens (Fy<sup>a</sup> and Fy<sup>b</sup>) were genotyped by PCR/RFLP and phenotyped using a microtyping kit (DiaMed-ID Micro-typing System, DiaMed AG, Cressier sur Morat, Switzerland), as described previously (Castilho et al., 2004). All patients studied were classified as a unique admixed ethnic group (African American, Caucasian and/or Amerindian descendents).

## 3. Results

Two samples from Porto Velho, Rondônia State, were phenotyped as Fy (a-b-) and genotyped as FY\*B-33/FY\*B-33 (Duffy-negative homozygous). The molecular results confirmed the *P. vivax* thick blood film diagnosis, and also showed the presence of VK210 plus *P. vivax*-like genotypes in one individual (mixed infection) and for the other the result was VK210. Antibody PvMSP1 (200L fragment) responses were present in both patients.

## 4. Discussion

Duffy-negative individuals seem to be naturally resistant to invasion by the *P. vivax* human malaria parasite (Miller et al., 1976). To our knowledge, this is the first indication of *P. vivax* infection in two Duffy-negative individuals living in the Brazilian Amazon region. The identification of *P. vivax* was made by thick blood film, amplification of *P. vivax*-specific SSU rDNA and CSP genes from sporozoites, and Fy-negative individuals also showed antibody responses against PvMSP1 (200L fragment), so it is unlikely that any parasite other than *P. vivax* was involved. As described previously (Ryan et

al., 2006), we also believe that *P. vivax* could be evolving to use receptors others than Duffy for junction formation during invasion. If this proves to be the case, we could hypothesize that the same merozoite adaptations occurred as isolated events in two geographically separated countries/continents (Kenya/Africa and Brazil/South America). As for the CSP variant analysis our results seems to contradict the possibility described by Ryan et al. (2006) that the VK247 CSP variant marks a *P. vivax* population capable of using receptors other than Duffy, since both of our study Duffy-negative *P. vivax* infected individuals were VK247-negative.

In conclusion, our findings point to the need for additional epidemiological studies of vivax malaria in the Brazilian Amazon region as well as in other endemic areas around the world. Additional efforts are necessary in order to clarify the evidence that *P. vivax* is being transmitted among Duffy blood group-negative inhabitants of the Brazilian Amazon region. Finally, the need to investigate the existence of alternative receptors is reinforced by our findings.

**Authors' contributions:** RLDM and ARBR conceived and participated in all aspects of the study and manuscript preparation; CEC carried out all the phenotype and genotype assays; AADC, CEC and WCSN collected samples from *P. vivax* malaria patients; SHV participated in the serological evaluation; WCSN and RTA participated in the SSU rDNA and CSP genes analysis; LCM, CRBD and LC participated in the design of the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. CEC is guarantor of the paper.

**Acknowledgements:** We thank the population enrolled in this study, and Aline Barroso, Maria Cristina Figueredo and Mauro Tada for help in field work. We thank Professor Luiz Hildebrando Pereira da Silva for facilities at CEPEM.

**Funding:** FAPESP (02/0546-1) and CNPq (302353/03-8).

**Conflicts of interest:** None declared.

**Ethical approval:** Research Board of the Faculty of Medicine from São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil.

## References

- Castilho, L., Rios, M., Pellegrino Jr, J., Saad, S.T.O., Costa, F.F., Reid, M.R., 2004. A novel Fy allele in Brazilians. *Vox Sang.* 87, 190–195.
- Herrera, S., De Plata, C., Gonzales, M., Perlaza, B.L., Bettens, F., Corradin, G., Arevato-Herrera, M., 1997. Antigenicity and Immunogenicity of multiple antigen peptides (MAP) containing *P. vivax* CS epitopes in *Aotus* monkeys. *Parasite Immunol.* 73, 161–170.
- Kimura, M., Kneko, O., Liu, Q., Zhou, M., Kawamoto, F., Wataya, Y., Otani, S., Yamaguchi, Y., Tanaka, K., 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol. Intern.* 46, 91–95.
- Machado, R.L.D., Póvoa, M.M., 2000. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *Plasmodium vivax*-like) in the

Please cite this article in press as: Cavasini, C.E. et al., *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception?, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (2007), doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.011

+Model

TRSTMH-645; No. of Pages 3

## ARTICLE IN PRESS

Vivax malaria in Duffy-negative individuals from Brazil

3

- three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 377–381.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., McGinns, M.H., 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: Duffy blood group genotype, FyFy. *N. Engl. J. Med.* 295, 302.
- Ryan, J.R., Stoute, J.A., Amon, J., Duntons, R.F., Mtalib, R., Koros, J., Owour, B., Luckhart, S., Wirtz, R.A., Barnwell, J.W., Rosenberg, R., 2006. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 581–775.

Please cite this article in press as: Cavasini, C.E. et al., *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception?, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (2007), doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.011

**Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region**

CARLOS EUGÊNIO CAVASINI<sup>1</sup>, LUIZ CARLOS DE MATTOS<sup>2</sup>, ÁLVARO AUGUSTO RIBEIRO D'ALMEIDA COUTO<sup>3</sup>, VANJA SUELY CALVOSA D'ALMEIDA COUTO<sup>4</sup>, YURI GOLLINO<sup>1</sup>, LAURENCE JORGE MORETTI<sup>1</sup>, CLÁUDIA REGINA BONINI DOMINGOS<sup>5</sup>, ANDRÉA REGINA BAPTISTA ROSSIT<sup>1</sup>, LILIAN CASTILHO<sup>6</sup>, RICARDO LUIZ DANTAS MACHADO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Microorganisms Investigation, Department of Dermatological, Infectious and Parasitical Diseases, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. <sup>2</sup>Imunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine from São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. <sup>3</sup>SEAMA Faculty, Macapá, Amapá State, Brazil. <sup>4</sup>Evandro Chagas Institute, Malaria Program, Belém, Pará State, Brazil. <sup>5</sup>Hemoglobin Diseases Laboratory, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. <sup>6</sup>Blood Bank, Campinas University, Campinas, São Paulo State, Brazil

Address of Corresponding Author: Carlos Eugênio Cavasini. Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416. São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. Zip Code 15090-000. Tel/Fax. + 55 17 32105736, E-Mail [cecavasini@famerp.br](mailto:cecavasini@famerp.br)

KEY WORDS: MALARIA VIVAX, DUFFY BLOOD GROUP ANTIGEN, POLYMORPHISM, BRAZILIAN AMAZON REGION

**Abstract**

**Background:** Duffy blood group polymorphisms are important in areas where *Plasmodium vivax* predominates, because this molecule acts as a receptor for this protozoan. We report here the Duffy blood group genotyping in *P. vivax* malaria patients from four different Brazilian endemic areas, exploring significant associations between blood group variants and susceptibility or resistance to malaria.

**Methods:** The *P. vivax* identification was determined by non-genotypic and genotypic screening tests. The Duffy blood group was genotyped by PCR/RFLP in 330 blood donors and 312 malaria patients from four Brazilian Amazon areas. In order to assess the variables significance and to obtain independence among the proportions, the Fisher's exact test was used.

**Results:** The data show a high frequency of the *FYA/FYB* genotype, followed by *FYB/FYB*, *FYA/FYA*, *FYA/FYB-33* and *FYB/FYB-33*. Low frequencies were detected for the *FYA/FY<sup>x</sup>*, *FYB/FY<sup>x</sup>*, *FYX/FY<sup>x</sup>* and *FYB-33/FYB-33* genotypes. Negative Duffy genotype (*FYB-33/FYB-33*) was found in both groups: individuals infected and non-infected (blood donors). No individual carried the *FY<sup>x</sup>/FYB-33* genotype. Some of the Duffy genotypes frequencies showed significant differences between donors and malaria patients.

**Conclusions:** Our data suggest that individuals with the *FYA/FYB* genotype have higher susceptibility to malaria. The presence of the *FYB-33* allele may be a selective advantage in the population, reducing the rate of infection by *P. vivax* in this region.

Additional efforts may contribute to better elucidate the physiopathologic differences in this parasite/host relationship in regions endemic for *P. vivax* malaria, in particular the Brazilian Amazon region.

## Background

*Plasmodium vivax* has been the most common cause of the human malaria parasite in the Brazilian Amazon region over the last seven years [1]. Innate resistance to malaria infections in humans is conferred by different blood group polymorphisms. The association of the Duffy blood group (*FY*) with *P. vivax* human malaria has been well-documented, where Duffy-negative individuals are naturally resistant to invasion by this parasite [2].

The Duffy blood group antigen has been identified as a scavenger on the red blood cell (RBC) surface eliminating excesses of circulating toxic chemokines, named Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) [3]. The determinant, a glycoprotein that passes through the membrane seven times, includes a 35-43 KDa epitope in the extracellular, N-terminal domain that mediates erythrocyte invasion by *P. vivax* merozoites [4]. The *Fy* gene has two exons ( $Fy^a$  and  $Fy^b$ ) that are encoded by the co-dominant alleles *FYA* and *FYB*, located on chromosome 1 [5,6]. The corresponding anti- $Fy^a$  and anti- $Fy^b$  antibodies define four different phenotypes;  $Fy(a+b+)$ ,  $Fy(a+b-)$ ,  $Fy(a-b+)$  and  $Fy(a-b-)$  [7]. The *FYA* and *FYB* alleles differ by a point mutation in the major cDNA transcript [8], encoding glycine in  $Fy^a$  or aspartic acid in  $Fy^b$  at residue 42 of the most important form of the protein, encoded by the exon 2 [9,8]. The molecular mechanism that gives rise to the null Duffy phenotype [ $Fy(a-b-)$ ] has been classically

associated with a point mutation in the GATA box of the DARC promoter which silences the gene encoding the Duffy system antigens in the RBCs of these individuals resulting in a *FYB* allele [9]. Recently, the *FYA* allele has been identified [10] and a new *FYB* allele was found with three single nucleotide polymorphisms (11). It has been demonstrated in blood donors from Southeast Brazil that Caucasians and African descendents were serologically Fy(b-) with the majority of the African descendents being *FYB* with the GATA single nucleotide polymorphism (SNP), while the majority of Caucasian typing Fy(b-) had *FYB* with 265T/298A SNPs [11]. The Fy-negative is common on RBCs of Negro individuals from ethnic African groups, but it is rare in many other populations [12].

Previous studies have demonstrated that heterozygous Duffy negative malaria individuals remain susceptible to infections by *P. vivax* [13,14]. It was demonstrated in individuals living in a malaria endemic region of Papua New Guinea that Duffy binding protein adherence to RBCs is significantly reduced for erythrocytes of *P. vivax* malaria patients who carry one Duffy-negative allele [15]. Our group observed that some of the Duffy phenotypes showed significant correlation between blood donors and malaria patients in different areas [16]. On the other hand, a previous study in the Western Brazilian Amazon region (Rondônia State) did not correlate Fy heterozygosity with protection against *P. vivax* [17]. We report here the Duffy blood group genotyping in *P. vivax* malaria patients from four different Brazilian endemic areas, exploring these significant phenotypic associations between blood group variants, as well as polymorphic regions of RBC receptors, with susceptibility or resistance to malaria.

## **Material and methods**

### ***Study population***

The study took place from May 2003 to August 2005. The malaria vivax patients (n = 312) who were enrolled in this study complied with the following criteria: they sought medical assistance presenting clinical malaria symptoms, were over 18 years old and had positive results for thick blood film / molecular diagnosis. A control group consisted of blood donors (n = 330) and according to the Brazilian blood bank policy they complied with the following criteria: they were over 18 years old, of both genders and belonging to all blood groups. Additionally, their place of birth was in the study area, they reported never suffering from malaria attacks and had no signs of malaria during the initial interview and had negative results for thick blood film/molecular diagnosis. The controls were matched to the patients in respect to age ( $\pm 5$  years), gender and ethnicity. All of the control subjects were genetically independent. Blood samples were collected from all participants (Macapá/Amapá State, Belém/Pará State, Porto Velho/Rondônia State and Rio Branco/Acre State), after informed consent.

### ***Genomic DNA extraction, PCR amplification and RFLP analysis***

The Duffy blood group genotypes were assessed using PCR/RFLP with modifications as described previously [11]. Briefly, the DNA was extracted from frozen pellets of infected erythrocytes using the Easy-DNA<sup>TM</sup> extraction kit (Invitrogen, California - USA ). The PCR was performed with 100 ng of DNA, 50 pmol of each primer, 2 nmol each dNTP, 1.0U Taq DNA polymerase, and buffer, in a total volume of 50  $\mu$ L. The promoter region was amplified using the FYN1 and FYN2 primers that flank the GATA box motif. To determine the Duffy RBC polymorphism, FYAB1 sense,

and FYAB2 reverse sense primers were used [18]. The amplification conditions were performed as described by Castilho et al., (2004) [11]. PCR products were run on 1.5% agarose gel, followed by ethidium bromide staining and photo-documentation using a Gel Doc 1000 (BioRad, Town, USA). The RFPL analysis was digested during three hours with *Ban1*, *MspA1* and *Sty1* restriction enzymes as previously described [11].

### ***Statistical analysis***

In order to access the significance of the variables and to obtain independence among the proportions, the Fisher's exact test was used. The mean ages of patients and controls were 29 years ( $\pm 14$  SD) and 28 years ( $\pm 8$  SD), respectively. All the studied groups showed no statistically significant differences in mean ages or ethnicity, indicating well-matched populations. The same results were obtained when we compared the two different groups from each area.

### **Results**

The genotypic and allelic frequencies of the Duffy blood group in the 330 blood donors and 312 patients infected by *P. vivax* as determined by PCR/RFLP are summarized in Table 1. The data show a high frequency of the *FYA/FYB* genotype in 199 individuals (31.0%) of the studied population. This is followed by 117 (18.2%) and 94 (14.6%) of homozygotes for the *FYB* and *FYA* alleles, respectively. While the frequencies for heterozygote individuals with *FYA/FYB-33* and *FYB/FYB-33* were comparable at 14.9% (96). Low frequencies were detected for the *FYA/FY<sup>x</sup>*, *FYB/FY<sup>x</sup>*, *FYX/FY<sup>x</sup>* and *FYB-33/FYB-33* genotypes. The negative Duffy genotype (*FYB-33/FYB-33*) was found in both individuals infected by *P. vivax* and unaffected blood donors.

