

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

AGNY MORENA DA CUNHA PEREIRA YACALOS

**RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DUFFY, CARGA PARASITÁRIA,
VARIANTE MOLECULAR DO PARASITO E SUPERÓXIDO DISMUTASE NA
MALÁRIA VIVAX**

São Luís – MA

2015

AGNY MORENA DA CUNHA PEREIRA YACALOS

**RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DUFFY, CARGA PARASITÁRIA,
VARIANTE MOLECULAR DO PARASITO E SUPERÓXIDO DISMUTASE NA
MALÁRIA VIVAX**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à coordenação do Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão, para
obtenção do grau de Bacharel em Medicina.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Raquel
Fernandes do Nascimento
Co-orientador: Prof. Ms. Bruno de Paulo
Ribeiro

São Luís - MA

2015

Yacalos, Agny Morena da Cunha Pereira
Relação entre o genótipo Duffy, carga parasitária,
variante molecular do parasito e superóxido Dismutase
na Malária Vivax. / Agny Morena da Cunha Pereira
Yacalos. - São Luís, 2015.
61f.

Orientadora: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-Orientador: Prof. Ms. Bruno de Paulo Ribeiro

Monografia (Graduação) Curso de Medicina, Universidade
Federal do Maranhão.

1. Malária. I Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do
(Orient) II. Ribeiro, Bruno de Paulo (Co-Orient). III. Título

CDU 616.936

AGNY MORENA DA CUNHA PEREIRA YACALOS

**RELAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO DUFFY, CARGA PARASITÁRIA,
VARIANTE MOLECULAR DO PARASITO E SUPEROXIDO DISMUTASE NA
MALÁRIA VIVAX.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à coordenação do Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão, para
obtenção do grau de Bacharel em Medicina.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Raquel
Fernandes do Nascimento.
Co-orientador: Prof. Ms. Bruno de Paulo
Ribeiro

Aprovado em/...../ 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento – Orientadora

Examinador

Examinador

Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois o que seria de mim sem a fé que Nele deposito e a que Ele deposita em mim? Obrigada pelas oportunidades de evoluir sempre. Por me dar saúde, paz e renovar minha fé diariamente.

Aos meus pais, em especial à minha mãe-pai Laís, pela educação, pela liberdade, pelo senso de justiça que me foi dado e por me mostrar sempre o caminho correto a seguir. Obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim. Muitas vezes não entendi ou não concordei com suas atitudes, mas vejo hoje que não poderia ter sido melhor, tenho orgulho de quem sou, da guerreira que a senhora sempre foi e da família que tenho. Infelizmente não digo com muita frequência isso, mas obrigada mãe. Eu te amo!

Aos meus avós, Olavo e Laís que, mesmo presentes só na memória, me ajudaram a chegar até aqui. Um dia nos encontraremos e darei meu abraço de agradecimento.

Aos meus irmãos que, sem dúvida alguma, são a maior riqueza e felicidade que tenho. Vocês são meus amores incondicionais. Marina, pelo exemplo de inteligência e competência, obrigada por sempre acreditar, investir e cuidar de mim. Ioana, obrigada por ser minha eterna educadora e orgulho. Por sempre me relembrar o amor de Deus e a justiça. Flavio, por ser meu presente Divino, eterno companheiro e por estar presente em todas as minhas lembranças. Mihalis, sempre presente em meu coração e orações. Agradeço também aos meus cunhados, Diego e Guerra, por fazerem minhas irmãs felizes e por entrarem na família, vocês eram as peças que faltavam nesse quebra-cabeças. Literalmente.

À turma 93, especialmente Karla, Mariana, Daniel fofo e Rafaella, que indiretamente contribuíram com sua amizade e fazem a luta mais feliz.

Ao CAEE, por serem meus companheiros desde o início da jornada e por tornarem o fardo sempre mais leve. Weldon, Felipe e Renatinha, obrigada pela força, amor e sorriso. A amizade de vocês levarei por toda vida. Em especial ao Wendhell, menino do coração bom, por me demonstrar a simplicidade e beleza da vida e à amiga-irmã Wanara, que ao longo dos anos me demonstra amor e cuidado da forma mais singela, obrigada por vocês não medirem esforços em me ajudar. Essa é a maior demonstração de amizade.

Ao meu companheiro incansável Nilton, por ser a personificação do amor, paciência, força e determinação. Por saber me acolher sempre que preciso, pelos abraços diários que

me motivam a continuar por mais difícil que seja. E à sua família Madureira, pelo acolhimento e carinho de sempre.

Ao LIF inteiro, por me mostrar a beleza da pesquisa e por me acolher. Vocês são todos maravilhosos. Em especial a Johnny, Daniel e Dalila, pela ajuda essencial que recebi, pela paciência e por tudo. Meu sincero reconhecimento e orgulho.

E finalmente agradeço imensamente aos meus orientadores Flavia e Bruno, por serem exemplos de capacidade e inteligência. Vocês são inspiradores. Obrigada pelas oportunidades, pela imensa paciência e pela confiança. Obrigada, professora, por acreditar em mim, mais até do que eu mesma. Se não fosse por vocês eu não estaria aqui. Levo deste trabalho muito mais que uma pesquisa e um TCC, mas ensinamentos, carinho e uma eterna gratidão a todos vocês. Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Brasil: série histórica casos de malária de 1990 a 2012	17
Figura 2.	Epidemiologia da malária com número de casos notificados entre 2011 e 2014 no Maranhão	18
Figura 3.	Mapa regional mostrando a distribuição das 9 espécies de Anopheles dominantes nas Américas	19
Figura 4.	Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp</i>	21
Figura 5.	Distribuição global dos alelos Duffy	26
Figura 6.	Distribuição global do fenótipo Duffy negativo	27
Figura 7.	Representação esquemática da PvDBP	27
Figura 8.	Passo a passo da invasão da célula sanguínea pelo merozoíto	28
Figura 9.	Representação esquemática da estrutura da CSP	29
Figura 10.	Carga parasitária grupo controle e infectados por <i>P. vivax</i>	38
Figura 11.	Influência da variante molecular do parasito na carga parasitária ..	40
Figura 12.	Influência do genótipo Duffy com a carga parasitária	42
Figura 13.	Análise entre a carga parasitária, o genótipo Duffy e as variantes do parasito	44
Figura 14.	Quantificação da atividade da SOD-1 no plasma dos grupos controle e infectados por malária vivax	45
Figura 15.	Comparação entre os genótipos Duffy de acordo com a carga parasitária e a atividade da SOD-1	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Frequência de pacientes quanto ao polimorfismo da CSP.....	39
Tabela 2.	Frequência do genótipo Duffy	41
Tabela 3.	Frequência da variante relacionada ao genótipo	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

Asp – Ácido aspártico

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centro de controle e prevenção de doenças.

CSP – Proteína circunsporozoíta

DARC - Duffy Antigen Receptor for Chemokine (Antígeno Duffy receptor para quimiocinas)

DDT – diclorodifeniltricloroetano

ES – Erythrocyte Silent (eritrócito silencioso)

FUNASA – Fundação Nacional de Saude

Fy – Sistema sanguíneo Duffy

G – Guanidina

Gly – Glicina

H – Horas

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)

mg - miligrama

mm³ - milímetros cúbicos

MS – Ministério da Saude

OMS – Organização Mundial da Saude

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PvDBP – Proteína de ligação ao Duffy em *P. vivax*

SOD – Enzima superóxido dismutase

T – Timina

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

WHO – World Health Organization (Organização mundial da saúde)

° C – Graus Celsius

μ L - microlitro

RESUMO

A malária humana mais prevalente no mundo é causada por *Plasmodium vivax*, e é a predominante no Brasil. Possui um histórico clínico benigno, apesar de ser uma doença debilitante. No entanto, atualmente existem relatos de casos que evoluíram com complicações e até mesmo óbito, em diversas regiões do mundo. Não se sabe, porém, quais os fatores desencadeadores desse quadro grave. Esse trabalho visa auxiliar o esclarecimento dos fatores intrínsecos ao hospedeiro e ao parasito que influenciam a susceptibilidade e o desenvolvimento desta infecção como o grupo sanguíneo Duffy que tem papel importante de resistência, mas não fundamental e o polimorfismo da CSP, responsável pelas variantes do parasito (VK210, VK247 E *P. vivax*-like) e avaliar a resposta ao estresse oxidativo provocado pelo parasito através da quantificação da enzima SOD-1. Participaram do estudo 25 pacientes infectados agudamente por *P. vivax* virgens de tratamento de dois municípios de São Luís, Cedral e Buriticupu e mais 9 voluntários saudáveis de São Luís que constituíram o grupo controle. O sangue coletado foi encaminhado à São Luís, para o Laboratório de Imunofisiologia da UFMA e processado para separação do plasma e das hemácias. Estes foram aliquotados e congelados para posterior análise da atividade da SOD-1, carga parasitária e Genotipagem Duffy por PCR Real Time, além da análise do Polimorfismo dos Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (RFLP) para determinação da variante. Nesse estudo, a variante VK210 foi predominante com diferença estatística entre a mesma e a variante VK247. Não houve pacientes com a variante *P. vivax*-like e tiveram 5 pacientes com infecção mista com as duas variantes. A carga parasitária foi superior na VK247. Dentre o genótipo Duffy, o FyA/FyB foi o mais prevalente e detentor de menor parasitemia, com diferença estatística com o genótipo FyB/FyB, detentor de maior parasitemia. Em relação a quantificação da atividade da SOD-1, esta foi maior no grupo infectado quando comparado ao grupo controle, assim como entre os genótipos que possuíam um alelo FyA – FyA/FyB e FyA/FyB^{ES}. Não houve diferença estatística entre a atividade da SOD-1 e as variantes do parasito, assim como não houve correlação entre a SOD-1 e a parasitemia. Neste trabalho ficou evidenciado que o alelo FyA influencia para uma menor parasitemia, assim como que este alelo promove maior atividade da SOD-1 no plasma dos pacientes. Sugerindo então que o parasito desenvolve um mecanismo de escape no hospedeiro, promovendo perfil mais regulador que garante maior sobrevivência na infecção simples de malária vivax. Assim como o alelo FyA desempenha papel protetor ao organismo, sugerindo ser uma característica evolutiva de adaptação.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium vivax*, Duffy, estresse oxidativo, CSP, variante.