Table 2 shows a comparison of the results of genotyping and inferred phenotypes of *FY* among blood donors and patients infected by *P. vivax* in the Amazon region. In respect to the allelic combinations of *FY*, there was a significant difference between donors and patients only for the *FYB-33/FYB-3* genotype ( $P = 0.0003$ ). For heterozygotes, our results demonstrated a significant difference ( $P = 0.0404$ ) between those with the *FYA/FYB* genotype, which was lower for blood donors (90 - 27.27%) than for patients infected by *P. vivax* (109 - 34.93%). No individuals were identified with the *FY<sup>x</sup>/FYB-33* genotype.

The frequency of individuals with the *FYB-33* allele among blood donors was 35.15% versus 24.36% in patients. This difference was statistically significant ( $P = 0.0033$ ). The prevalence of the *FYB* allele was significantly higher ( $P = 0.0358$ ) among malaria-infected patients. However, significant differences were not detected in respect to the frequency of individuals with the *FY<sup>x</sup>* and *FYA* alleles in the two study groups (Table 2).

## Discussion

Thus far, innate resistance to malaria infections in humans has been attributed to blood group polymorphisms. Duffy blood group polymorphisms are important in areas where *P. vivax* predominates, because this molecule acts as a receptor for this protozoan (but not for the other human malaria parasites) on the surface of RBCs [19]. Field observations from West Africa and Ethiopia have indeed established a strong correlation between absence or low endemicity of *P. vivax* malaria and the high prevalence of the Duffy negative allele [20,21]. Little is known on the frequency of RBC polymorphisms that confer either partial or complete resistance against malaria.

Our results emphasize the importance of the evaluation of Duffy blood group genotypes in malaria endemic areas of the Brazilian Amazon region.

The Brazilian population has a highly heterogeneous ethnic composition, a result of the hybridization of the numerous native indigenous populations and immigrants from Europe, Africa and Asia. The immigration flow was not uniform in the different regions of the country [22-24]. The differential distribution of Duffy antigenic determinants among ethnic groups is an aspect characteristic of this blood system. Hence, this has been used as a marker for the ethnic composition as well as an indicator in the populational evolution. In the current study, significant differences in the allelic frequencies of the *FY* gene were identified when compared with previous studies of patients infected with human plasmodium in Brazilian Amazon regions [17, 25-27]. However, the *FYA*, *FYB* and *FYB-33* alleles showed differential distributions compared to the population of the southeastern region of Brazil [11]. The genotypic compositions obtained in this study demonstrated significant variations compared to previous studies performed in the states of Pará and Rio Grande do Sul [28,29] and in the cities of São Paulo [30], Campinas [11] and Ribeirão Preto [31] all of which are in the state of São Paulo, Southeastern region of Brazil.

Our results showed that the *FYA/FYB* genotype was the most common, followed by the homozygotes for the *FYB* and *FYA* alleles and by the heterozygotes *FYA/FYB-33* and *FYB/FYB-33* (Table 1). The *FYB-33/FYB-33* genotype, which is classically seen in individuals unaffected by *P. vivax* infection, was identified in 3.2% of the general population and in 5.5% of blood donors. These numbers differ from previous reports on a group of malaria patients uninfected by *P. vivax* in the state of Rondônia [17], where the frequency of this genotype was 12% and also for a mixed sample from the Northern

and Southeastern regions of Brazil [27]. Some populations had higher genotypic frequencies for *FYA/FYB* and *FYB/FYB-33* than for a caucasian-like and negroid population from the Southeastern of Brazil [11]. On the other hand, the frequency of the *FYB-33/FYB-33* genotype was lower. In fact, with the exception of negroid ethnic groups, this genotype is extremely rare [12,30,32,33].

The *FYA* allele is common in European and Oriental peoples but it is rare in African Negroes. Additionally, the *FYB* is more common in populations classified as white than in asiatic and negroid populations [34,35]. The frequency of the *FYA* and *FYB* alleles in the Brazilian Amazon population was higher than those in the Southeastern region [11] probably due to the massive influence of Portuguese colonization in the North region of Brazil as well as the presence of Amerindians [36], as recent molecular analysis has corroborated that Amerindians have an Asian origin [37]. Indeed, in the North region of Brazil, studies carried out with different tribes of Amerindians have shown that the *FYA* allele is the most common [31,38]. As expected, a lower frequency of the *FYB-33* allele was observed in the North region ( $P = 0.0001$ ). Although a high prevalence of this allele was demonstrated in isolated communities in the states of Amapá and Pará, North region of Brazil [39], the introduction of a negroid ethnic component in the Amazon region is recent [40,41]. In respect to the *FY<sup>X</sup>* allele, there does not seem to be a differential ethnic distribution as, the frequency detected here is similar to those described in other Caucasian-like populations in Brazil [11] and also in Europe [42].

The different *FY* allelic frequencies in individuals from North compared to Southeastern Brazil, may be due to the contribution of the three major ethnic groups (Europeans, in particular Portuguese; Blacks and Amerindians) in the formation of both populations. The Amerindian contribution was higher in the north of the country whereas

European migration took place more in the South and Southeastern regions [43-45]. In spite of the current knowledge of the relationship between structure/function and tissue location of DARC, the functional significance of each of the alleles and the different genotypic combinations require further elucidation. The variation in the ethnic composition of the urban and rural populations of the Brazilian Amazon region and of distinct regions in Brazil [26,46], may influence the allelic and genotypic distributions reflecting in matrixes of genetic mechanisms favorable to the susceptibility to infectious and parasitic diseases, in particular to malaria.

The frequency of the allele with the *FY* GATA mutation (*FYB-33*) was greater in blood donors than in patients infected with malaria ( $P = 0.0033$ ), suggesting that there is a reduction in the infection rate of carriers of the *FYB-33* allele. These results were recently reinforced by data from individuals infected by *P. falciparum* when compared to those infected by *P. vivax* in Brazilian Amazon regions [27]. The *FYB-33* allele is a variant of the *FYB* allele resulting from a T→C point mutation in the gene promoter region (nucleotide-33), which abolishes its expression [9]. The same occurs in the *FYA* allele, determining the *FYA<sup>null</sup>* allele [10]. The presence of the *FYB-33* allele results in a 50% reduction in the Duffy protein expression on the erythrocyte surface [15,47]. This process demonstrates the action of the dose-related effect of the gene [15,48], which may limit the invasion process of red blood cells by the parasite, although susceptibility to *P. vivax* may occur in heterozygotic Duffy-negative individuals [13,14]. Thus the *FY/FYB-33* genotypic combination, with either Fy(a+b-) or Fy(b+b-), seems to convey a reduction in the susceptibility to malaria. *In vitro* studies [15] support this hypothesis as RBCs that express these phenotypes have a significant reduction in cytoadherence of the parasite when compared to RBCs that express

Fy(b+b+). Recently, in Papua New Guinea, a significant reduction in infection by *P. vivax* was observed in Duffy negative individuals heterozygotic for the *FYA<sup>null</sup>* allele [49].

In this study a low frequency of the negative Duffy genotype (*FYB-33/FYB-33*) was detected among uninfected subjects. As has previously been demonstrated, the absence of the Fy antigen in many ethnic Negro groups and their descendents, does not seem to exert any deleterious effect, however it does bestow a natural resistance against infection by *P. vivax* [2,9,14,35,50,51]. These individuals are homozygotes for the *FYB* mutation in the GATA, that completely abolishes the Fy expression in erythrocytes but not in cells of other tissues [9]. Recent reports have provided evidence on the transmission among Duffy-negative patients in Africa [52] and in Brazil [53]. These data suggest the possibility that *P. vivax* is utilizing alternative receptors, apart from Fy, for binding in the erythrocyte invasion process. Whether *FYB* carrying the GATA box mutation is the primordial gene that encodes the Duffy system antigens or whether the GATA box mutation has evolved to escape malaria infection per se is controversial. However, the presence of this allele (*FYB-33*) may be a demonstration of the selection advantage by mutation in the population. Thus, in the Brazilian Amazon, where *P. vivax* predominates, the frequency of the *FYB-33* allele is higher than expected given the ethnic population, both in terms of heterozygotes and homozygotes. This might, over time, cause an increase in the number of Duffy-negative individuals in the population and, as a consequence, a reduction in the rate of infection by *P. vivax* in this region.

In the group of patients infected by *P. vivax*, different allelic combinations with *FY<sup>X</sup>* were detected, including 5 (1.6%) *FYA/FY<sup>X</sup>* individuals, 4 (1.3%) *FYB/FY<sup>X</sup>* and 2 (0.6%) *FY<sup>X</sup>/FY<sup>X</sup>* (Table 2). The frequency of this allele among patients and blood donors

did not show statistical differences ( $P = 0.3873$ ). Studies carried out in blood samples from European and American Caucasians and Afro-American individuals, demonstrated that the C265T ( $FY^X$ ) mutation altered the Duffy protein expression on the RBC surface differently, depending on the ethnic group, using at least two mechanisms. One mechanism involves silent transcription in one of the  $FYB$  alleles and the other affects the translation and/or the stability of the protein [47,54]. These studies showed that heterozygote individuals for the  $FY^X$  ( $FY^{wK}$ ) allele have 50% less of the Duffy protein on the surface of the membrane of the erythrocyte. On the other hand, individuals homozygotic for the  $FY^X$  allele have about one tenth of the antigen expression in the erythrocytes [47]. Our findings show, however, that these polymorphisms do not seem to be associated with susceptibility to malaria.

As illustrated in Table 2, we observed a higher frequency of the  $FYA/FYB$  genotype in patients compared to blood donors ( $P = 0.0404$ ). In principle, this seems to indicate that the condition of heterozygosis, resulting from the expression of the  $FYA$  and  $FYB$  genes, favors infection by *P. vivax*. In fact, as has already been demonstrated by us, based on a phenotyping study, Fy(a+b+) individuals may be more susceptible to infection by this species of *Plasmodium* [16]. Although no qualitative or quantitative measurements of the Duffy glycoprotein expressions were made in this study, we saw a larger number of malaria episodes among patients with the heterozygote genotype than the homozygote genotype. The basis of this observation has not been determined yet, but our phenotypic and genotypic results associated with pertinent publications point to the possibility that heterozygote individuals modulate the susceptibility to malaria by *P. vivax* by means of quantitative and/or qualitative variations that affect the Duffy antigen expression on erythrocytes. In the first aspect, *in vitro* studies demonstrate differences

in the levels of the expression of FY glycoprotein on the surface of the reticulocytes of Caucasian-like and Afro-American individuals with the Fy(a+b+) erythrocytic phenotype [48]. These authors verified that individuals with *FYA* and *FYB* alleles expressed a lower quantity of DARC than heterozygotes. Hence, it is possible that heterozygote individuals have a greater repertoire of receptors for the possible variations that occur in the parasite protein binder to the human erythrocytes.

The recent demonstration of polymorphisms in the Duffy binding protein in isolates of *P. vivax* from the Brazilian Amazon seems to support our observations [55]. An association, between human receptor polymorphisms and variations in the parasite binders of *Plasmodium falciparum* that modulate susceptibility to malaria, was also demonstrated [19,56-60]. Hence, apart from the different levels of the expression, the specific conformation of the Fya and Fyb antigens may determine differences in the susceptibility to infection. Nevertheless, one of the possible consequences of differential susceptibility to *vivax* malaria could be modifications in allelic frequencies of *FYA* and *FYB* in populations exposed to *P. vivax*, the most prevalent species in the Brazilian Amazon region. If in fact this process occurs as a consequence of infection, it seems to be necessary, but not sufficient to eliminate heterozygote individuals, even if they are affected by repetitive episodes of malaria by *P. vivax*, as the infection is rarely severe and occurs in the entire age range with different frequencies for different ages and regions of the Brazilian Amazon without lethality [61,62].

Based on the significant associations described herein, our data differ from previous studies [17] carried out in the western Brazilian Amazon region as well as recent studies of patients from the Brazilian Amazon as a whole [27]. In respect to the first studies, these differences may be a result of the small sample sizes initially

evaluated; the control group of the current study was composed of blood donors who reported never having experienced malaria against samples from individuals who had *P. falciparum* previously evaluated and the various ethnic groups in the different regions studied today (Eastern and Western Amazon). In relation to the recent studies, different to our findings, the authors detected a significant association among infections by *P. vivax* and the *FYB/FYB* genotype, also conflicting with results of Wooley et al., (2000) [48] in North American individuals (Caucasians and Afro-Americans). These divergences probably occurred due to the smaller sample size involved, and the fact that the control group consisted patients infected by *P. falciparum*.

### **Conclusions**

The Brazilian population presents an elevated degree of miscegenation which is implicated in variations in the allelic distribution of *FY*, which was also confirmed by our findings. Future analyses that consider haplotypic frequencies of the alleles and quantification of the DARC expression in populational groups in endemic and non-endemic areas, increasing the knowledge on the dynamics of this gene and its possible contribution as a modulator in the susceptibility to malaria. Our data suggest that individuals with the *FYA/FYB* genotype have higher susceptibility to malaria. The presence of the *FYB-33* allele may be a selective advantage in the population, reducing the rate of infection by *P. vivax* in this region. However, the populational and longitudinal studies must be amplified accompanying groups of individuals with the *FYB-33* allele and the *FYA/FYB* genotype, including clinical parameters, as well as the evaluation of their expressions which may contribute to better elucidate the

physiopathologic differences in this parasite/host relationship in regions endemic for *P. vivax* malaria, in particular the Brazilian Amazon.

#### **Authors' contributions**

CEC carried out all genotype assay. AADC, VSDC and CEC collected samples from *P. vivax* malaria individuals and blood donors. CEC, LCM, CRBD and LC participated in the design of the study and drafted the manuscript. RLM and ARBR conceived of the study and participated in all aspects of its design, acquisition of funding, execution, coordination and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

#### **Acknowledgments**

To all individuals enrolled in this study and to Blood Bank Managing Director of the studied areas for help in blood donor samples collection. We thank Aline Barroso, Maria Cristina Figueredo and Mauro Tada for help in malaria field work. To Professor Luiz Hildebrando Pereira da Silva for facilities at CEPEM. Financial support was provided by FAPESP (Process 02/9546-1), CNPq (Process 302353/2003-8). C.E.C. is a PhD student from Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. The protocol for this study was reviewed and approved by the Research Board of the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

**Table 1:** Genotyping results of the Duffy Blood Group System in 642 individuals (donors and patients infected with *Plasmodium vivax*) from Brazilian Amazon region.

Genotype result	nt 125 <i>FYA/FYB</i> Donors / Patients	nt 265 <i>FYB<sup>WK</sup></i> or <i>FY<sup>X</sup></i>	GATA (n) <i>FYB<sup>ES</sup></i> or <i>FY0</i> or <i>FYB-33</i>	Predicted Phenotype Donors / Patients
<i>FYA/FYA</i>	G/G 43 / 51	C/C	T/T	
<i>FYA/FY<sup>X</sup></i>	G/A 03 / 05	C/T	T/T	Fy(a+b-) n = 108 / 90
<i>FYA/FYB-33</i>	G/A 62 / 34	C/C	T/C	
<i>FYA/FYB</i>	G/A 90 / 109	C/C	T/T	Fy(a+b+) n =90 / 109
<i>FYB/FYB</i>	A/A 54 / 63	C/C	T/T	
<i>FYB/FY<sup>X</sup></i>	A/A 06 / 04	C/T	T/T	Fy(a-b+) n = 114 /109
<i>FYB/FYB-33</i>	A/A 54 / 42	C/C	T/C	
<i>FY<sup>X</sup>/FY<sup>X</sup></i>	A/A 00 / 02	T/T	T/T	Fy(a-b-) n = 18 / 04
<i>FYB-33/FYB-33</i>	A/A 18 / 02	C/C	C/C	
Total	330 / 312			

**Table 2:** Comparison of genotyping results and allele frequencies of the Duffy Blood Group System among blood donors and patients infected with *P. vivax* from Brazilian Amazon region.

Duffy blood group system		Brazilian Amazon Region		<i>P</i>
Genotypes	Predicted Phenotype	Donors (n= 330)	Patients <i>P. vivax</i> (n=312)	
<i>FYA/FYA</i>	Fy(a <sup>+</sup> b <sup>-</sup> )	43	51	0,2644
<i>FYA/FY<sup>X</sup></i>	Fy(a <sup>+</sup> b <sup>-</sup> )	3	5	0,4942
<i>FYA/FYB-33</i>	Fy(a <sup>+</sup> b <sup>-</sup> )	62	34	0,0055*
<i>FYA/FYB</i>	Fy(a <sup>+</sup> b <sup>+</sup> )	90	109	0,0404*
<i>FYB/FYB</i>	Fy(a <sup>-</sup> b <sup>+</sup> )	54	63	0,2208
<i>FYB/FY<sup>X</sup></i>	Fy(a <sup>-</sup> b <sup>+</sup> )	6	4	0,7530
<i>FY<sup>X</sup>/FY<sup>X</sup></i>	Fy(a <sup>-</sup> b <sup>-</sup> )	-	2	0,2358
<i>FYB/FYB-33</i>	Fy(a <sup>-</sup> b <sup>+</sup> )	54	42	0,3205
<i>FYB-33/FYB-33</i>	Fy(a <sup>-</sup> b <sup>-</sup> )	18	2	0,0003*
Alleles		Alleles Frequencies		
<i>FYA</i>		0,365	0,400	0,2896
<i>FYB</i>		0,390	0,450	0,0351
<i>FY<sup>X</sup></i>		0,014	0,021	0,5726
<i>FYB-33</i>		0,230	0,128	0,0000

\* Fisher's Exact Test.

---

**REFERENCES**

1. Kirchgatter K, Del Portillo HA: **Clinical and molecular aspects of severe malaria**. An Acad Bras Cien 2005, 77:455-475.
2. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinnis MH: **The resistance factor to *Plasmodium vivax* in Blacks: Duffy blood group genotype *FYFY***. N Engl J Med 1976, 295:302-304.
3. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Gegert CA, Valente AJ, Baker JB: **Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin**. J Clin Invest 1991, 88:1362-1369.
4. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Willians K, Gulati S, Pogo AO: **Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite**. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:10793-10797.
5. Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA: **Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man**. Proc Natl Acad Sci USA 1968, 61:949-955.
6. Collins A, Keats BJ, Dracopoli N, Shields DC, Morton NE: **Integration of gene maps: chromosome 1**. Proc Natl Acad Science USA 1992; 89:4598-602.

7. Parasol N, Reid M, Rios M, Castilho L, Harari I, Kosower S: **A novel mutation in the coding sequence of the FY\*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associate with na altered erythrocyte phenotype.** Blood 1998, 92:2237-2243.
8. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ: **Mutation in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup> antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a<sup>-</sup>b<sup>-</sup>) phenotype.** B J Hematol 1995, 90:823-829.
9. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Kim CLV: **Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individual.** Nat Genet 1995, 10:224-228.
10. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Kazura JW: **Emergence of FY\*A<sup>null</sup> in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea.** Med Sci 1999, 96:13973-13977.
11. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF, Reid MR: **A novel Fy allele in Brazilians.** Vox Sang 2004, 87:190-195.

12. Race RR, Sanger R: Blood groups in man. 6<sup>th</sup> ed, Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975.
13. Miller LH, Mason SJ, Dvoak JA: **Erythrocyte Receptors for (*Plasmodium knowlesi*) Malaria: Duffy Blood Group Determinants.** Science 1975, 189:561-562.
14. Miller LH, McAuliffe FM, Mason SJ: **Erythrocyte Receptor for Malaria Merozoites.** Am J Trop Med Hyg 1977, 26(6):204-208.
15. Michon P, Wooley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH: **Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection.** FEBS Letters 2001, 495:111-114.
16. Cavasini CE, Mattos LC, Alves RT, Couto AA, Calvosa VSP, Bonini Domingos CR, Rossit ARB, Machado RLD: **Frequencies of ABO, MNSs and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas.** Hum Biol 2006, 78(2):255-259.
17. Cavasini CE, Pereira FJT, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU. **Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon.** Rev Soc Bra Med Trop 2001, 34(6):591-595.

18. Rios M, Cash K, Strupp A, Uehlinger J, Reid ME: **DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping.** *Immunohematol* 1999, 15:61-65.
19. Miller LH. **Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:2415-2419.
20. Welch SG, McGregor IA, Williams K: **The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977, 71(4):295-296.
21. Mathews HM, Armstrong JC. **Duffy Blood Types and vivax Malaria in Ethiopia.** *Am J Trop Med Hyg* 1981, 30:299-303
22. Azevedo ES, Silva KM, Silva MC, Lima AM, Fortuna CM, Santos MG: **Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil.** *Hum Hered* 1981, 31:350-357.
23. Franco MHLP, Weimer TA, Salzano FM: **Blood polymorphisms and racial admixture in two Brazilian populations.** *Am J Phys Anthropol* 1982, 58:127-132.

- 
24. Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C: **Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population.** Hum Hered 1983, 33: 125-129.
25. Camargo LMA, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Basano SA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H: **A Rural Community in a Brazilian Western Amazonian Region: Some Demographic and Epidemiological Patterns.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, 97(2):193-195.
26. Ferreira RGM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LMA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H: **Ethnic Admixture Composition of Two Western Amazonian Populations.** Hum Biol 2002, 74:607-613.
27. Souza TN, Sanchez BAM, Cerávolo IP, Carvalho LH, Brito CFA: **Real-time multiplex allele-specific polymerqase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor.** Vox Sng 2007, 92:373-380.
28. Bortolini C, Weimer TA, Franco MH, Salzano FM, Layrissé Z, Schneider H, Schneider MP: **Genetic studies in three South American black populations.** Gene Geogr 1992, 6:1-16.
29. Dornelles CL, Callegari-Jacques SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHLP, Hickmann AC, Geiger CJ, Salzano FM: **Genetics, Surnames,**

- Grandparents' Nationalities, and Ethnic Admixture in Southern Brazil – Do the Patterns of Variation Coincide?** Gen Mol Biol 1999, 22(2):151-161.
30. Novaretti MCZ, Dorlbiac-Llacer PE, Chamone DAF: **Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo.** Rev Bra Hematol Hemoter 2000, 22:23-32.
31. Stalote AC, Proto-Siqueira R, Da Silva Jr WA, Zago MA, Palatnik M: **The mutation G298A→Ala100Thr on the coding sequence of the *Duffy* antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians.** Gent Mol Res 2005, 4(2):166-173.
32. Mourant A, Kopec A, Domaniewska-Sobczak K: **The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms.** Oxford Press, 1976.
33. Spencer HC, Miller LH, Collins WE, Knud-Hansen C, McGinnis MH, Shiroishi T, Lobos RA, Feldman RA: **The Duffy blood group and resistance to *Plasmodium vivax* in Honduras.** Am J Trop Med Hyg 1978, 27:664-670.
34. Lewis Jr GE, Miller LH, Ibrahim L, Wong PW, McGinnis M, Ooi WL: **Duffy phenotypes in Malaysian populations: correction of previous unusual findings.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1988, 82:509-510.

35. Pogo AO, Chaudhuri A: **The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor**. Semin Hemat 2000, 37:122-129.
36. Dos Santos SEB, Rodrigues JD, Ribeiro-dos-Santos AKC, Zago MA: **Differential Contribution of Indigenous Men and Women to the Formation of an Urban Population in the Amazon Region as Revealed by mtDNA and Y-DNA**. Am J Phy Anthropol 1999, 109:175-180.
37. Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena SD, Schanfield M, Leonard WR, Osipova L, Crawford MH, Mitchell RJ: **The central Siberian origin for native American Y chromosomes**. Am J Hum Genet 1999, 64:619-628.
38. Salzano EM & Calegari-Jaques SM: **South Amerindian Indians. A case study in evolution**. Clarendon Press 1988, Oxford, UK.
39. Perna SJQ, Cardoso GL, Guerreiro JF: **Duffy blood group genotypes among African-Brazilian communities of the Amazon region**. Genet Mol Res 2007, 6 (1): 166-172.
40. Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, Prado VF: **The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages**. Am J Hum Genet 2000, 67:444-461.

- 
41. Calegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM: **Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population.** Am J Hum Biol 2003, 15:824-834.
42. Ansart-Pirenne H, Martin-Blanc S, Le Pennec P-Y, Rouger P, Cartron J-P, Tournamille C: **FY\*X real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time FY genotyping.** Vox Sang 2007, 92: 142-147.
43. Santos SEB, Guerreiro JF: **The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon region.** Rev Brasil Genet 1995, 2:311-315.
44. Santos EJM, Ribeiro-dos-Santos AKC, Guerreiro JF, Aguiar GFS, Santos SEB: **Migration and ethnic change in an admixed population from the Amazon region (Santarém, Pará).** Rev Brazil Genet 1996, 3:511-515.
45. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena, SD: **The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages.** Am J Hum Genet 2001, 68:281-286.
46. Santos SEB, Ribeiro dos Santos AKC, Santos EJM, Guerreiro JF: **The Amazonian microcosm.** Ciênc Cult 1999, 51:181-190.

47. Yazdanbakhsh M, Rios M, Storry JR, Kosower, N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME: **Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens.** *Transf* 2000, 40:310-320.
48. Woolley IJ, Hotmire KA, Sramkoski RM, Zimmerman PA, Kazura JW: **Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and *FY* genotype.** *Transf* 2000, 40:949-953.
49. Kasehagem LJ, Mueller I, Kiniboro B, Bockarie MJ, Reeder JC, Kazura JW., Kastens W, McNamara DT, King CH, Whalen CC, Zimmerman PA: **Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygote.** *PLoS ONE* 2007, 2(3):e336.
50. Livinstone FB: **The Duffy blood groups, vivax malaria, and malaria selection in human populations: a review.** *Hum Biol* 1984, 56:413-425.
51. Hadley TJ, Peiper C: **From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen.** *Blood* 1997, 89:3077-3091.
52. Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Duntons RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R: **Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya.** *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 775-581.

53. Cavasini, C. E. et al.: ***Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from de Brazilian Amazon region: an exception?** Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2007, in press.
54. Tournamille C, Kim CLV, Gane P, Penneç PYL, Roubinet F, Babinet J, Carton JP, Colin Y: **Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy\* individuals.** Blood 1998, 92:2147-2156.
55. Souza TN, Cerávolo IP, Fontes CJF, Couto A, Carvalho LH, Brito CFA: **The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area.** Mol Biochem Parasitol 2006, 146:251-254.
56. Lell B, May J, Schmidt-Ott R J, Lehman L G, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Bienzle U, Kremsner PG: **The Role of Red Blood Cell Polymorphisms in Resistance and Susceptibility to Malaria.** Clin Infec Dis 1999, 28:794-799.
57. Moulds JM, Moulds JJ: **Blood Group Associations With Parasites, Bacteria, and Viruses.** Transf Med Rev 2000, 14(4):302-311.