ABSTRACT

The most common human malaria in the world is caused by the *Plasmodium vivax*, which is also the predominant type in Brazil. It has benign clinical course, even though is a debilitating disease. However, nowadays there are reports in all the world of cases that developed with complications and even death. It is unknown what the factors that lead to this clinical course are. This research aims to help in the clarification of the intrinsic factors of the host and the parasite that influence susceptibility and development of this infection, as well as the Duffy blood type, that has an important -but not fundamental- role in the resistance of malaria. Also, the polymorphism of the CSP, responsible for the different variants of the parasite (VK210, VK247 and P.vivax-like) and evaluate the response to the oxidative stress caused by the parasite through the quantification of the SOD-1 enzyme. 25 patients acutely infected by the *P.vivax* were selected for this study; also, they didn't had any previous treatment. They were from 2 county of São Luís, Cedral and Buriticupu. Plus 9 healthy volunteers from São Luís that composed the control group. The collected blood was sent to São Luís to the Immune Physiology Laboratory of UFMA and processed for the separation of plasma and red blood cells. They were aliquoted and frozen for later analysis of SOD- 1 activity, parasitic load and Duffy genotype by Real Time PCR, in addition to polymorphism analysis of the lengths of restriction fragments (RFLP) and the analysis to determine the variant. In this study, the VK210 variant was the most common with statistic difference with the VK247 variant. There were no patients with the P.vivax-like variant and there were 5 patients with mixed infection of the two variants. The parasitic load was bigger in VK247. When it comes to the Duffy genotype, the Fya/FyB was the most prevalent and had the least parasitic load, with statistic difference with the FyB/FyB genotype that had greater parasitic load. Regarding the quantification of SOD- 1 activity, it was higher in the infected group compared to the control group, and between the genotypes who had an allele FyA - FyA / fyb and FyA / FyBES. There was no statistical difference between the SOD- 1 and the parasite variants, as there was no correlation between SOD -1 and parasitaemia .In this study it was evidenced that the allele FyA influence for a smaller parasitaemia, as it promotes higher allele SOD -1 in plasma of patients, suggesting that the parasite develops an escapement mechanism in the host, promoting a more regulating profile that allows bigger survival in the simple infection of malaria vivax. As the FyA allele, that plays a protective role for the organism, what suggest that is a result of adaptive evolution.

Key-words: malaria, *Plasmodium vivax*, Duffy, oxidative stress, CSP, variant.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Epidemiologia da malária	15
2.2	Vetor, <i>Plasmodium</i> e ciclo biológico	19
2.3	Quadro clínico, diagnóstico e tratamento	22
2.4	Sistema Duffy, seu Polimorfismo e o antígeno DARC	24
2.5	Variante molecular do parasito – Protéina Circumsporozoíta (CSP)	29
2.6	Enzima superóxido dismutase e malária vivax	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MÉTODOS	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO I	60
	ANEXO II	61

1. INTRODUÇÃO

A malária humana é uma doença parasitária não contagiosa responsável por cerca de 198 milhões de casos mundiais anualmente – dados de 2013 do World Malaria Day, com uma estimativa de 584.000 mortes. Só no Brasil ocorreram 177.791 casos notificados nesse mesmo ano. O estado do Maranhão foi responsável por 1305 casos desse total. Apesar de existirem estratégias mundiais de controle, a malária continua sendo uma doença endêmica que diminui a qualidade de vida das populações atingidas. Cerca de 3,4 bilhões de pessoas vivem nas áreas consideradas de risco, que engloba mais de 106 países ao redor do mundo.

A transmissão da malária ocorre nas regiões extra e peridomiciliares pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, que possui como uma de suas fontes alimentares, o homem. O agente etiológico da malária é do gênero *Plasmodium* e existem atualmente 5 espécies de protozoários desse gênero responsáveis pela doença em humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium ovale* (WHO, 2011).

Destas cinco espécies, as duas primeiras são responsáveis pelo maior número de casos da doença mundialmente. A malária causada por *Plasmodium falciparum* é mais frequente no continente Africano e possui quadro clínico mais severo, frequentemente fatal. Já a malária causada por *Plasmodium vivax*, detém um histórico clínico mais benigno, com quadro de acessos febris, seguidos de calafrio, astenia e cefaleia. No entanto, nos últimos anos foram relatados casos com evolução diferente do que se esperava, com agravamento e até mesmo óbito, demonstrados em estudos já conduzidos na Índia, Indonésia e Brasil (KOCHAR et al, 2005; PRAKASH et al, 2006). Kochar et al. (2009) e Alexandre et al. (2010) publicaram trabalhos com pacientes infectados somente por *Plasmodium vivax*, excluindo do estudo pacientes com comorbidades e infecção mista com *P. falciparum*, no intuito de atribuir os casos graves somente ao *Plasmodium vivax* e não a outros fatores.

Mais pesquisas estão sendo conduzidas para ajudar a esclarecer os mecanismos patogênicos responsáveis por esse agravamento, se são por fatores intrínsecos ao parasito ou ao hospedeiro. No que se refere ao parasito, a Proteína Circunsporozoíta vem sendo descrita como importante alvo imunogênico (RIBEIRO, 2013) e como um dos maiores focos para o desenvolvimento de vacinas (AREVALO-HERRERA; HERREA S, 2001). Essa proteína é responsável pelas variantes do parasito, VK210, VK247 e *P. vivax*-like.

No que se refere ao grupo sanguíneo Duffy, existe importante relação deste sistema com a malária vivax, uma vez que indivíduos com esse genótipo negativo são naturalmente

resistentes a essa infecção (MILLER et al, 1976). Os antígenos Duffy são glicoproteínas transmembrana que funcionam como receptores para quimiocinas e para o *Plasmodium vivax* (HADLEY; PIEPER, 1997). Estão presentes em diversos tecidos além dos eritrócitos e não são essenciais para o funcionamento das hemácias, visto que não há alteração de função orgânica na ausência desse antígeno. Uma vez que são receptores para o parasito, são importantes na invasão da célula sanguínea humana. No entanto, recentemente descobriu-se que o parasito pode ter vias alternativas para a invasão eritrocitária além do Duffy como comprovado por Mendes et al (2011) que descreveram pacientes na Guiné Equatorial e Angola com genótipo Duffy negativo e infectados com cepas de *P. vivax*, tal fato também foi observado no Brasil por Cavasini et al (2007). No entanto, pouco se conhece ainda e estudos estão sendo conduzidos com o propósito de investigar a susceptibilidade desta infecção de acordo com o genótipo Duffy, assim como a interferência dos diversos alelos (FyA, FyB, FyB^{ES}, Fyb^{fraco}) com o grau de parasitemia.

Sabe-se também que a invasão à célula sanguínea, replicação do parasito em seu interior e degradação da hemoglobina desencadeiam estresse oxidativo no hospedeiro e que a enzima superóxido dismutase (SOD-1) constitui um importante sistema antioxidante neste processo. Andrade et al (2010) correlacionaram a malária e essa enzima como biomarcador de severidade desta infecção em uma população da Amazônia brasileira, estratificando a gravidade clínica (simples, média e grave) diretamente proporcional ao nível da SOD-1. Os autores observaram que esta enzima se mostrou um preditor mais poderoso da gravidade da doença do que o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em indivíduos com apresentações clínica graves da malária causada pelo *P. vivax*.