58. Carter R, Mendis KN: **Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria**. Clin Microb Rev 2002, 15(4):564-594.
59. Zimmerman PA, Patel SS, Maier AG, Bockarie MJ, Kazura JW: **Erythrocyte polymorphisms and malaria parasite invasion in Papua New Guinea**. Trends Parasitol 2003, 19(6):250-252.
60. Chung WY, Gardiner DL, Hyland C, Gattton M, Kemp DJ, Trenholme KR: **Enhanced invasion of blood group A1 erythrocytes by *Plasmodium falciparum***. Mol Biochem Parasitol 2005, 144:128-130.
61. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Pereira da Silva LH, Camargo EP: **High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian population**. Am J Trop Med Hyg 2002, 66(6):641-648.
62. Beiguelman B, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Nunes ACS, Heckmann MIO, Ferreira RGM, Pereirara da Silva LH, Camargo EP, Krieger H: **The Association of Genetic Markers and Malaria Infection in the Brazilian Western Amazonian Region**. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003, 98(4):455-460.

Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo  
49(1):1-4, January-February, 2007

## MOLECULAR SCREENING OF *Plasmodium* sp. ASYMPTOMATIC CARRIERS AMONG TRANSFUSION CENTERS FROM BRAZILIAN AMAZON REGION

Érica FUGIKAWA(1), Patrícia Aparecida FORNAZARI(1), Roberta de Souza Rodrigues PENHALBEL(1), Alexandre LORENZETTI(1), Roberto Duarte MAROSO(2), Juvanete Távora AMORAS(3), Ana Sueli SARATVA(4), Rita Uchôa da SILVA(5), Cláudia Regina BONINI-DOMINGOS(6), Luiz Carlos de MATTOS(7), Andréa Regina Baptista ROSSITI(1), Carlos Eugênio CAVASINI(1) & Ricardo Luiz Dantas MACHADO(1)

### SUMMARY

The transmission of malaria in Brazil is heterogeneous throughout endemic areas and the presence of asymptomatic *Plasmodium* sp. carriers (APCs) in the Brazilian Amazon has already been demonstrated. Malaria screening in blood banks is based on the selection of donors in respect to possible risks associated with travel or residence, clinical evidence and/or inaccurate diagnostic methods thereby increasing the probability of transfusion-transmitted infection. We evaluated the frequency of APCs in four blood services in distinct areas of the Brazilian Amazon region. DNA was obtained from 400 human blood samples for testing using the phenol-chloroform method followed by a nested-PCR protocol with species-specific primers. The positivity rate varied from 1 to 3% of blood donors from the four areas with an average of 2.3%. All positive individuals had mixed infections for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. No significant differences in the results were detected among these areas; the majority of cases originated from the transfusion centres of Porto Velho, Rondônia State and Macapá, Amapá State. Although it is still unclear whether APC individuals may act as reservoirs of the parasite, efficient screening of APCs and malaria patients in Brazilian blood services from endemic areas needs to be improved.

**KEYWORDS:** *Plasmodium* asymptomatic carriers; Blood Bank; Brazilian Amazon region.

### INTRODUCTION

Malaria is an endemic disease in the Brazilian Amazon from known human malaria parasites. *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*, have been detected in Brazil. *P. vivax* is the most common; it caused more than 80% of all cases reported in 2005. The transmission of malaria is heterogeneous throughout the endemic area<sup>6</sup>. The stability of malaria in these areas means that the prevalence of infection is high enough to produce clinical immunity within the population. On the other hand, propensity to evolve to epidemic status and high rate of severe disease in adults is correlated with unstable malaria. Indeed, clinical immunity to malaria within a population is a predictor; it is defined as the presence of an immune response that produces control, but without any signs of complete elimination of parasitemia or pathological consequences<sup>21</sup>. The increased prevalence of asymptomatic individuals with malaria carrying *P. falciparum* has been identified in areas of high transmission throughout the world<sup>3</sup>. In Brazil, studies carried out in indigenous<sup>5</sup> and riverside<sup>1</sup> communities of Rondônia State have demonstrated the existence of long-term asymptomatic *Plasmodium* sp. carriers (APCs), the majority of whom have low parasitaemia<sup>2</sup>. According to authors,

native populations can act as a reservoir for the spread of malaria to migrants. In another study, conducted in a Mato Grosso State population, 32% of tested individuals were proved to be asymptomatic with *P. malariae* (single or mixed infections) within seventy-two hours after blood collection<sup>17</sup>. In the Amazonas State, 0.3% of blood donors evaluated in blood services presented with specific PCR-positivity for *Plasmodium vivax*<sup>19</sup>.

Although malaria transmission occurs principally through mosquito bites, there have been reports of transfusion-transmitted malaria since the beginning of the 20<sup>th</sup> century. A review of international data published up to the end of the 1970s revealed an average of 145 cases per year. Although not common, transfusion-transmitted malaria may have very severe clinical implications if not detected and treated early<sup>31</sup>. Transmission of malaria has been reported to occur mainly with blood products from single donors, such as red cells, platelets and white cell concentrates<sup>20</sup>. Thus, the blood bank becomes a sufficiently important target to control this event, specifically in malaria endemic areas. On the other hand, the high rate of malaria without symptoms can be a great problem in the elaboration of malaria control strategies in the Brazilian Amazon region, which are essentially based on the treatment

(1) Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

(2) Fundação HEMERON, Porto Velho, Rondônia, Brasil.

(3) Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

(4) Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, Belém, Pará, Brasil.

(5) Centro de Hematologia e Hemoterapia do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

(6) Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

(7) Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

**Correspondence to:** Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, Av. Brigadeiro Faria Lima 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil. Phone/Fax: +55.17.3201-5736. E-mail: ricardomachado@famerp.br

FUGIKAWA, E.; FORNAZARI, P.A.; PENHALBEL, R.S.R.; LORENZETTI, A.; MAROSO, R.D.; AMORAS, J.T.; SARAIVA, A.S.; SILVA, R.U.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.B.; CAVASINI, C.E. & MACHADO, R.L.D. - Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(1): 1-4, 2007.

of symptomatic patients<sup>1</sup>. The aim of this study is to evaluate the frequency of APCs in samples collected from four main Brazilian Amazon regional blood services.

#### MATERIAL AND METHODS

Blood donors, both men and women, from four blood banks of the Brazilian Amazon region (n = 400), who were enrolled in our study, complied with the following criteria: over 18 years old, no previous malaria attack and no signs of malaria reported during the initial interview. Donors were screened using specific blood bank routinely performed protocols, which included the thick blood film technique in Porto Velho (PVL), Rondônia State and OPTIMAL<sup>®</sup> testing in Macapá (MCP), Amapá State. However, in Belém (BEL), Pará State and Rio Branco (RBR), Acre State, no *Plasmodium* screening test was performed; the donors were screened only by deferral guideline. Blood bank standard laboratory results were negative for each of the pathogens tested. Therefore, all study subjects herein considered provided accepted blood products.

DNA was extracted from the total blood using the phenol-chloroform method<sup>2</sup> and a nested-PCR protocol was followed using species-specific primers<sup>3</sup>. Epi Info version 6.04b (CDC, Atlanta, USA) was used for data storage and statistical analyses. To obtain independence among the proportions, the chi-square test with Yate's correction were applied with a *p*-value < 0.05 being considered statistically significant. The protocol for this study was reviewed and approved by the Ethics Committee for research of the Medical School in São José do Rio Preto.

#### RESULTS

As summarized in Table 1, in spite of the negative results obtained by non-genotypic procedures the positivity rate varied from 1 to 3% of blood donors by using the molecular methodology. Overall, of the blood samples analyzed (100 from each region), nine positive cases (2.3%) were identified, including three samples (3%) from each of the blood banks in PVL and MCP, two from the service in BEL (2%) and one from the blood bank in RBR (1%). Even though no significant differences (Chi-square *p* > 0.05) were detected among these areas, the majority of the positive cases originated from the blood banks in PVL and MCP. All the positive samples presented with mixed *P. falciparum* and *P. vivax* infections.

**Table 1**  
Frequencies of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers and species as determined by malaria non-genotypic and genotypic screening tests among four transfusion centers from the Brazilian Amazon region

Area	Malaria non-genotypic screening	NESTED-PCR	
		Frequency	<i>Plasmodium</i> sp.
Macapá/AP	Negative <sup>a</sup>	3/100 (3%)	PF + PV
Porto Velho/RO	Negative <sup>b</sup>	3/100 (3%)	PF + PV
Belém/PA	Negative <sup>c</sup>	2/100 (2%)	PF + PV
Rio Branco/AC	Negative <sup>d</sup>	1/100 (1%)	PF + PV

a = OPTIMAL<sup>®</sup>; b = thick blood film; c and d = deferral guidelines; PF = *Plasmodium falciparum*; PV = *Plasmodium vivax*

#### DISCUSSION

Malaria was one of the first recorded transfusion-transmitted infections and still is one of the most common. Differentiation of natural from transfusion-transmitted infections is very difficult in endemic areas<sup>12</sup>. Furthermore, in these areas, many of the donors are already infected with, or are at high risk of malaria infection. Our results emphasize the importance of testing for the presence of APCs in transfusion services from the Brazilian Amazon region.

The rapid and accurate diagnosis of malaria is essential and efficient chemotherapy is the main tool in the control of the disease<sup>14</sup>. Laboratorial diagnoses, in general, are made using the thick and thin blood film techniques. However, induced morphologic alterations can occur during the staining of slides, modifying the data of these species<sup>1</sup>. Moreover, some parasitic development stages can lead to errors in diagnosis, even with extremely experienced microscopists. Microscopic diagnoses failed to detect low parasitemia in PCR-positive asymptomatic individuals living in endemic regions of Brazil<sup>17</sup>. The deficiency in the detection of mixed infections by the thin and thick blood film methods make treatment difficult as it is species-specific. Regarding the immunochromatographic test (used in MCP), we should not forget the limitations mentioned by the manufacturer OptiMal-IT<sup>®</sup>, which include the test may not be one hundred percent accurate in samples with parasitemia of less than 100 red blood cells/mm<sup>3</sup>. Additionally, previous studies have shown that the immunochromatographic test is unreliable to detect *P. malariae*<sup>10,15</sup>. In respect to the blood banks in BEL and RBR, the screening of donors only used deferral guidelines, in particular clinical evaluation, to carry out malaria diagnosis. We know that the overall effectiveness of any donation-screening program does, however, depend on evidence of clinical signs of malaria, but this criterion has important implications in APCs.

Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive and specific and has shown to be efficient in the diagnosis of human malaria parasites, even identifying high prevalence of mixed infections<sup>16</sup>. Previous reports<sup>4,7</sup> have demonstrated the superiority of the molecular method to the thick blood film technique. However PCR could have its limitations including its high cost and the necessity of adequate equipment and trained technicians. We believe, on the basis of our results, that detection of plasmodial DNA by the first step of nested-PCR, as has already been described in the detection of the *Plasmodium* genus<sup>13</sup>, would be enough to identify APCs with *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae*, thus reducing the costs of analysis in Brazilian blood banks. Furthermore, its cost-effectiveness was already approved in a Canadian study by a decision analysis model<sup>18</sup>. Additionally, the optimum strategy for minimizing the risk of transfusion-transmitted malaria in Brazilian endemic areas is a combination of appropriate donor selection together with donation screening using PCR and other laboratory methods.

According to the Brazilian Blood Donation policies, the control of transfusion-transmitted malaria infections comprises in the interviewing of blood donor candidates using deferral guidelines. Individuals can not donate for one year after a malaria attack or if they have any possible risk of malaria associated with travel or residency<sup>19</sup>. Although, documented cases of post-transfusion malaria have been reported<sup>11,12</sup>,

FUGIKAWA, E.; FORNAZARI, P.A.; PENHALBEL, R.S.R.; LORENZETTI, A.; MAROSO, R.D.; AMORAS, J.T.; SARAIVA, A.S.; SILVA, R.U.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.B.; CAVASINI, C.E. & MACHADO, R.L.D. - Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(1): 1-4, 2007.

it remains unclear whether ACPs may act as reservoirs of this protozoan<sup>12,17</sup>. Nevertheless, an experimental study with asymptomatic carriers blood found an infection rate in *Anopheles darlingi* (the main Brazilian vector) of 1.2%<sup>2</sup> and plasma circulating nucleic acid concentrations have been shown to correlate with indices of prognostic significance in patients with acute pathologies<sup>8</sup>. The number of donors who have a potential risk of malaria is increasing, and there is a corresponding responsibility of collection teams to identify all such individuals with these conditions and pressure on the recruitment staff to replace lost donors<sup>12</sup>. Thus, efficient screening of APCs and/or malaria patients in blood banks from Brazilian endemic areas needs to be improved.

#### RESUMO

##### Triagem molecular de portadores assintomáticos de *Plasmodium* sp. entre Bancos de Sangue da região Amazônica brasileira

A transmissão da malária no Brasil é heterogênea em todas as áreas endêmicas e a presença de portadores assintomáticos de *Plasmodium* sp. (PAPs) na Amazônia brasileira já foi demonstrada. A triagem de pacientes maláricos em bancos de sangue é baseada na seleção dos doadores com relação aos riscos possíveis associados com residência, evidência clínica e/ou os métodos diagnósticos não acurados que aumentam a probabilidade da infecção transmitida por transfusão. Avaliamos a frequência de PAPs em quatro bancos de sangue em áreas distintas da região Amazônica brasileira. O DNA foi obtido a partir de 400 amostras de sangue humano usando o método do fenol-clorofórmio, seguido por um protocolo de nested-PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos. A taxa de positividade variou de 1 a 3% de doadores do sangue das quatro áreas, com uma média de 2,3%. Todos os indivíduos positivos tinham infecções mistas entre o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*. Nenhuma diferença significativa nos resultados foi detectada entre estas áreas; a maioria dos casos originou dos Hemocentros de Porto Velho, do Estado de Rondônia e de Macapá, Estado do Amapá. Embora ainda não esteja claro se os indivíduos PAPs possam agir como reservatórios do parasito, a triagem eficiente de PAPs e de pacientes com malária em bancos de sangue no Brasil das áreas endêmicas necessita ser implementada.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Valéria Fraga, Laurence Moretti and Luciana Conceição for help in laboratory assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (A.R.B.R. and R.L.D.M.). The following institutions are also acknowledged: Faculdade de Medicina e Enfermagem de São José do Rio Preto (research studentship to E.F., A.L., R.S.R.P. and A.L.), CNPq (research fellowship to P.A.F. and R.L.D.M.), Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (research fellowship to A.R.B.R. and R.L.D.M.).