Frente a esse cenário, a malária causada por *Plasmodium vivax* apesar de causar doença predominantemente benigna, é importante causa debilitante que contribui para reduzir a qualidade de vida da população (RENAULT et al, 2007) e vem causando casos severos em todo o mundo. O conhecimento limitado dos mecanismos alternativos de invasão eritrocitária nesta infecção, assim como os fatores desencadeantes para seu agravamento, instiga novos estudos e elucidar tais fatores forneceria substrato para a formulação de vacinas e melhor terapêutica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da malária

A febre malárica intermitente vem sendo descrita ao longo da história, desde antes do Cristianismo, mas foi a partir do ano de 1880 que descobertas decisivas foram feitas no que se refere a esta doença. Charles Alphonse Laveran, médico do exército francês, durante um trabalho na Argélia, foi o primeiro a observar e descrever parasitos da malária no interior de glóbulos vermelhos humanos (GUILLEMIN, 2002). Já Ronald Ross, médico britânico, tornou possível, em 1897, a elucidação do modo de transmissão da doença, ao encontrar formas do parasito no interior de um mosquito que havia se alimentado de um doente infectado na Índia. Estas, entre outras descobertas, iniciaram os esclarecimentos a respeito de uma das maiores doenças infecto-parasitárias do mundo (CDC, 2012).

Popularmente conhecida como malária, paludismo, impaludismo ou febre terçã, esta doença possui como agente etiológico um protozoário do gênero *Plasmodium*. As espécies desse gênero capazes de infectar os seres humanos descobertas até hoje são: *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Destacam-se dentre estas *P. falciparum* e *P. vivax*, a primeira pela grande difusão no continente africano e sua clínica mais grave e a segunda por sua ampla distribuição no globo. A transmissão do paludismo está restrita às regiões de clima tropical e subtropical, sendo encontrada, portanto, na África subsaariana, no sudeste da Ásia e na América Latina. (WHO, 2011).

A malária é uma doença evitável e tratável, transmitida por vetores. É um problema de saúde pública mundial que afeta diversos países de clima tropical e subtropical. (MOURÃO, 2014). Apesar disso, houve uma estimativa de 219 milhões de casos em todo o mundo no ano de 2010 e que a doença matou cerca de 660 000 pessoas, a maioria crianças menores de cinco anos. Do número total de casos nesse ano, 81% dos registrados e 91% das mortes ocorreram no continente africano (WHO, 2012).

Na América Latina e no Caribe, 75% dos casos de malária são causados por *Plasmodium vivax*, que raramente leva à morte, enquanto os 25% restantes devem-se à espécie *P. Falciparum* relacionado com maior letalidade. De um total de 775.500 casos de malária na América Latina e no Caribe, em 2007, foram registradas 212 mortes por *P. vivax* (WHO, 2012).

A subregião Amazônica, região de clima tropical que engloba outros países além do Brasil, tais como Bolívia, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Peru, é responsável por 89% de todos os casos de malária nas Américas (OPAS, 2008). Entre

os países amazônicos, o Brasil tem a maior proporção de casos, 56%, sendo registrados um total de 139.953 casos positivos de malária entre janeiro e dezembro de 2014 (BRASIL, 2012). No entanto, acredita-se que esse número seja ainda superior, visto que a subnotificação é presente em todas as doenças do país e que a malária afeta principalmente a região amazônica, região esta que ainda possui áreas isoladas, com difícil ou nenhum acesso terrestre e com atendimento médico escasso.

Em um trabalho publicado por Loiola et al (2002) na Revista Pan-Americana de Saude Pública, os autores analisaram o controle da malária no Brasil de 1965 a 2001. O ano de início de sua análise foi escolhido por ser ano de criação da Campanha de Erradicação da Malária (CEM) e o final em 2000 por ser o lançamento do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM). De acordo com os autores, inicialmente a estratégia da CEM se baseava no uso intradomiciliar de um agente dedetizador contra os mosquitos transmissores, o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e no uso de drogas antimaláricas nos seres humanos parasitados pelos plasmódios, a fim de esgotar as fontes infecciosas. Essa estratégia conseguiu diminuir os casos no país e eliminar a malária de regiões como Nordeste, Centro-oeste, Sul e Sudeste. No entanto, na região Amazônica a CEM não foi tão efetiva. Tal fato atribuiu-se a diversos fatores, dentre eles a dificuldade de borrifar o DDT nos alojamentos precários, na intensiva transmissão extradomiciliar da região onde existem trabalhos humanos de elevada exposição ao mosquito (garimpeiros, agricultores, madeiros), além das características da própria floresta, quente e úmida, ambiente ideal para o agente transmissor. Além destes fatores que contribuíram para o insucesso das ações naquela região, começaram a surgir os primeiros casos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, antimalárico até então bastante eficaz no campo (LOIOLA et al, 2002).

Várias outras iniciativas federais foram adotadas a fim de eliminar a malária da região Norte, dentre elas a Estratificação epidemiológica, a Operação Impacto e em 2000 o Plano de intensificação das ações de controle da malária nas áreas de alto risco da Amazônia legal, que em 2003 foi substituído pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Essas estratégias foram gradativamente crescendo e se efetizando (SILVA et al, 2009), com notável queda do número de casos desta doença no país (Figura 1).

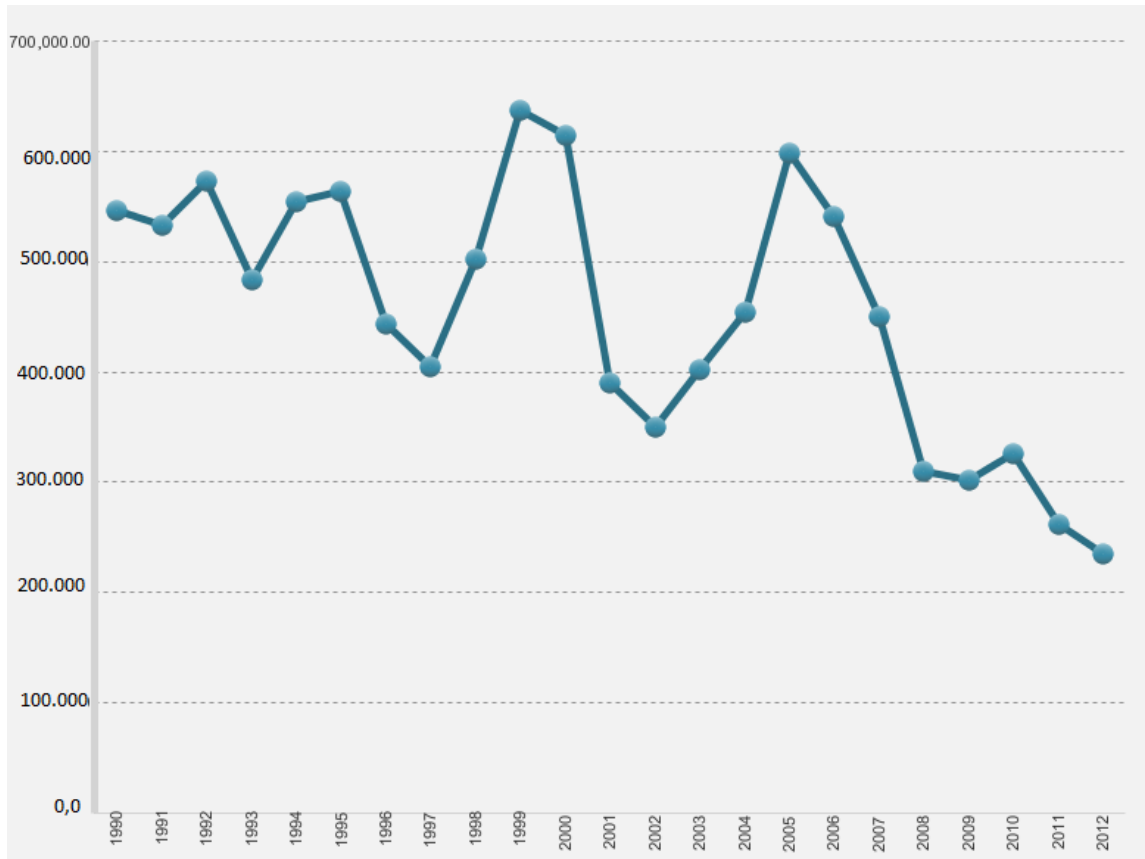


Figura 1. Brasil: série histórica casos de malária de 1990 a 2012

Fonte: BRASIL. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS.

O Maranhão vem seguindo a tendência nacional de controle da malária. Em 2014, segundo dados do DATASUS foram notificados 1.375 casos, uma importante queda se comparado aos 5.707 do ano de 2009. Destes 1375 casos, 1.214 foram de infecções por *P. vivax* e apenas 125 por *P. falciparum*. A figura 2 mostra o percentual de redução entre o ano de 2011 e de 2014, tendo uma redução geral de 58% do número de casos. Esse dado refere-se aos casos totais da doença, não diferenciando as espécies de *Plasmodium*.

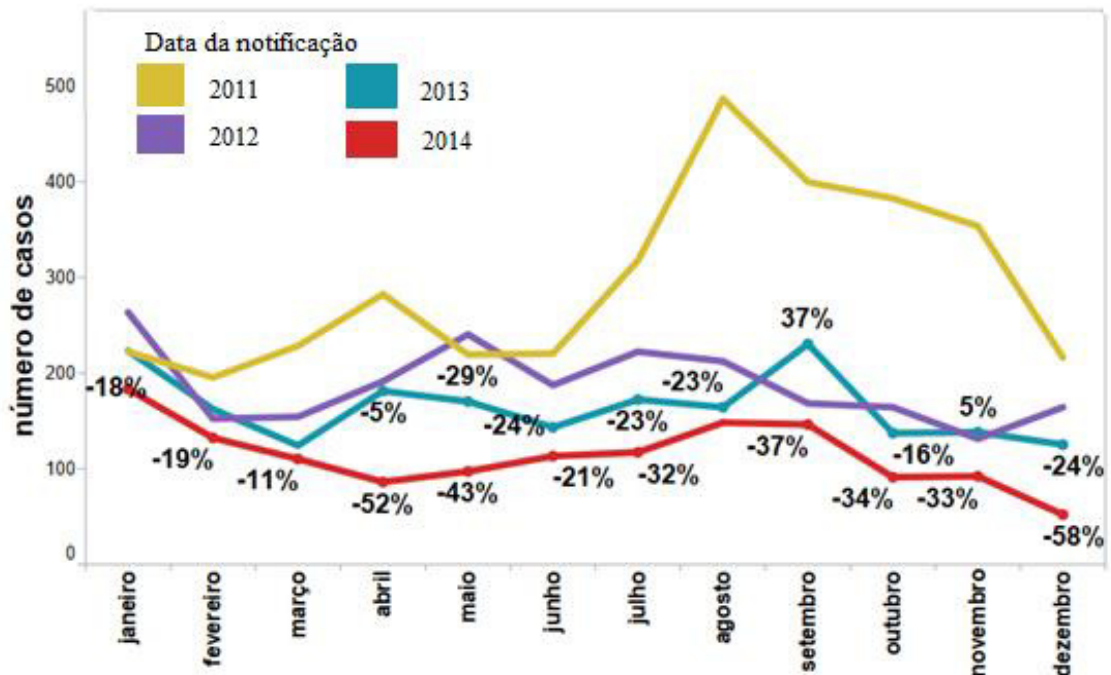


Figura 2. Epidemiologia da malária com número de casos notificados entre 2011 e 2014 no Maranhão.
 Fonte: SIVEP – Malária – Ministério da Saúde

Os esforços globais em reduzir a malária têm sido mais eficazes com a malária falciparum do que com a malária vivax. Pode-se atribuir a isso alguns fatores como a maior atenção dada à falciparum devido a sua maior gravidade e às características de *P. vivax* como transmissão eficiente em diversos contextos ecológicos além da sua capacidade de reiniciar a infecção sanguínea a partir de hipnozoítos hepáticos.

Apesar de anteriormente considerada benigna, a malária causada por *P. vivax* agora é reconhecida como capaz de causar doença grave e fatal. Tanto pode exercer forte influência na morte de pacientes com doenças pré-existentes, como também pode, por si só, causar a morte (LACERDA, 2012). Na última década, diversos relatos de casos e estudos longitudinais de hospitais na Índia, Indonésia, Papua Nova Guiné e aqui mesmo no Brasil mostraram que *P. vivax* pode causar episódios graves e fatais, com taxas de incidência e mortalidade semelhantes àqueles observados para *P. falciparum* e de amplo espectro clínico (BASSAT, ALONSO, 2011).

A malária falciparum foi profundamente estudada ao longo dessas décadas e sabe-se que mecanismos de citoaderência de glóbulos vermelhos parasitados, disfunção endotelial e obstrução microvascular são responsáveis pela sua patogênese (BARBER et al, 2015). No entanto, pouco se sabe ainda sobre o mecanismo patogênico da vivax responsável por essa

gravidade até então inesperada. Diante dos novos fatos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de ajudar a elucidar esses fatores.

2.2 Vetor, *Plasmodium* e ciclo biológico

A malária é uma doença infecciosa febril, não contagiosa, transmitida pela picada durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Anopheles*, infectada por *Plasmodium* (BRASIL, 2009). O gênero *Anopheles* possui aproximadamente 465 espécies, destas cerca de 41 são consideradas dominantes (DVS - *dominant vector species*) pela alta capacidade de transmitir a malária humana. No Brasil predominam as espécies *Anopheles darlingi* na região mais centro-norte, *Anopheles aquasalis* no litoral e *Anopheles albitarsis* no Nordeste e Sul-Sudeste (SINKA et al, 2012). A figura 3 ilustra as áreas de prevalência desses vetores.

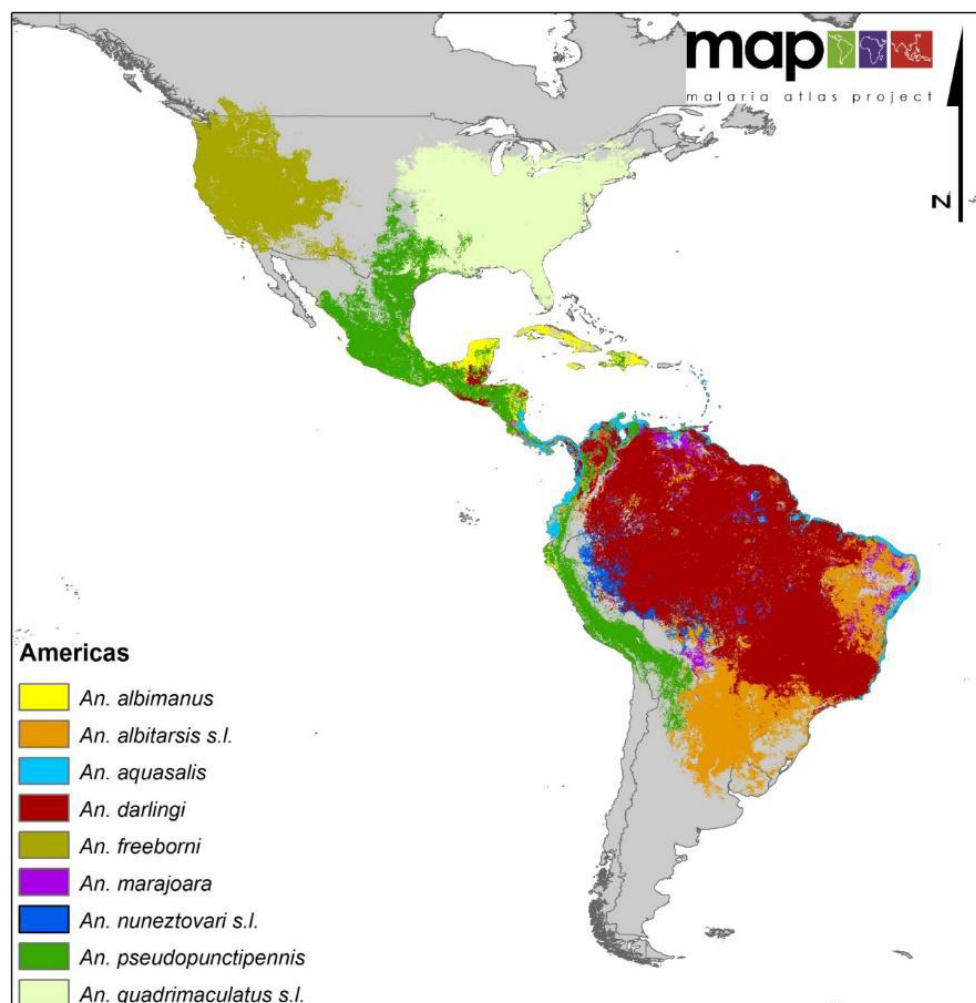


Figura 3. Mapa regional mostrando a distribuição das 9 espécies dominantes de *Anopheles* nas Américas.
Fonte: Sinka et al, *Parasites & Vectors* 2012.

Existem ao redor do mundo mais de 170 espécies de *Plasmodium* capazes de infectar répteis, aves e mamíferos, mas somente 5 espécies, já citadas, são de maior importância por sua capacidade de infectar o homem. O período de incubação da malária varia de 7 a 14 dias, ou pode chegar a vários meses, no caso de *P. vivax* e *P. malariae* (BRASIL, 2010).

Plasmodium é um protozoário pertencente taxonomicamente ao filo Apicomplexa e família Plasmodiidae. Possui ciclo de vida complexo e requer a expressão de proteínas especializadas para a sobrevivência e invasão de uma variedade de tipos celulares, além de evasão de respostas imunes do hospedeiro (TUTEJA, 2007).

O ciclo pode ser dividido em várias etapas, começando pela entrada dos esporozoítos, forma infectante, na corrente sanguínea. Apresenta ainda duas fases: a sexuada no vetor, fêmea do mosquito, e a assexuada no hospedeiro vertebrado. Durante o repasto, cerca de 15 a 200 esporozoítos são inoculados. Destes, alguns são drenados e degradados nos linfonodos, outros, pouco tempo depois (que varia entre poucos minutos a algumas horas), alcançam a circulação sanguínea e o fígado, onde invadem os hepatócitos (AMINO et al, 2006). Inicia-se então o ciclo esquizogônico hepático da malária. Aqui alguns se desenvolvem e se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, outros ficam em estado de latência – os hipnozoítos. Essas formas latentes de *P. vivax* que são responsáveis pelas recaídas da doença, até 2 anos depois do primeiro quadro, mesmo sem haver novo contato com o vetor e mesmo após o tratamento (MUELLER et al, 2009).