#### REFERENCES

- ALVES, F.P.; DURLACHER, R.R.; MENEZES, M.J. *et al.* - High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 66: 641-648, 2002.

- ALVES, F.P.; GIL, L.H.; MARRELLI, M.T. *et al.* - Asymptomatic carriers of *Plasmodium* sp. as infection source for malaria vector mosquitoes in Brazilian Amazon. *J. med. Entomol.*, 42: 777-779, 2005.
- BOTTIUS, E.; GUANZIROLLI, A.; TRAPE, J.F. *et al.* - Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 90: 15-19, 1996.
- BROWN, A.E.; KAIN, C.K.; PIPITHKUL, J. & WEBSTER H.K. - Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* undetected by conventional microscopy. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 86: 609-612, 1992.
- CAMARGO, E.P.; ALVES, F. & PEREIRA DA SILVA, L.H. - Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet*, 353: 1415-1416, 1999.
- CARTER, R.; MENDIS, K.N. & ROBERTS, D. - Spatial targeting of interventional against malaria. *Bull. Wld Hlth Org.*, 78: 1401-1411, 2000.
- CAVASINI, M.T.V.; RIBEIRO, W.L.; KAWAMOTO, F. & FERREIRA, M.U. - How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 33: 489-492, 2000.
- CHIU, R.W.; RAINER, T.H. & LO, Y.M. - Circulating nucleic acids: diagnostic applications for acute pathologies. *Acta neurochir. (Wien)*, 95(suppl.): 471-474, 2005.
- FERREIRA, M.U.; LIU, Q.; KANEKO, O. *et al.* - Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 59: 474-480, 1998.
- GROBUSCH, M.P.; HÄNSCHKEID, T.; ZOLLER, T.; JELINEK, T. & BURCHARD, G.D. - Rapid immunochromatographic malarial antigen detection unreliable for detecting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis.*, 21: 818-820, 2002.
- KITCHEN, A.D.; BARBARA, J.A.J. & HEWITT, P.E. - Documented cases of post-transfusion malaria occurring in England: a review in relation to current and proposed donor-selection guidelines. *Vox Sang. (Basel)*, 89: 77-80, 2005.
- KITCHEN, A.D. & CHIODINI, P.L. - Malaria and blood transfusion. *Vox Sang. (Basel)*, 90: 77-84, 2006.
- KIMURA, M.; KNEKO, O.; LIU, Q. *et al.* - Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasit. Int.*, 46: 89-95, 1997.
- MACHADO, R.L.D.; GARRET, D.O.; ADAGU, I.S.; WARHURST, D.C. & PÓVOA, M.M. - Simplified diagnosis of malaria infection; GFM/PCR/ELISA a simplified nucleic acid amplification technique by PCR/ELISA. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 40: 333-334, 1998.
- MOODY, A. - Rapid diagnosis tests for malaria parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 66-78, 2002.
- POSTIGO, M.; MENDOZA-LÉON, A. & PEREZ, H. A. - Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 92: 509-511, 1998.
- SCOPEL, K.K.G.; FONTES, C.J.F.; NUNES, A.C.; HOKTA, M.F. & BRAGA, E.M. - High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Aplacá-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta trop.*, 90: 61-64, 2004.
- SHEHATA, N.; KOHLI, M. & DETSKY, A. - The cost-effectiveness of screening blood donors for malaria by PCR. *Transfusion*, 44: 217-228, 2004.

---

FUGIKAHA, E.; FORNAZARI, P.A.; PENHALBEL, R.S.R.; LORENZETTI, A.; MAROSO, R.D.; AMORAS, J.T.; SARAIVA, A.S.; SILVA, R.U.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.B.; CAVASINI, C.E. & MACHADO, R.L.D. - Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **49**(1): 1-4, 2007.

---

19. TORRES, K.L.; FIGUEIREDO, D.V.; ZALIS, M.G. *et al.* - Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasit. Res.*, **17**: 1-6, 2006.

20. WYLIE, B.R. - Transfusion transmitted infection: viral and exotic disease. *Anaesth. Intens. Care*, **21**: 24-30, 1993.

21. VINETZ, J. M. & GILMAN, R.H. - Asymptomatic Plasmodium parasitemia and the ecology of malaria transmission. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **66**: 639-640, 2002.

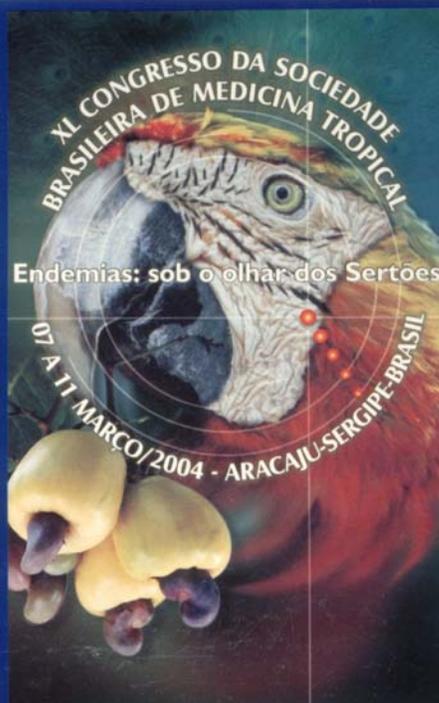
Received: 3 May 2006

Accepted: 16 August 2006

VOL. 37: SUPLEMENTO I, 2004  
ISSN-0037-8682



# REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL



TL-77

**FREQÜÊNCIA FENOTÍPICA DOS GRUPOS SANGÜÍNEOS ABO, MNSS E DUFFY EM DOADORES DE SANGUE E PACIENTES MALÁRICOS DE DUAS ÁREAS ENDÊMICAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA: RESULTADOS PRELIMINARES**

Cavasini, Carlos E. <sup>1</sup>; Alves, Renata T. <sup>1</sup>; Mattos, Luiz C. <sup>1,2</sup>; Couto, A.A. <sup>3</sup>; Maroso, R. <sup>4</sup>; Bonini-Domingos, Cláudia R. <sup>5</sup>; Machado, Ricardo L. D. <sup>1</sup>; 1 - CIM – Centro de Investigação de Microrganismos/FAMERP; 2-Laboratório de Imunogenética Molecular – Hemocentro de São José do Rio Preto; 3- Secretaria de Saúde do Estado do Amapá; 4 - Hemocentro do Estado de Rondônia; 5 -Laboratório de Hemoglobina Genética das Doenças Hematológicas da UNESP. cecavasini@famerp.br

**Introdução:** Os grupos sangüíneos humanos são os sistemas polimórficos amplamente investigados em diferentes populações e em diversas regiões do país, mas em certas áreas, suas freqüências ainda não foram suficientemente estabelecidas. Um dos notáveis casos, no qual, as hemácias são importantes alvos para infecção é a malária. Na interação e posterior invasão dos merozoítos aos eritrócitos há o envolvimento de diferentes receptores eritrocitários e proteínas ligantes para as diferentes espécies de *Plasmodium*. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi verificar as freqüências fenotípica dos grupos sangüíneos ABO, MNSs e Duffy em regiões endêmicas para malária entre doadores de sangue e pacientes maláricos da Amazônia brasileira. **Casística e Métodos:** Foram coletadas, sem distinção de etnia ou sexo, amostras de sangue total em pacientes maláricos adultos (n = 25), atendidos em cada área de estudo (Macapá/AP e Porto Velho/RO) e amostras de indivíduos sem passado malárico nos Hemocentros de cada Estado (n = 100). Estas foram fenotipadas por métodos de hemaglutinação em tubo (ABO) e gel centrifugação DiaMed (MNSs e Duffy). **Resultados:** A maioria da freqüência fenotípica dentro dos grupos sangüíneos ABO, MNSs e DUFFY nas duas populações, foi similar às de trabalhos anteriores. Não foi detectado o fenótipo MN<sup>s</sup>S<sup>s</sup> entre os doadores e pacientes, diferentemente do observado em outras áreas da Amazônia. O fenótipo Duffy negativo (FY:-1,-2) foi encontrado na freqüência esperada para a região norte. A freqüência do fenótipo FY: 1,2 detectada entre os indivíduos maláricos foi de 60% versus 31% entre os doadores, sendo, portanto, estatisticamente significativa (P = 0,010) **Conclusão:** Estes dados fornecem uma estimativa das freqüências dos grupos sangüíneos ABO, MNSs e Duffy em regiões endêmicas para malária e poderão ser utilizados em futuros estudos de associações com doenças infecciosas e parasitárias comuns nestas áreas. Novas análises estão em curso, ampliando a amostragem e as áreas estudadas. Fonte financiadora: FAPESP e DiaMed Brasil.

VOL. 38: SUPLEMENTO I, 2005  
ISSN-0037-8682



# REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL



XLI CONGRESSO  
DA SOCIEDADE  
BRASILEIRA DE  
MEDICINA  
TROPICAL

I ENCONTRO DE  
MEDICINA TROPICAL  
DO CONE SUL

6 A 10 DE MARÇO DE 2005

FLORIANÓPOLIS  
Santa Catarina - Brasil  
Centro de Convenções CentroSul

## PR 290

## GRUPOS SANGÜÍNEOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÕES MALÁRICAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Carlos E. Cavasini<sup>1</sup>; Luiz C. de Mattos<sup>2</sup>; Renata T. Alves<sup>1</sup>; Kátia V. Tiso<sup>1</sup> Álvaro A. Couto<sup>3</sup>; Vanja Sueli P. Calvosa<sup>3</sup>; Cláudia R. Bonini Domingos<sup>4</sup>; Juvanete A. Távora<sup>5</sup>; Ana Sueli Saraiva<sup>6</sup>; Rita Uchôa<sup>7</sup>; Amália Silva<sup>8</sup>; Andréa R. B. Rossit<sup>1</sup>; Ricardo L. D. Machado<sup>1</sup>

1- Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP 2-Laboratório de Imunogenética, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP. Brasil, 3-Secretaria de Saúde do Estado do Amapá/AP, 4- Laboratório de Hemoglobinopatias e Doenças Genéticas, IBILCE/UNESP/ São José do Rio Preto/SP, 5- Hemoap/AP, 6- Hemopa/PA, 7- Hemoacre/AC, 8- Hemeron/RO. E-mail: cecavasini@famerp.br

**Introdução e objetivo:** A aparente função dos sistemas polimórficos de grupos sanguíneos é expressar moléculas antigênicas as quais, além de desencadarem respostas imunes adaptativas, podem atuar como receptores nas interações entre o homem e os microrganismos. Um dos notáveis casos no qual as hemácias são importantes alvos para infecção é a malária, onde há o envolvimento de diferentes receptores eritrocitários e proteínas ligantes para as diferentes espécies de *Plasmodium*, no processo de interação e posterior invasão dos merozoítos aos eritrócitos. O presente estudo descreve as frequências dos fenótipos eritrocitários de ABO, MNSs e Duffy entre doadores de sangue e pacientes maláricos de quatro áreas endêmicas da Amazônia brasileira. **Material & Métodos:** Após consentimento informado foram coletadas amostras de sangue de 417 doadores e 309 pacientes com malária, todos pertencentes a ambos os sexos e com idade acima de 18 anos, oriundos de quatro áreas da região amazônica brasileira (Belém/PA, Macapá/AP, Porto Velho/ RO e Rio Branco/AC) Os doadores, além do relato de nunca haverem contraído malária, foram triados clinicamente e por exames negativos para a doença, enquanto que os pacientes maláricos procuraram assistência médica com sintomatologia característica e exame de gota espessa positiva para o *Plasmodium*. Os fenótipos ABO foram identificados pelo método de hemaglutinação em tubo, enquanto que os MNSs e Duffy por gel centrifugação (DiaMed-ID). Para comparações de proporções envolvendo as populações e análise de dependência foi aplicado o teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Os resultados mostram frequências similares dos fenótipos ABO entre doadores e pacientes maláricos. Em relação ao sistema MNSs, observou-se maiores frequências do fenótipo S<sup>+</sup>s<sup>+</sup> entre os pacientes maláricos de Belém e Rio Branco e do fenótipo S<sup>+</sup>s<sup>+</sup> em doadores de Belém, Porto Velho e Rio Branco (P<0,05). Quanto ao sistema Duffy, na população de Macapá, a frequência do fenótipo FY:-1,2 em doadores foi maior, enquanto que a do fenótipo FY:1,2 mostrou-se mais freqüente em pacientes maláricos (P < 0,05). Já nos doadores de Belém, foi observada uma maior frequência do fenótipo FY:-1,-2 (P<0,05). **Conclusão:** Nenhuma associação entre o grupo ABO e infecções maláricas foi observada. Quanto ao sistema MNSs, as diferenças observadas no fenótipo S<sup>+</sup>s<sup>+</sup> sugerem que o mesmo pode conferir resistência à malária. Já para o sistema Duffy, nossos resultados apontam para possível proteção contra essa infecção entre portadores do fenótipo FY:-1,2, enquanto que naqueles indivíduos cujos alelos estão em heterozigose (FY:1,2) pode haver maior suscetibilidade às infecções por *Plasmodium*. Esses resultados são promissores e a avaliação molecular das regiões polimórficas que codificam os receptores eritrocitários, ora em andamento, permitirá a obtenção de dados adicionais sobre a suscetibilidade diferencial à infecção malárica. Apoio financeiro: FAPESP (02/09546-1); CNPq (302353/2003-8) DiaMed-ID SA; BAP-BIC/FAMERP



S300 Sunday, June 18, 2006

09:45–14:30

Poster Presentations

62.051 **Correlation of the Three Blood Groups Phenotypes Frequencies and Malaria Patients from Brazilian Amazon Region**

C.E. Cavasini<sup>1</sup>, L.C. de Mattos<sup>1</sup>, R.T. Alves<sup>1</sup>, A.A. Almeida Couto<sup>2</sup>, V.S.C. Almeida Couto<sup>3</sup>, C.R. Bonini-Domingos<sup>4</sup>, L. Castilho<sup>5</sup>, R. Maroso<sup>6</sup>, A.R.B. Rossit<sup>1</sup>, **R.L.D. Machado<sup>1</sup>**. <sup>1</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil; <sup>2</sup>SEAMA, Macapá, Brazil; <sup>3</sup>Instituto Evandro Chagas, Belém, Brazil; <sup>4</sup>BILCE/UNESP, São José do Rio Preto, Brazil; <sup>5</sup>UNICAMP, Campinas, Brazil; <sup>6</sup>HEMERON, Porto Velho, Brazil

A large proportion of all malaria cases in South America occurs in the Brazilian Amazon region, with approximately 500,000 cases reported annually. Of the 4 known human malaria parasites, only *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* have been detected in Brazil. Invasion of red blood cells (RBCs) occurs when the extracellular form of the parasite, the merozoite, attaches to the surface of an uninfected RBC. Malaria parasites specifically invade certain species and types of RBCs. The demonstrated specificity of malaria parasites for RBC of particular species and ages appears to depend on a number of ligand-receptor interactions, some of which have been recently defined. RBC receptors related on the invasion process include the ABO system, MNSs and the Duffy blood-group antigen. We have compared ABO, MNSs and Duffy frequencies as determined by serological phenotype in 417 blood donors and 309 malaria patients from four Brazilian Amazon areas. The controls were matched to the patients with respect to age ( $\pm 5$  years), gender and ethnicity. All of the controls subjects were genetically independent. A blood sample was collected from both groups (Four areas from Brazilian Amazon region), after informed consent. The ABO phenotypes were classified using hemagglutination standard test in tube whereas MNSs and Duffy were phenotyped using a microtyping kit (DiaMed-ID Micro typing System). In order to access the significance of the variables and to obtain the independence among the proportions we used the Fisher's exact test. Our results suggest no correlation between ABO phenotypes and malaria infection in all areas studied. We observed significant correlation between S+s+ and S+s- phenotypes and malaria infection in three areas. Some of the Duffy phenotypes showed significant correlation between donors and malaria patients in different areas. These data represent an additional contribution towards the establishment of differential host susceptibility to malaria. Grant Support: FAPESP (02/09546-1)

Table 1: Frequencies of ABO, MNSs and Duffy phenotypes among blood donors and patients infected with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazon (samples collected in 2003 to 2005).

	BELEM - PA			MACAPA - AP			PORTO VELHO-RO			RIO BRANCO-AC		
	Donors (100)	Patients (100)		Donors (117)	Patients (108)		Donors (100)	Patients (117)		Donors (100)	Patients (84)	
Blood Group		Pv (85)	Pf (15)		Pv (64)	Pf (44)		Pv (83)	Pf (34)		Pv (56)	Pf (28)
<b>ABO</b>												
A	19,0	25,0	2,0	27,0	17,0	10,0	19,0	22,0	9,0	33,0	15,0	4,0
B	14,0	11,0	4,0	11,0	9,0	6,0	14,0	7,0	3,0	12,0	4,0	3,0
AB	3,0	4,0	–	7,0	–	–	3,0	5,0	2,0	1,0	4,0	–
O	64,0	45,0	9,0	72,0	38,0	28,0	64,0	49,0	20,0	54,0	33,0	21,0
<b>MNSs</b>												
M <sup>+</sup> N <sup>+</sup> S <sup>+</sup> s <sup>+</sup>	18,0	22,0	7,0**	25,0	18,0	12,0	23,0	15,0	7,0	23,0	11,0	4,0
M <sup>+</sup> N <sup>+</sup> S <sup>+</sup> s <sup>-</sup>	1,0	2,0	–	5,0	1,0	1,0	2,0	6,0	1,0	2,0	–	–
M <sup>+</sup> N <sup>+</sup> S <sup>-</sup> s <sup>+</sup>	24,0	17,0	3,0	25,0	11,0	11,0	31,0*	13,0	7,0	31,0	10,0	7,0
M <sup>+</sup> N <sup>+</sup> S <sup>-</sup> s <sup>-</sup>	12,0	16,0	2,0	24,0	16,0	6,0	9,0	16,0	6,0	9,0	15,0	9,0**
M <sup>+</sup> N <sup>-</sup> S <sup>+</sup> s <sup>-</sup>	7,0*	1,0	–	4,0	–	1,0	1,0	4,0	3,0	1,0	2,0	1,0
M <sup>+</sup> N <sup>-</sup> S <sup>-</sup> s <sup>+</sup>	10,0	11,0	–	8,0	6,0	2,0	13,0	17,0	5,0	13,0	11,0	3,0
M <sup>-</sup> N <sup>+</sup> S <sup>+</sup> s <sup>+</sup>	12,0	10,0	1,0	11,0	5,0	4,0	3,0	4,0	4,0	3,0	3,0	2,0
M <sup>-</sup> N <sup>+</sup> S <sup>+</sup> s <sup>-</sup>	–	1,0	–	–	–	2,0	–	–	–	–	–	–
M <sup>-</sup> N <sup>+</sup> S <sup>-</sup> s <sup>+</sup>	16,0*	5,0	2,0	15,0	5,0	9,0	18,0*	8,0	1,0	18,0*	4,0	2,0
<b>DUFFY</b>												
Fy <sup>a+</sup> Fy <sup>b-</sup>	32,0	25,0	5,0	37,0	18,0	13,0	26,0	25,0	10,0	26,0	13,0	4,0
Fy <sup>a-</sup> Fy <sup>b+</sup>	33,0	25,0	9,0	44,0*	15,0	7,0	34,0	25,0	12,0	34,0	17,0	7,0
Fy <sup>a+</sup> Fy <sup>b+</sup>	27,0	35,0**	1,0	28,0	30,0**	23,0	37,0	32,0	11,0	37,0	26,0	17,0
Fy <sup>a-</sup> Fy <sup>b-</sup>	8,0*	–	–	8,0	1,0	1,0	3,0	1,0	1,0	3,0	–	–

Fisher Test = \*p<0,05 in donors \*\*p<0,05 in patients

Pv = *Plasmodium vivax*

Pf = *Plasmodium falciparum*

VOL. 40: SUPLEMENTO I, 2007  
ISSN-0037-8682



# REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL



**MA044****CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DO SISTEMA SANGÜÍNEO DUFFY DE PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax* E DE DOADORES DE SANGUE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.**

CAVASINI C, E,<sup>1</sup>; GOLLINO, Y<sup>1</sup>; MORETTI L, J<sup>1</sup>; COUTO A, A, A<sup>2</sup>, F;  
ROSSI A, R, B<sup>1</sup>; MATTOS L, C<sup>1</sup>; MACHADO R, L, D<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Microrganismos, departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP; <sup>2</sup>Faculdade SEAMA, Amapá, AP.

**Objetivos:** Determinar as freqüências alélicas e genótípicas do gene do sistema sangüíneo Duffy de indivíduos maláricos e não maláricos da Amazônia brasileira. **Materiais e Métodos:** Foram triados 307 indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* e 200 doadores de sangue negativos pelo diagnóstico molecular para o Plasmodio. A genotipagem foi realizada pelo método PCR/RFLP. Para análise de independência entre as proporções foi aplicado o teste exato de Fisher ( $\alpha < 5\%$ ). **Resultados:** O genótipo *FY1FY2* foi o mais freqüente nas duas populações estudadas. O genótipo *FY1/FY2<sup>ES</sup>* foi o menos detectado nos pacientes maláricos e o genótipo *FY1/FY1* nos doadores de sangue. O genótipo Duffy negativo (*FY2<sup>ES</sup> /FY2<sup>ES</sup>*) foi detectado em 5,0% dos doadores de sangue, enquanto que nenhum indivíduo infectado apresentou este genótipo. As freqüências genótípicas e alélicas foram semelhantes nos grupos estudados, exceto para a presença do alelo *FY<sup>ES</sup>*, que foi estatisticamente significante menor no grupo de pacientes maláricos. **Conclusões:** Nossos resultados permitiram demonstrar menor freqüência de infecção por *P. vivax* nos indivíduos portadores do alelo *FY2<sup>ES</sup>*. A fim de compreender o papel destes polimorfismos do gene do sistema sangüíneo Duffy nos pacientes, estudos estão sendo conduzidos em nosso laboratório avaliando a região promotora do gene *FY*. Estes polimorfismos podem demonstrar uma significativa associação com a suscetibilidade ou resistência à malária. Contudo, há que se acompanhar longitudinalmente grupos de pessoas portadoras deste alelo para melhor esclarecer essa relação parasito/hospedeiro na população da região Amazônica brasileira.

**Fonte financiadora:** FAPESP (02/09546-1); CNPq (302353/03); BAP – FAMERP/FUNFARME

## Conclusões

1. Os fenótipos do grupo sanguíneo ABO não diferem pacientes e controles. A frequência mais elevada dos fenótipos heterozigotos (S-s+) e (S+s-) em doadores de sangue sugere proteção contra infecção por *P. falciparum*, enquanto indivíduos com fenótipo homozigoto (S+s+) podem ser mais suscetíveis à infecção por essa espécie de *Plasmodium*. Em relação ao sistema Duffy a susceptibilidade a infecção por *P. vivax* parece ser conferida pelo fenótipo Fy(a+b+).
2. Os genótipos *FYA/FYB*; *FYA/FYB-33* e *FYB-33/FYB-33* diferenciam pacientes e doadores, sendo o primeiro mais freqüente em indivíduos com infecção por *P. vivax* e os dois últimos naqueles sem malária (doadores).
3. Indivíduos *FYA/FYB* apresentam susceptibilidade aumentada à malária e o alelo *FYB-33* confere resistência demonstrada por sua maior freqüência em doadores, sugerindo vantagem seletiva contra infecção por *P. vivax* nessa região.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Collins WE, Jeffrey GM. A retrospective examination of mosquito infection on humans infected with *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg 2003;68: 366-371.
2. Calvosa VSP, Adagu IS, Póvoa MM. *Plasmodium falciparum*: emerging mefloquine resistance in vitro in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 330-331.
3. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. Nature 2002; 415: 680-685.
4. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 2005; 434(7030): 214-217.
5. Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: Burden of Disease. Curr Mol Med 2006; 6: 137-140.
6. Mendis KN, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 97-106.
7. Carter R, Mendis KN. Evolucionary and historic aspects of the burden of malaria. Clin Microbiol 2002; 15(4): 564-695.
8. Kochar DK, Saxena V, Sing N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* Malaria. Emerg Infec Dis 2005; 11(1): 132-134.
9. Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, Matos CJ, Boulos M. Acute respiratory sitress síndrome due to vivax malaria: case report and literatura reviwe. Braz J Infect Des 2005; 9: 425-430.

10. Picot S. Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? *Med Mal Infect* 2006; 36: 406-413.
11. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2007.
12. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the infection site. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1.215-1222.
13. Sinnis P, Nussenzweig V. Preventing sporozoite invasion of hepatocytes. In: Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS. *Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana*. São Paulo: Manole Editora 1996; p. 5.
14. Mota MM, Rodrigues A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *Biossay* 2002; 24: 149-156.
15. Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1.413-1.429.
16. Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *TRENDS in Parasitol* 2003; 19(5): 209-213.
17. Dyer M, Day KP. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 2000; 16: 102-107.
18. Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1.539-1.345
19. Milon G, David PH. Transmission stages of *Plasmodium*: does the parasite use the one same signal, provided both by the host and the vector; for gametocytogenesis and sporozoite maturation? *Parasitol* 1999; 41: 159-162.

20. Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 1975; 187: 748-750.
21. Bannister LH, Butcher GA, Dennis ED, Mitchell GH. Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites in vitro. *Parasitology* 1975; 71: 483-491.
22. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* 1978; 77: 72-82.
23. Miller LH, Aikawa M, Johnson JG, Shiroishi T. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation *J Exp Med* 1979; 149: 172-184.
24. Fowler RE, Margos G, Mitchell GN. The cytoskeleton and motility in apicomplexan invasion. *Adv Parasitol* 2004; 56: 213-263.
25. Cowman B, Crabb A. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006; 124: 755-766.
26. Bannister LH, Dluzewski AR. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells* 1990; 16: 257-292.
27. Chitnis CE, Blackman MJ. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitology* 2000; 16: 411-415.
28. Pandey KC, Singh S, Pattnaik P, Pillai CR, Pillai U, Lynn A et al. Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 123: 23-33.

29. Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, Cowman AF. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and –independent pathways. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 4796-4801.
30. Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC, Patel SS, Kazura JW, Zimmerman PA et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. Nat Med 2003; 9:87-92.
31. Dolan SA, Miller LH, Wellems TE. Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. J Clin Invest 1990; 86: 618-624.
32. Galinski MR, Medina CC, Ingravallo I, Barnwell JW. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. Cell 1992; 69:1213-1226.
33. Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. Mol Biochem Parasitol 1991; 44: 125-132.
34. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzesna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:10793-10797.
35. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. N Eng J Med 1976; 295:302-304.
36. Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Duntons RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R: Evidence for

transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 775-581.

37. Welch SG, McGregor IA, Williams K: The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977, 71(4):295-296.
38. Haynes JD, Dalton JP, Klotz FW, McGinniss MH, Hadley TJ, Hudson DE, et al. Receptor-like specificity of a *Plasmodium Knowlesi* malarial protein that binds to Duffy antigen ligands on erythrocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 1873-1881.
39. Barnwell JW, Nichols ME, Rbinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plamodium vivax*. *J Exp Med* 1989; 169:1795-1802.
40. Barnwell JW, Galinski MR. Invasion of Vertebrate Cells: Erythrocytes. In U Frevert, A Crisanti, *Malaria Parasite, Pathogenesis and Protection*. Sherman IW, Washington 1998; p. 73-92.
41. Adams JH, Sim BKL, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7085-7089.
42. Chitnis CE, Miller LH. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 1994; 180:497-506.
43. Ranjan A, Chitnis CE. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14067-14072.