Ainda nos hepatócitos, os trofozoítos se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia dando origem aos esquizontes teciduais, que logo posteriormente se rompem liberando milhares de merozoítos. Estes invadirão os eritrócitos, especificamente os reticulócitos (BARNWELL et al, 1989), iniciando o ciclo esquizogônico sanguíneo da doença (HAFALLA et al, 2011). Do total de glóbulos vermelhos existentes, os reticulócitos correspondem cerca de 1 a 2%, esse é o motivo das baixas parasitemias observadas nas infecções por *P. vivax* (PESSOA, MARTINS, 1982; MUELLER et al, 2009).

Já no interior da hemácia, os merozoítos transformam-se em trofozoítos jovens, depois amadurecem e após a esquizogonia transformam-se em esquizontes sanguíneos. Estes depois se rompem e liberam novos merozoítos na circulação, que irão invadir novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos ocorre a diferenciação em estágios sexuados, os gametócitos, que não se dividem mas são capazes de evoluir no inseto vetor, dando origem ao ciclo sexuado no mosquito. Esse ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes a cada 48 horas aproximadamente nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*.

O reinício do ciclo se dá quando a fêmea do anofelino, durante o repasto sanguíneo, ingere os gametócitos. No intestino médio do vetor ocorre a gametogênese e logo depois a fecundação. Aproximadamente 24h após o oocineto se encista na camada epitelial do intestino, onde inicia a divisão esporogônica, e decorrido um período de cerca de 14 dias há o rompimento do oocisto e a liberação das formas infectantes, os esporozoítos (PESSOA, MARTINS, 1982; MUELLER *et al*, 2009).

Na figura 4 podemos ver de forma didática este ciclo com todas as suas fases.

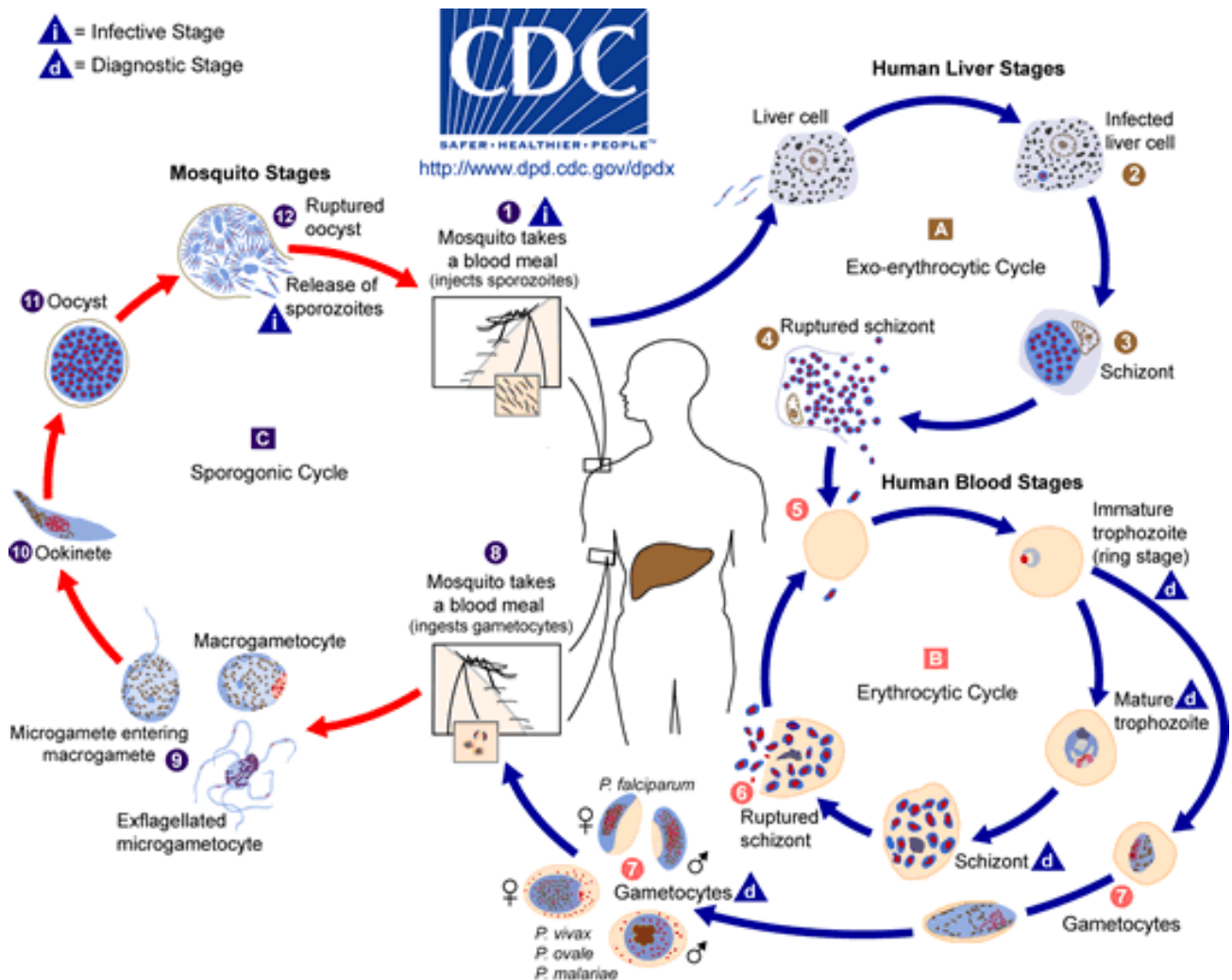


Figura 4: Ciclo biológico de *Plasmodium* sp

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

2.3 Quadro clínico, diagnóstico e tratamento

O ciclo eritrocítico assexuado citado é o responsável pelas manifestações clínicas da malária, com o acesso malárico de febre alta (igual ou superior a 40 graus celsius) que podem durar entre 6 e 12 horas, calafrio, sudorese e fraqueza (BRASIL, 2010). Os mecanismos que determinam a clínica são, basicamente, o rompimento dos eritrócitos parasitados ao final da esquizogonia onde cada ciclo deste desencadeia a liberação de variadas substâncias tóxicas, a exemplo do heme livre, radicais livres, enzimas líticas e hemozoína (HANSCHEID et al, 2008), resultando na ativação do sistema imune, liberação de citocinas e estresse oxidativo. Esse ciclo se repete sucessivas vezes a cada 48h, seja na infecção por *P. vivax*, seja por *P. falciparum*. (GREENWOOD et al, 2005). No entanto, se houver assincronismo na maturação de uma ou mais gerações de parasitos, o paroxismo febril tão característica na clínica da malária poderá estar ausente (KWIATKOWSKI et al, 1989). Esse quadro clínico febril pode vir acompanhado ainda de outros sintomas como vômitos, náuseas, dor abdominal, dor nas costas, dor de cabeça e tontura (BRASIL, 2014).

Já a malária grave é caracterizada com importante trombocitopenia, que é a queda no número de plaquetas, além de malária cerebral, danos renal, hepático, disfunção pulmonar, anemia grave, hemorragia e choque. Ou seja, considera-se malária grave àqueles pacientes que apresentam algum dano ou disfunção de órgão. Na malária cerebral o paciente pode desenvolver sintomas neurológicos como nistagmo, paralisia do olhar conjugado, convulsões, postura anormal, opistótono e coma (LAMIKANRA et al, 2007).

Apesar de apresentar um quadro febril com periodicidade relativa, os sinais e sintomas deste infecção podem ser confundidos com outras síndromes febris como dengue, febre amarela, febre tifóide, leptospirose e outras doenças. Diante disto, como o diagnóstico clínico da malária não é preciso, a decisão de tratar o paciente com medicamentos antimaláricos deve ser baseada na confirmação laboratorial da doença, com microscopia da gota espessa de sangue – exame padrão ouro, ou outros testes rápidos imunocromatográficos (BRASIL, 2010). Neste exame de gota espessa o sangue periférico é coletado por punção digital e consite na análise de hemácias em 100 campos microscópicos, que equivale a 0,2 µL de sangue, e estima-se a quantidade de parasitos por mm³. Esse método é capaz de diferenciar as espécies de *Plasmodium* e seus estágios de desenvolvimento. O resultado é expresso quantitativamente por meio de cruzes e demanda cerca de 60 minutos, entre a coleta do sangue e o fornecimento do resultado (BRASIL, 2010).

As críticas quanto a esse método se referem no diagnóstico de malária falciparum, pela impossibilidade de se observar as formas de trofozoítos maduros e esquizontes, pois estes ficam

aderidos nas vênulas e também porque este método exige uma estrutura mínima para sua realização e análise, e muitos lugares endêmicos da doença não dispõem de tais estruturas necessárias (BRASIL, 2010).

Devido a essas limitações, outros métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico rápido da doença, como o “malaria rapid diagnostic test” (MRDT). Esse método é baseado na detecção de 3 tipos diferentes de antígenos: a *pHRP-2* (*Plasmodium histidinerich protein 2*) e a *pLDH* (*Plasmodium lactate dehydrogenase*), ambas específicas para *P. falciparum* e *P. vivax*, e o último se chama Aldolase, que é pan-específico. No entanto, esta técnica além de possuir custo elevado, não detecta outros *Plasmodium*, possui reação cruzada com outras doenças como *Schistosoma mekongi*, com fator reumatóide e outros anticorpos e não serve para avaliar resposta ao tratamento (elevado tempo de eliminação do sangue). Portanto, tal método não é amplamente distribuído e não serve para substituir o método da gota espessa (WILSON, 2012).

Existe ainda a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que apresenta alta sensibilidade para *P. vivax*, no entanto seu elevado custo não permite ser uma técnica viável para rotina (RICCIARDI et al, 2015).

Percebe-se portanto, que para o diagnóstico da malária vivax em campo ainda existem amplas barreiras. Estando este basicamente restrito ao método da gota espessa, onde sua eficácia depende da qualidade dos reagentes, de pessoal bem treinado e experiente na leitura das lâminas e de permanente supervisão. Talvez esse seja um dos motivos da falha em seu diagnóstico, o não tratamento antecipado e seu agravamento. (BRASIL, 2010).

No que se refere ao tratamento da malária, as drogas são amplamente distribuídas, porém o arsenal ainda é limitado. A terapêutica se baseia em três objetivos: interromper a esquizogonia sanguínea, destruir os hipnozoítos (para *P. vivax* e *P. ovale*) e interromper a transmissão do parasito com drogas que impedem o desenvolvimento dos gametócitos (BRASIL, 2010). Dentre as drogas antimaláricas, deve-se usar àquela de acordo com o alvo parasitário. Para eliminar os esquizontes teciduais e hipnozoítos, usa-se a Primaquina; para eliminação dos esquizontes sanguíneos tem-se Cloroquina, Primaquina, Mefloquina, derivados da Artemisina, Tetraciclina, Clindamicina e Doxiciclina; e por último, para alvo gametocitocida, usa-se Cloroquina e Primaquina (BRASIL, 2010). Dentre estas drogas, a terapêutica de escolha para a infecção simples por *P. vivax* é a Cloroquina e a Primaquina. A Mefloquina é importante no combate ao *P. falciparum* (LOIOLA et al, 2002).

Os tratamentos podem ter esquema curto, 7 dias com dose dobrada, ou esquema longo, 14 dias. Geralmente opta-se pelo primeiro, pois assim tem-se maior tolerabilidade e adesão do paciente, pois os efeitos colaterais das drogas antimaláricas são bem importantes. Nesse

esquema, de forma geral, usa-se de forma simultânea, via oral, a Cloroquina (comprimido de 150mg) e a Primaquina (comprimidos de 15mg) por 3 dias, e daí em diante, até o sétimo dia mantém-se só a Primaquina. Ambos em dose única diária. Porém estas doses e os medicamentos devem levar em consideração idade, peso do paciente, história de exposição anterior, a gravidade da doença e condições associadas como por exemplo gravidez e co-infecção por HIV. (BRASIL, 2010).

2.4 Sistema Duffy, seu Polimorfismo e o antígeno DARC

A malária causada por *Plasmodium vivax* é a única dentre as malárias humanas em que a invasão eritrocitária é quase exclusivamente dependente de receptor na superfície da célula sanguínea, conhecido como antígeno Duffy (Fy) (ZIMMERMAN et al, 2011). A associação do grupo sanguíneo Duffy com a malária humana causada por *P. vivax* tem sido bem documentada e há relatos que os indivíduos Duffy-negativos podem ser infectados por este parasito (CAVASINI et al, 2007). No entanto, pouco se conhece sobre a interferência de um alelo negativo sobre a susceptibilidade ao *P. vivax* entre os portadores heterozigóticos de um alelo Duffy-negativo.

O desenvolvimento da técnica por Coombs de antiglobulina indireta na década de 40 permitiu a descoberta de diversos anticorpos antieritrocitários, logo após isto, na década de 50 Cutbush e Ikin (1950) descobriram o antígeno Duffy e o grupo sanguíneo Duffy. O papel deste antígeno eritrocitário e principalmente sua função como receptor de ligação para *Plasmodium* foram inicialmente estudados por Miller et al (1975) e são até hoje pesquisados. Eles observaram que em algumas regiões geográficas existiam pessoas que eram resistentes à invasão do eritrócito pelo protozoário, sugerindo que o fenótipo Duffy negativo (Fy^{a-b-}) lhes proporcionava tal característica (MILLER et al, 1975).

Os antígenos do sistema Duffy são glicoproteínas transmembrana que tem a função de receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for Chemokine – DARC*) e receptor para *Plasmodium vivax* (PIEPER; HADLEY, 1997). Essas glicoproteínas são expressas em diversos outros tecidos como baço, rim, cérebro, entre outros e sabe-se que elas não são essenciais para a estrutura e funcionamento dos eritrócitos visto que hemácias em pessoas com fenótipo Duffy negativo não manifestam alterações.

A glicoproteína Duffy é composta por 338 aminoácidos, com peso molecular teórico de 35kDa, sendo um receptor de membrana heptahelicoidal constituída de sete hélices hidrofóbicas que atravessam a membrana (HADLEY; PEIRER, 1997).

O gene que codifica o antígeno DARC está no locus FY do cromossomo 1 e tem dois polimorfismos principais. O primeiro é devido a uma substituição de bases no nucleotídeo 125, com troca de aminoácidos na região N-terminal que está associado com os antígenos FyA e FyB (G125A→Gly42Asp). Ou seja, no alelo FyA de base guanidina (G) o resultado é o códon para glicina, já no alelo FyB de base adenina (A) o resultado do códon é para ácido aspártico. No segundo polimorfismo há uma transição de nucleotídeos (T → C), com uma mutação na região promotora do alelo FyB capaz de abolir a expressão do antígeno Duffy na superfície eritrocitária (*erythrocyte silent* – ES), havendo uma interrupção no fator de transcrição eritrocitário (GATA-1). Essa mutação ocorre em um único ponto e como esse polimorfismo afeta a susceptibilidade clínica à malária vivax ainda é desconhecido (KING *et al*, 2011).

Existem portanto quatro genótipos decorrentes desses alelos, FyA, FyB, FY (FY*Bnulo, FyB-33 ou FY*B^{ES}) e FyX ou Fyb^{fraco}. Sendo os três primeiros mais comuns. Expressam assim os respectivos antígenos: Fy^a, Fy^b, Fy e em menor proporção o Fy^b (Fyb^{fraco}). Os fenótipos podem ser Fy^{a+b+} (FyA/FyB – heterozigoto com dois alelos expressos), Fy^{a+b-} (FyA/FyA – homozigoto ou FyA/FY – heterozigoto com um alelo expresso), Fy^{a-b+} (FyB/FyB - homozigoto ou FyB/FY – heterozigoto com um alelo expresso) e Fy^{a-b-} (FY/FY – Duffy negativo) e várias associações com o Fyb^{fraco}.

King et al (2011), em um estudo na região Amazônica, mostraram que a expressão do antígeno Fy^a estava associada à diminuição da susceptibilidade à malária vivax, enquanto a expressão de Fy^b estava associado à uma maior susceptibilidade. Os autores demonstraram que indivíduos com hemácias FyA/FyA tinham susceptibilidade reduzida à infecção por *P. vivax*, com uma redução de 40-50% quando comparado ao FyB/FyB. Os indivíduos com genótipo FyA/FyB^{ES} e o FyA/FyA mostraram menor incidência de malária clínica quando comparados com indivíduos FyA/FyB e redução de risco de contrair a doença em 80 e 29% respectivamente. Por outro lado, os genótipos FyB/FyB e FyB/FyB^{ES} mostraram risco aumentado em 270 - 220% se comparado ao FyA/FyB.

A distribuição geográfica dos alelos (FyA, FyB e Fy) foi bem documentada por Howes et al (2011), em um estudo com dados de 131.181 indivíduos. O aspecto mais marcante foi a presença do alelo silencioso FyB^{ES} em toda a África Subsaariana, com baixa frequência (<5%) dos alelos FyA e FyB. Já nas Américas predomina a heterogeneidade dos três alelos, com algumas áreas de predominância de alelos únicos. O genótipo FyB^{ES}/ FyB^{ES} possui rara frequência nessa região e o alelo FyB se mostrou menos prevalente globalmente. A figura 5 demonstra com mais detalhes essa distribuição.