44. Hans D, Pattnaik P, Bhattacharyya A, Shakri AR, Sharma M, Choe H, Farzan M, Chitnis CE. Mapping binding residue in the Plasmodium vivax domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Mol Microbiol* 2005; 55: 1.423-1.434.
45. Ampudia E, Patarroyo MA, Patarroyo ME, Murillo LA. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of Plasmodium vivax in Colombian wild isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 78: 269-272.
46. Xainli J, Adams JH, King CL. The erythrocyte binding motif of Plasmodium vivax Duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111: 253-260.
47. Lewis Jr GE, Miller LH, Ibrahim L, Wong PW, McGinniss M, Ooi WL: Duffy phenotypes in Malaysian populations: correction of previous unusual findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, 82: 509-510.
48. Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, Hutz MH. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. *Am J Hum Biol* 2003; 15: 824-834.
49. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena, SD: The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001, 68: 281-286.
50. Bortolini C, Weimer TA, Franco MH, Salzano FM, Layrisse Z, Schneider H, Schneider MP: Genetic studies in three South American black populations. *Gene Geogr* 1992, 6:1-16.

51. Salzano FM, Bortolini MC. Normal genetic variation at the protein, glycoconjugate and DNA levels. In: *The Evolution and Genetics of Latin American Population*. Cambridge University Press 2002; p. 255.
52. Schoroeder M L, Rayner H L. Red Cell, Platelet, and White Cell Antigens. In *Wintrobe's CLINICAL HEMATOLOGY*. Philadelphia – London. LEA & FEBIGER 1993. p. 617-624.
53. Garratty G, Dzik W, Issitt PD, Lublin DM, Reid ME, Zelinski T. Terminology for blood group antigens and genes - historical origins and guidelines in the new millennium. *Transfusion* 2000; 40:477-89.
54. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jorgensen J, Judd WJ, et al. Blood group terminology 2004. From the ISBT Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens. *Vox Sang* 2004; 87: 304-316.
55. Daniels, G. Blood group polymorphisms: molecular approach and biological significance. *Tsfs Clin Biol* 1997; 4:383-390.
56. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transplant Immunol* 2005; 14: 143-153.
57. Daniels, G. *Human blood group*. Blackwell Science, London, 1995, 737p.
58. Moulds JM, Moulds JJ. Blood Group Associations With Parasites, Bacteria, and Viruses. *Transf Med Rev* 2000, 14(4): 302-311.
59. Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 163-199.
60. Chester MA, Olson ML. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001; 15: 229-233.

61. Batissoco AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25(1): 47-58.
62. McKusick VA. The morbid anatomy of the human genome: A review of gene mapping in clinical medicine. *Medicine* 1986; 65:1.
63. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M (eds). *Blood Trransfusion in Clinical Medicine*, 8<sup>th</sup> Ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1987.
64. ABO, H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. In *TECHNICAL MANNUAL*. Bethesda, Maryland. American Association of Blood Banks. 1996. p. 229-45.
65. Blumenfeld OO, Huang, C-H. Molecular Genetics of the Glycophorin Gene Family, the Antigens for MNSs Blood Groups: Multiple Gene Rearrangements and Modulation of Splice Site Usage Result in Extensive Diversification. *Human Mutation* 1995; 6:199-209.
66. Rolih S. Biochemistry of MN antigens. In *Blood Group Systems: MN and Gerbich*, eds PJ Unger, B Laird-Ffryer. Arlington: American Association of Blood Banks, 1989.
67. Beiguelman B. O sistema MNS. In: Beiguelman B. *Os Sistemas Sagüíneos Eritrocitários*. Ribeirão Preto: FUNPEC – Editora 2003; p. 87.
68. Holliman SM. The MN blood group system: Distribution, serology and genetics. In *Blood Group Systems: MN and Gerbich*, eds PJ Unger, B Laird-Ffryer. Arlington: American Association of Blood Banks, 1989.
69. Anstee DJ, Edwards PAW. Monoclonal antibodies to human erythrocytes. *Eur J Immunol* 1982; 12: 228.

70. Race RR, Sanger R: Blood groups in man. 6<sup>th</sup> ed, Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975.
71. Hadley TJ, Peiper C. From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997; 89:3077-91.
72. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzesna V, Pogo AO. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and Simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individual. *Blood* 1995; 85:615-21.
73. Hesselgesser J, Horuk R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 1999; 5(1): 13-26.
74. Beiguelman B. O sistema Duffy. In: Beiguelman B. Farmacogenética e sistema sangüíneos eritrocitários. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 172-4.
75. Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy group system in Caucasians. Evidence for a new allele. *Am J Hum Genet* 1965; 17:384-9.
76. Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. *Semin Hemat* 2000; 37:122-129.
77. Albrey JA, Vincent EE, Hutchinson J, Marsh WL, Allen FH Jr, Gavin J, et al. A new antibody, anti-Fy3, in the Duffy blood group system. *Vox Sang* 1971; 20(1): 29-35.
78. Behzad O, Lee CL, Gavin J, Marsh WL. A new anti-erythrocyte antibody in the Duffy system: anti-Fy4. *Vox Sang* 1973; 24: 337-342.

79. Colledge KI, Pezzulich M, Marsh WL. Anti-Fy5, and antibody disclosing a probable association between the Rhesus and Duffy blood group genes. *Vox Sang* 1973; 24(3): 193-199.
80. Nichols ME, Rubinstein P, Barnwell J, Cordoba SR, Rosenfield RE. A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. *J Exp Med* 1987; 166:776-785.
81. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Johnson C, Nichols M, Rubinstein P, Marsh W, et al. Purification and characterization of a erythrocyte membrane protein complex carrying Duffy blood group antigenicity. Possible receptor for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* malaria parasite. *J Biol Chem* 1989; 264:13770-13774.
82. Horuk R, Chitnis CE, Darbone WC, Colby TJ, Rybichi A, Hadley J, et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Sci* 1993; 261:1182-1184.
83. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90(3): 909-928. Review.
84. Chaudhuri A, Nielsen S, Elkjaer ML, Zbrzezna V, Fang F, Pogo AO. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. *Blood* 1997; 89:701-712.
85. Ahuja SK, Gao JL, Murphy M. Chemokine receptor and molecular mimicry. *Immunol Today* 1994; 15:281-287.
86. Peiper SC, Wang Z, Neote K, Martin AW, Showell HJ, Conklyn MJ. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individual who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med* 1995; 181:1311-1317.

87. Horuk R. The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. *Immun Today* 1994; 15:169-174.
88. Neote K, Mak JY, Jr, Kolakowski LF, Schall TJ. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 1994; 84:44-52.
89. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994; 269:7835-7838.
90. Murphy PM. The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptor. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 593-633.
91. Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA: Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968, 61:949-955.
92. Collins A, Keats BJ, Dracopoli N, Shields DC, Morton NE. Integration of gene maps: chromosome 1. *Proc Natl Acad Science USA* 1992; 89:4598-4602.
93. Mathew S, Chaudhuri A, Murty VV, Pogo AO. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (*FY*) at 1q22→q23 by fluorescence in situ hybridization. *Cytog Cell Genet* 1994; 67:68.
94. Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group  $Fy^a/Fy^b$  alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 1995; 85(3): 622-626.

95. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Bood* 1996; 87:378-385.
96. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Kim CLV. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individual. *Nat Genet* 1995; 10:224-228.
97. Masouredis SP, Sudora E, Mahan L, Victoria EJ. Quantitative immunoferritin microscopy of Fya, Fyb, Jka, U, and Dib antigen site numbers on human red cell. *Blood* 1980; 56(6): 969-977.
98. Woolley IJ, Hotmire KA, Sramkoski RM, Zimmerman PA, Kazura JW: Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and *FY* genotype. *Transf* 2000, 40:949-953.
99. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ: Mutation in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup> antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a<sup>-</sup>b<sup>-</sup>) phenotype. *B J Hematol* 1995, 90:823-829.
100. Wasniowska K, Lisowska E, Halverson GR, et al. The Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>6</sup> and Fy<sup>3</sup> epitope of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy<sup>3</sup> epitope. *Br J Haematol* 2004; 124(1): 118-122.
101. Le Pennec PY, Rouger P, Klein MT, Robert N, Salmon C. Study of anti-Fy<sup>a</sup> in five black Fy(a<sup>-</sup>b<sup>-</sup>) patients. *Vox Sang* 1987; 52(3): 246-249.
102. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF, Reid MR: A novel Fy allele in Brazilians. *Vox Sang* 2004, 87:190-195.

103. Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (*FY*) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion* 1998(b); 38:168-173.
104. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, et al. The *Fy(x)* phenotype is associated with a missense mutation in the *Fy(b)* allele predicting Ar89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol* 1998(a); 103(4): 1184-1189.
105. Yazdanbakhsh M, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME: Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transf* 2000, 40:310-320.
106. Tournamille C, Kim CLV, Gane P, Pennec PYL, Roubinet F, Babinet J et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in *Fy\** individuals. *Blood* 1998; 92:2147-2156.
107. Parasol N, Reid M, Rios M, Castilho L, Harari I, Kosower S. A novel mutation in the coding sequence of the *FY\*B* allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood* 1998; 92:2237-2243.
108. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Kazura JW: Emergence of *FY\*A<sup>null</sup>* in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Med Sci* 1999, 96:13973-13977.
109. Michon P, Woolley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH: Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and

- abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. FEBS Letters 2001, 495:111-114.
110. Kasehagem LJ, Mueller I, Kiniboro B, Bockarie MJ, Reeder JC, Kazura JW., Kastens W, McNamara DT, King CH, Whalen CC, Zimmerman PA: Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygote. PLoS ONE 2007, 2(3):e336.
111. Shimizu Y, Kimura M, Settheetham-Ishida W, Duangchang P, Ishida T. Serotyping of Duffy blood group in several Thai ethnic groups. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28:32-35.
112. Shimizu Y, Hiroko AO, Augustinus S, Tiwawech D, Settheetham-Ishida W, Kayame OW, et al. Sera and Molecular Typing of Duffy Blood Group in Southeast Asians and Oceanians. Hum Biol 2000; 72(3): 511-518.
113. Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, Sausai L, Gomensoro-Garcia AE, Hannon J, et al. New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either *FYA* or *FYB*. Br J Haematol 2000; 108: 448-454.
114. Tournamille C, Kim CLV, Ganet P, Blanchard D, Proudfoot AE, Cartron JP et al. Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding. J. Biol Chem 1997; 272:16274-16280.
115. Mourant A, Kopec A, Domaniewska-Sobczak K: The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms. Oxford Press, 1976.
116. Dornelles CL, Callegari-Jacques SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHL, Hickmann AC, Geiger CJ, Salzano FM: Genetics, Surnames,

- Grandparents' Nationalities, and Ethnic Admixture in Southern Brazil – Do the Patterns of Variation Coincide? *Gen Mol Biol* 1999, 22(2):151-161.
117. Parasol N, Cohen N, Zemishlany Z, Lerer B, Kosower NS. Duffy Antigen/Receptor for Chemokines (DARC): Genotypes in Ashkenazi and Non-Ashkenazi Jews in Israel. *Hum Biol* 2001; 73(2): 307-313.
118. Stalote AC, Proto-Siqueira R, Da Silva Jr WA, Zago MA, Palatnik M: The mutation G298A→Ala100Thr on the coding sequence of the *Duffy* antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians. *Gen Mol Res* 2005, 4(2):166-173.
119. Salzano FM, Callegari-Jacques SM. South Amerindian Indians. A case study in evolution. Clarendon Press. Oxford, UK 1988.
120. Novaretti MCZ, Dorlbiac-Llacer PE, Chamone DAF: Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. *Rev Bra Hematol Hemoter* 2000, 22:23-32.
121. Montoya F, Restrepo M, Montoya A E, Rojas W. Blood Groups and Malaria. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1994; 36: 33-38.
122. Lell B, May J, Schmidt-Ott R J, Lehman L G, Luckner D, Greve B, et al. The Role of Red Blood Cell Polymorphisms in Resistance and Susceptibility to Malaria. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 794-799.
123. Barnwell JW & Galinski MR. *Plasmodium vivax*: a glimpse into the unique and shared biology of the merozoite. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995; 89(2): 113-120.

124. Cserti CM, Dzik WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* 2007; Blood First Edition Paper, prepublished online May 14, 2007; 1-27.
125. Bayoumi RA, Bashir AH, Abdulhadi NH. Resistance to *falciparum* malaria among adults in central Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 45-55.
126. Santos SEB, Salzano FM, Franco MHL, Freitas MJM. Mobility, genetic markers, susceptibility to malaria and race mixture in Manaus, Brazil. *J Hum Evol* 1983; 12: 373-381.
127. Beiguelman B, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Nunes ACS, Heckmann MIO, Ferreira RGM, Pereirara da Silva LH, Camargo EP, Krieger H: The Association of Genetic Markers and Malaria Infection in the Brazilian Western Amazonian Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, 98(4):455-460.
128. Udomsangpetch, R., J. Todd, J. Carlson and B. M. Greenwood. The effects of haemoglobin genotype and of ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1993; 48: 149-153.
129. Carlson J, Nash GB, Gabutti V, Al-Yaman F, Wahlgren M. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* 1994; 84 (11):3909-3914.
130. Al-Yaman, F., B. Genton, D. Mokela, A. Raiko, S. Kati, S. Rogerson, et al. Human cerebral malaria: lack of significant association between erythrocyte rosetting and disease severity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1995; 89: 55-58.

131. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect. Immun.* 1995; 63(6):2323-2326,
132. Rowe JA, Moulds, JM, Newbold CI, Miller LH. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 1997; 388: 292-295.
133. Ficher, P., P. Boone. Severe malaria associated with blood group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58: 122-123.
134. Uneke CJ. *Plasmodium falciparum* malaria and ABO blood group: is there any relationship? *Parasitol Res* 2007; 100: 759-765.
135. Hill AVS. Malarial resistance genes: a natural selection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86: 225-226, 232.
136. Barragan A, Peter GK, Mats W, Johan C. Blood Group A Antigen Is a Coreceptor in *Plasmodium falciparum* Rosetting. *Infection and Immunity* 2000; 68(5): 2971-2975.
137. Pathirana SL, Alles HK, Bandar S, Phone-Kyaw M, Perera MK, Wickremasinghe AR et al. ABO-blood-group types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99(2): 119-124.
138. Loscertales Maria-Paz, Bradin BJ. ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gâmbia: a role for histo-blood groups in placental malaria? *Malaria J* 2006; 5: 72.

139. Miller LH. Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:2415-2419.
140. Weatherall DJ. Host genetics and infectious disease. Parasitology 1996;112: (Supl) 23-29.
141. Pasvol G, Jungery M, Weatherall DJ, Pearsons SF, Anstee DJ, Tanner MJ. Glycophorin as a possible receptor for *Plasmodium falciparum*. Lancet 1982; 2(8305): 947-950.
142. Naka I, Ohashi J, Patarapotikel J, Hananantachai H, Wilairatan P, Looareesuwan S, et al. The genotypes of GYPA and GYPB carrying the MNSs antigens are not associated with cerebral malaria. J Hum Genet 2007; 52: 476-479.
143. Dolan AS, Proctor JL, Alling DW, Okubo Y, Wellems TE, Miller LH. Glycophorin B as a EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. Mol Biochem Parasitol 1994; 64(1):55-63.
144. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. Science 1975; 189:561-562.
145. Spencer HC, Miller LH, Collins WE, Knud-Hansen C, McGinnis MH, Shiroishi T et al. The Duffy blood group and resistance to *Plasmodium vivax* in Honduras. Am J Trop Med Hyg 1978; 27:664-670.
146. Miller LH, McAuliffe FM, Mason SJ: Erythrocyte Receptor for Malaria Merozoites. Am J Trop Med Hyg 1977, 26(6):204-208.
147. Livinstone FB. The Duffy blood groups, *vivax* malaria, and malaria selection in human populations: a review. Hum Biol 1984; 56:413-25.

148. Hamblin MT, Rienzo AD. Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1669-1679.
149. Guerreiro J.F., Chautard-Freire-Maia. ABO and Rh Blood Groups, migration and estimates of racial admixture for the population of Belém, State of Pará, Brazil. *Rev Bras Genet* 1988; 11: 171-186.
150. Colauto EMR, Barraviera B, Meira DA, Matsubara LS, Pellegrino Júnior J, Machado PEA. Malária no município de Humaitá, estado do Amazonas XII – frequência de fatores de resistência eritrocitária na população geral e em doentes: hemoglobinas e sistema sanguíneo Duffy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1981; 23 (supl. 5):72-78.
151. Cavasini CE, Pereira FJT, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU. Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001;34(6):591-595.
152. Ferreira RGM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LMA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H: Ethnic Admixture Composition of Two Western Amazonian Populations. *Hum Biol* 2002, 74:607-613.
153. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Pereira da Silva LH, Camargo EP: High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian population. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 66(6): 641-648.
154. Camargo LMA, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Basano SA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H: A Rural Community in a

Brazilian Western Amazonian Region: Some Demographic and Epidemiological Patterns. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, 97(2): 193-195.

155. Souza TN, Sanchez BAM, Cerávolo IP, Carvalho LH, Brito CFA: Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the *Plasmodium vivax* invasion receptor. Vox Sng 2007; 92: 373-380.
156. Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. Exp Parasitol 1989; 69(4): 340-350.
157. Zimmerman PA, Patel SS, Maier AG, Bockarie MJ, Kazura JW. Erythrocyte polymorphisms and malaria parasite invasion in Papua New Guinea. TRENDS Parasitol 2003; 19(6): 250-252.
158. Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Some Aspects of Epidemiology and Control of Malaria in Brazil. Res Rev Parasitol 1998; 58(3-4): 163-167.
159. Loiola CCP, Magalhães da Silva CJ, Tauil PL. Controle da Malária no Brasil: 1965 – 2001. Rev Panam Salud Publica 2002; 11: 235-244.
160. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, 2006.
161. Machado RLD, D'Almeida Couto AAR, Cavasini CE, Calvosa VSP. Malária em região extra-Amazônica: situação no Estado de Santa Catarina. Rev Soc Bra Med Trop 2003(a); 36(5): 581-586.
162. Moore DV, Lanier SR. Observations on two *Plasmodium* infections with an abnormal response to chloroquine. Am J Trop Med Hyg 1961; 10: 5-9.

163. Whitby M. Drug resistant *Plasmodium vivax* malaria. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 673-752.
164. Alecrim MGC, Alecrim W, Macêdo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquin (R2) and mefloquina (R3) in Brazilian Amazon region. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32: 67-68.
165. Good MF. Towards a blood-stage vaccine for malaria: Are we following all the leads? Nature Reviews 2001; 1: 117-125.
166. Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects. Scand J Immunol 2002; 56: 327-343.
167. Kawamoto F, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS. How prevalent are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia? Parasitology Today 1999; 15: 422-426.
168. Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33: 489-492.
169. Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel RSR, Lorenzitti A, Maroso RD, Amoras JT, et al. Molecular Screening of *Plasmodium sp.* Asymptomatic Carriers among Transfusion Center from Brazilian Amazon Region. Rev Inst Med Trop S Paulo 2007; 49(1): 1-4.
170. Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, et al. Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. Parasitology 2000; 121: 257-272.

171. Machado RLD, Pova MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 377-381.
172. Machado RLD, de Figueredo Filho AF, Calvosa VS, Figueredo MC, Nascimento JM, Pova MM. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. *Braz J Infect Dis* 2003b; 7(3): 175-177.
173. Souza-Neiras WC, Storti de Melo LM, Machado RLD. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2007; 102(2): 245-254.
174. Souza TN, Cerávolo IP, Fontes CJF, Couto A, Carvalho LH, Brito CFA: The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol* 2006, 146:251-254.
175. Ferreira MU, Karunaweera ND, Silva-Nunes M, Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population Structure and Transmission Dynamics of *Plasmodium vivax* in Rural Amazonia. *J Infect Dis* 2007; 195(8): 1.218-1.226.

## APÊNDICE I



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
AUTARQUIA ESTADUAL - LEI Nº 8899 ,de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179, de 14/06/74 )

Parecer n.º 214/2002

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo nº. 5386/2002 sob a responsabilidade de Andrea Regina Baptista Rossit e Ricardo Luiz Dantas Machado com o título "Epidemiologia e diagnóstico molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias humanas" e os sub-projetos 1) Distribuição dos agentes causadores da malária e sua correlação com os polimorfismos eritrocitários, hemoglobinopatias e deficiência da G-6PD na Amazônia brasileira - 2) Avaliação da Prevalência e do Perfil de sensibilidade antifúngica em espécies do gênero *Candida* spp., em um hospital escola de nível terciário estão de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foram aprovados por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 09 de dezembro de 2002.

  
PROF.ª. DR.ª. PATRÍCIA MALUF CURY  
COORDENADORA DO CEP/FAMERP

## APÊNDICE II

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
Polimorfismos eritrocitários e a suscetibilidade à Malária na Amazônia brasileira.

### TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO

A malária é uma doença encontrada principalmente na Região Amazônica, e os principais sintomas são febre intermitente, calafrio e cefaléia. Este projeto visa avaliar as diferenças genéticas de várias populações do plasmódio da Região Amazônica brasileira, tentando oferecer informações sobre as diversidades encontradas deste parasita, bem como obter subsídios relevantes para o desenvolvimento de estratégias de controle. Sua participação será de extrema importância no estudo da diversidade deste parasita e lhe será garantido sigilo sobre todas as informações coletadas.

Para sua segurança o material utilizado na coleta de sangue será individual e não contaminado, isto é, um material (seringa, agulha, lâmina, algodão com álcool) para cada pessoa, e que depois será colocado em saco de lixo e descartado em local seguro.

De acordo com as recomendações que resultaram da Conferência Internacional de Helsinque (1964) e Tóquio (1975), o presente termo de participação e consentimento apenas confirma sua aprovação, autorização e colaboração ao estudo proposto, em obediência à portaria 196/96 do Ministério da Saúde do Brasil.

Declaro para os devidos fins, que tomei conhecimento do conteúdo do projeto “Malária na Amazônia brasileira.”, e que concordo em participar do mesmo, cedendo sangue venoso, bem como que o material cedido destina-se apenas a análise científica e não pode ser comercializado.

....., ..... de ..... de .....

-----  
--

*Pesquisador Responsável*  
*Prof. Carlos Eugênio Cavasini*  
**FAMERP - Centro de Investigação de Microrganismos**  
**FONE: (0xx17) 2275733 R. 1143/1187**  
**Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416**  
**Vila São Pedro – CEP 15090-000**

-----  
*Pais ou Responsável*

**APÊNDICE III**

Distribuição dos agentes causadores da malária e sua correlação com os grupos sanguíneos, polimorfismos eritrocíticos e hemoglobinopatias na Amazônia brasileira.

Ficha Epidemiológica

Nº da amostra: .....Data: .....

Nome: ..... Raça: .....

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

Endereço: .....

Quanto tempo mora neste endereço?.....

Deslocou nos últimos 30 dias?.....

Endereço nos últimos 10 anos:

1- ..... Período:.....

2- ..... Período: .....

3-..... Período: .....

Usa alguma proteção individual?

( )S ( )N Se sim, qual? .....

Doenças tropicais:

( ) malária ( )Leishmaniose ( )Doença de Chagas ( )Toxoplasmose

Quantas vezes? ..... Última malária.....Tipo:.....

Já fez transfusão de sangue? ( )S ( )N Quantas?.....

Está tomando medicamento?.....

História clínica atual:.....

.....

Temperatura corporal: .....Tipo sanguíneo: ..... Fator Rh:.....

Se mulher, está grávida? ( )S ( )N

Quantas gravidez anteriores ? .....Filho prematuro? ( )S( )N Quando? .....

**OBS:**.....  
 .....  
 ...

## ANEXO I

### **Fenotipagem dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, MNS e Duffy.**

Os fenótipos eritrocitários do sistema ABO foram identificados por métodos de hemaglutinação padronizados em tubos, com a utilização de anti-soros Anti-A, Anti-B e Anti-AB (DiaMed<sup>®</sup>). Para a identificação dos fenótipos MNSs e Duffy foram utilizados cartões de Gel Centrifugação DiaMed<sup>®</sup>, de acordo com as especificações do fabricante.

### **Protocolo**

#### **I. Lavagem de hemácias**

A - Pipetar 500 $\mu$ L de hemácias (centrifugar o tubo de hemograma) em um tubo de ensaio pequeno.

B - Acrescentar 1 mL de salina 0,9% no tubo

C - Homogeneizar e centrifugar por 1 minuto a 1500 rpm.

D - Desprezar o sobrenadante em recipiente apropriado (contendo solução de hipoclorito de sódio).

E - Repetir as passagens A, B, C e D por mais duas vezes.

F - Usar a concentrado de hemácias para as diluições abaixo descritas.

## **II . Fenotipagem dos grupos sanguíneos ABO - Direta**

A - Preparação da suspensão de hemácias a 5%:

A. 1 – Em um tubo de ensaio adicionar 475  $\mu$ L de solução salina 0,9% + 25  $\mu$ L do concentrado de hemácias e homogeneizar suavemente.

B - Marcar 3 tubos com anti-A (1), anti-B (2) e anti A,B (3) para cada paciente.

C - Adicionar uma gota do anti-soro anti-A no tubo 1, uma gota do anti-soro anti-B no tubo 2 e uma gota do anti-soro anti A,B no tubo 3

D - Adicionar 50  $\mu$ L da suspensão de hemácias a 5% em cada tubo

E - Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos

F - Anotar os resultados conforme: (+) para aglutinação positiva e (-) para aglutinação negativa

G - Interpretar os resultados

## **III . Fenotipagem dos grupos sanguíneos ABO - Reversa**

A - Hemácias A e B padronizadas

A. 1- Lavar hemácias A(-) e B(-) previamente conhecidas (vide procedimento

IA) A. 2 – Em um tubo de ensaio colocar 9,5 mL de Solução Fisiológica + 0,5 mL (500  $\mu$ L) do concentrado de hemácias A (tubo A1), e repetir o procedimento para a B (tubo B1).

B - Marcar dois tubos com RA (1) e RB (2) para cada paciente doador

C - Adicionar 100  $\mu$ L (duas gotas) do plasma ou soro (do paciente) em cada tubo

D - Adicionar 50  $\mu$ L da suspensão de hemácias padronizadas A1 no tubo A e B1 no tubo B

E - Centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto

F - Anotar os resultados conforme: (+) para aglutinação positiva e (-) para aglutinação negativa

G - Interpretar os resultados

#### **IV . Fenotipagem dos Grupos Sanguíneos MNS e Duffy**

A - Suspensão de hemácias:

A. 1 – Em um tubo de ensaio colocar 1,0 mL de Diluente 2 (kit) + 12 $\mu$ L de concentrado (procedimento IA) de hemácias e homogeneizar.

B - Pipetar 50  $\mu$ L de suspensão de hemácia (pipeta automática) em cada microtubo do cartão

C - Adicionar 50 $\mu$ L (1 gota) dos respectivos anti-soros

D - Esperar por 10 minutos

E - Centrifugar por 10 min. a 1000-1020 rpm em centrífuga própria para cartão.

F - Fazer a leitura