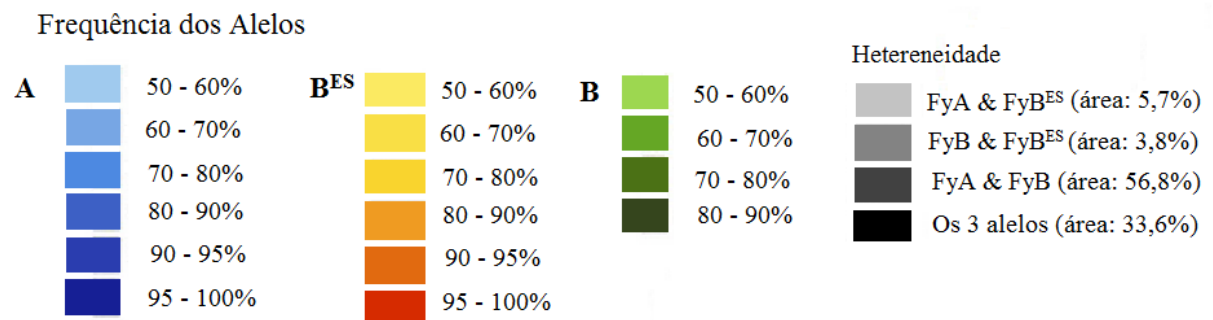
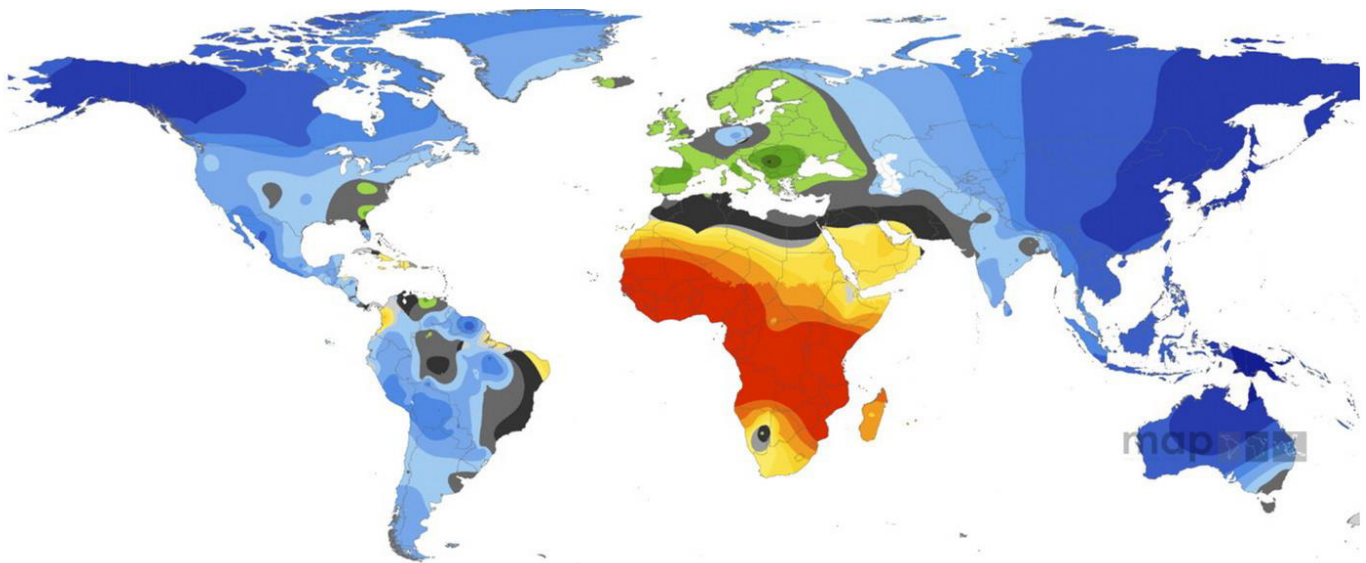


Figura 5. Distribuição global dos alelos Duffy

Fonte: Adaptado de King et al, 2011.

A predominância do alelo nulo em homozigose (FyB^{ES}/ FyB^{ES}) na África é vista como possível justificativa para a lacuna de distribuição da infecção por *Plasmodium vivax* nessas populações, devido à falta de expressão do antígeno Duffy nas hemácias. Ideia essa reforçada pelo fato de existirem ainda regiões africanas (Sudão e Etiópia por exemplo) com predominância de população Duffy positiva onde a malária vivax se faz mais prevalente (MERCEREAU-PUIJALON; MENÁRD, 2010).

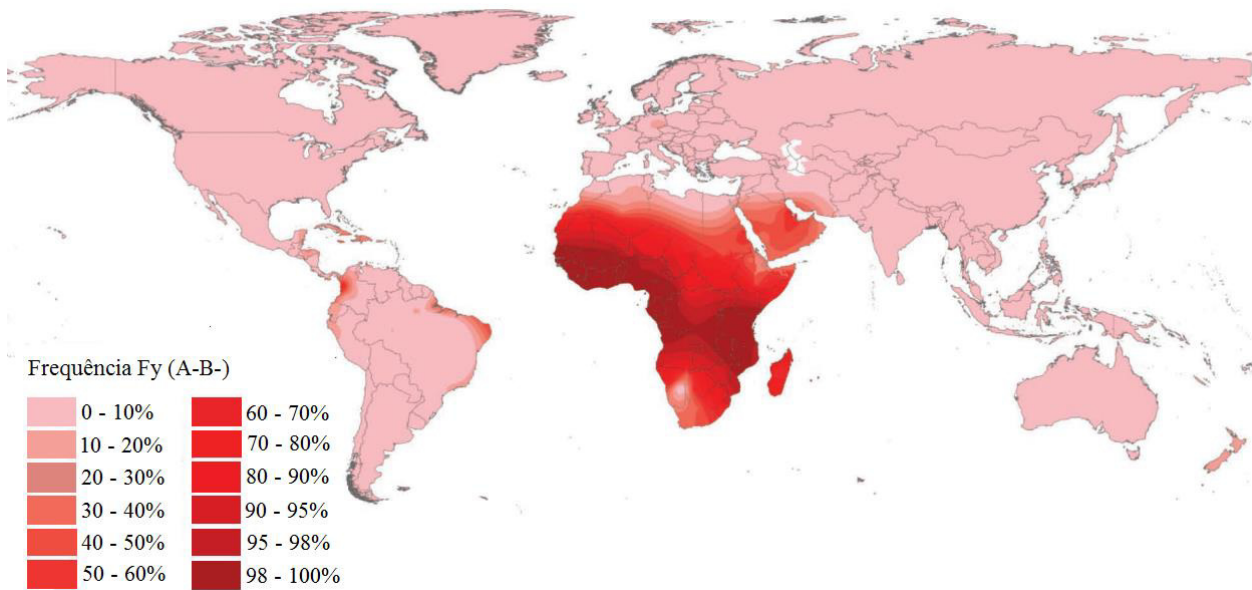


Figura 6. Distribuição global do fenótipo Duffy negativo.

Fonte: Adaptado de Howes et al, (2011).

Os merozoítos de *P. vivax* são pouco capazes de invadir eritrócitos humanos que não possuem os antígenos Duffy pois o processo de formação da junção entre o merozoíto e o reticulócito não pode ser formado (ADAMS et al, 1990).

A proteína de *P. vivax* ligadoras de Duffy, a PvDBP, localizada dentro dos micronemas dos merozoítos de *P. vivax*, desempenha papel essencial na invasão dos eritrócitos, onde se liga irreversivelmente ao receptor de antígeno Duffy, o DARC, presente na superfície do eritrócito. Ou seja, o receptor DARC é necessário para a invasão da célula sanguínea. A PvDBP está representada esquematicamente na figura 7.

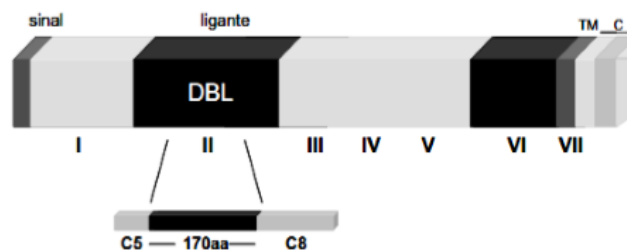


Figura 7. Representação esquemática da PvDBP. Essa proteína apresenta seis domínios extracelulares (de I ao VI) e uma sétima região (VII) com um domínio transmembrana (TM) e um citoplasmático (C). O domínio de ligação ao Duffy – DBL- se localiza na região II, rica em cisteína. A porção central da proteína, localizada entre a cisteína 5 a 8 (C5 – C8) é o principal sítio de reconhecimento do receptor.

Fonte: Adaptado de VanBuskirk et al, 2006

O processo de invasão eritrocitária ocorre com uma interação entre o merozoíto e a célula sanguínea, dependente de ligantes específicos como as proteínas de *P. vivax* ligadoras de Duffy (PvDBPs), em qualquer região de sua superfície. Após este reconhecimento, há uma movimentação do merozoíto de forma que a sua porção apical se reorienta, por intermédio do Antígeno de Membrana Apical (AMA-1), em contato com a superfície eritrocitária. Então, uma junção irreversível se desenvolve, onde as organelas apicais como róptrias e os micronemas liberam seus conteúdos, a molécula PvDBP, criando uma invaginação na superfície do reticulócito. O merozoíto é invaginado para dentro da hemácia e a junção apical se transforma em um anel que circunda o merozoíto e completa a invasão (CHITNIS, 2001). (Figura 8).

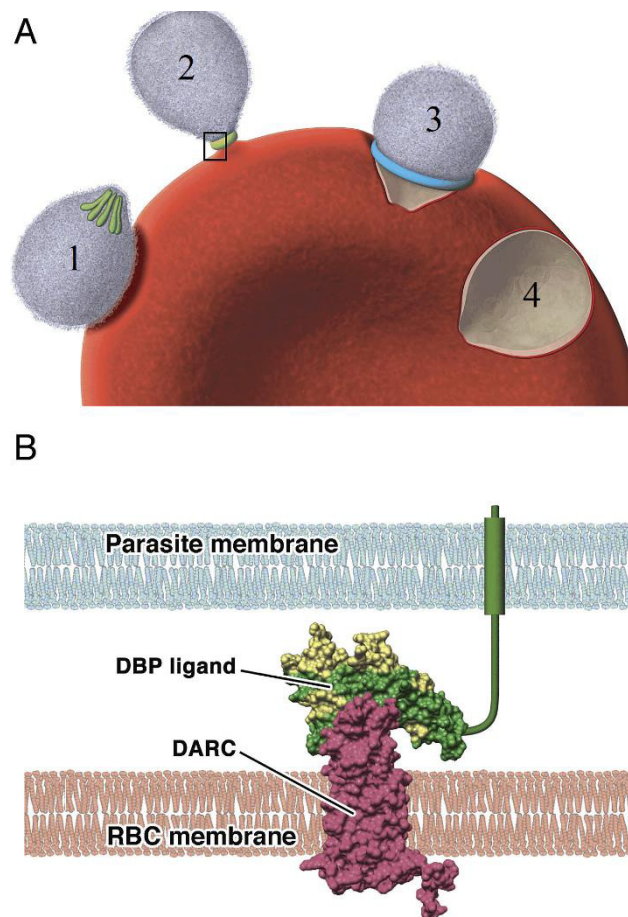


Figura 8. Passo a passo da invasão da célula sanguínea pelo merozoíto. **A** - 1) Envolve a fixação inicial do parasito na superfície do reticulócito, resultando na deformação da membrana celular da hemácia jovem, nesta fase a PvDBP está localizada nos micronemas intracelulares (de cor verde) na extremidade apical do merozoíto. 2) Reorientação do merozoíto, de forma que a extremidade apical deste fica em contato com a membrana da célula sanguínea. A PvDBP é então liberada, com reconhecimento e formação de uma junção (tight junction). 3) A junção (anel de cor azul) então se move da extremidade apical ao pólo posterior a medida que o merozoíto invade a célula, propulsionado por um motor de actina-miosina. 4) Ao final da invasão a membrana do reticulócito é finalmente selada. Esse processo de invasão, do passo 1 ao 4 leva aproximadamente 1 minuto. **B** - Passo 2 com maior detalhadamento da região dentro do quadrado. Mostrando um modelo de ligação da PvDBP ao receptor DARC. Região polimórfica do Duffy representada de cor amarela; região conservada de cor verde. Fonte: Adaptado de Beeson, Crabb (2013).

O processo de reorientação da PvDBP com sua exposição para fora do micronema é relativamente rápido, ou seja, a exposição de tal proteína decorre em curto período de tempo insuficiente para desencadear a resposta imune do hospedeiro, com consequente imunogenicidade natural reduzida (Adams et al., 1990). Vários estudos já pesquisaram a prevalência de anticorpos anti-PvDBP em populações de diferentes áreas endêmicas de malária e demonstraram que muitos pacientes não desenvolveram imunidade humoral contra essa proteína, a não ser após várias infecções consecutivas, como por exemplo, em áreas da Amazônia brasileira (Ceravolo et al, 2005), provando ser mais um possível mecanismo de evasão e sobrevivência do parasito. Pesquisas recentes têm demonstrado que esse processo de invasão eritrocitário, embora seja o principal, não é exclusivo. Mendes et al (2011), confirmaram o que diversos trabalhos anteriores tinham descrito, que pacientes Duffy negativos (DARC ausente ou FyB^{ES}/FyB^{ES}) da Angola e Guiné Equatorial estavam infectados por diferentes cepas de *P. vivax* (VK210 e VK247). Outro estudo conduzido por Cavasini et al (2007) também demonstrou este fato, sugerindo que este parasito pode ter vias alternativas de invasão eritrocitária, no entanto ainda desconhecidas.

2.5 Variante molecular do parasito – Protéina Circumsporozoíta (CSP)

Na superfície do protozoário *Plasmodium* existe uma proteína de cerca de 58 kDa que está envolvida na invasão dos esporozoítos nos hepatócitos. Essa proteína possui duas regiões terminais fixas (I e II ou N e C-terminal) e uma região central variável, esta última que determina o polimorfismo das variantes, VK210, VK247 e *P. vivax*-like. O que diferencia nessas 3 variantes é a sequência consecutiva de nonapeptídeo que se repetem em tandem, na variante VK210 (GDRA(A/D)GQPA), a do ANGA(G/D)(N/D)QPG na variante VK247 e outra sequência APGANQ(E/G)GGAA na *P. vivax*-like (ARNOT et al, 1985; ROSENBERG et al, 1989; QARI et al, 1993). A figura 9 ilustra essa proteína com as regiões descritas.

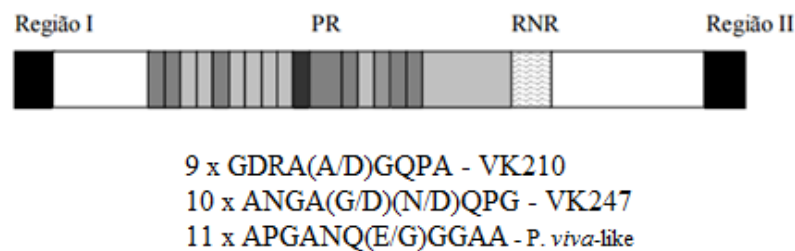


Figura 9. Representação esquemática da estrutura da CSP. A Região I representa a porção codificadora da região N-terminal, PR representa a porção repetida – sequenciamento de nonapeptídeos, RNR representa região não-repetida e Região II a região C-terminal.

Fonte: Adaptado de Qari et al, 1993.

A produção de anticorpos é restrita à região central de cada variante (SOUZA-NEIRAS et al, 2010) e inclui características específicas no que se refere à resposta ao tratamento, sintomas e carga parasitária. Assim como existem vetores mais ou menos adaptados a cada variante, o que garante a presença da infecção específica em diferentes regiões (ESCALANTE et al, 2002).

Diversos estudos já demonstraram que a variante VK210 é a mais frequente globalmente (KAIN et al, 1992; CUI et al, 2003; HENRY-HALLDIN, 2011; KIBRIA et al, 2015). Storti-Melo et al (2008), em regiões endêmicas da Amazônia Brasileira, demonstraram que a variante VK210 foi a mais comum em infecções simples, seguida pela variante *P. vivax*-like. Este estudo detectou também, pela primeira vez no Brasil, infecção simples pela variante VK247, que costuma se apresentar em infecção mista (MACHADO et al, 2003). Para o diagnóstico molecular das variantes, várias técnicas já foram descritas, mas a PCR/RFLP apresentou os melhores resultados (ALVES et al, 2007).

O papel da variante molecular na carga parasitária já foi estudado e associado ao perfil de citocinas produzido. Ribeiro (2013) demonstrou existir maiores níveis de citocina IL-6 e IL-10 no plasma de pacientes agudamente infectados pela variante VK247 de *P. vivax*. Camelo et al (2015) sugeriu existir um equilíbrio entre a IL-6 (pró-inflamatória) com a posterior produção de IL-10 e esta última agiria como mecanismo de escape do parasito ao clearance e como regulação da atividade pró-inflamatória exercida por IL-6.

Traçar o perfil da variante e relacioná-las ao genótipo Duffy, pode ajudar a esclarecer ainda as diferenças existentes na susceptibilidade do hospedeiro ao *P. vivax* assim como auxiliar nas pesquisas que visam a produção de vacina eficiente à esta infecção ainda amplamente distribuída. No que se refere à vacina, além do polimorfismo que determina as 3 variantes, Zakeri et al (2006) demonstrou diferentes graus de polimorfismo em uma mesma variante em cepas no Irã, sendo portanto mais um obstáculo à identificação dos alvos à esta profilaxia.

2.6 Enzima superóxido dismutase e malária vivax

O metabolismo aeróbico produz espécies reativas de oxigênio (EROS), ou radicais livres de oxigênio, como consequência de seu processo metabólico oxidativo, dentre eles o ânion superóxido. Níveis baixos destas EROS são importantes para mecanismos fisiológicos fundamentais como a proliferação celular, apoptose, diferenciação celular entre outras (ALLEN; BALON, 1989). No entanto, esses radicais também podem ser deletérios ao organismo, causando mutações genéticas, danos às membranas biológicas e morte celular (KAPOOR; BANYAL, 2009). No organismo, em estado normal, há um equilíbrio entre os

mecanismos de defesa (antioxidantes) e os fatores que promovem a formação das EROS – pró-oxidantes, assim qualquer desequilíbrio que favoreça a formação de radicais livres é definido com um estado de estresse oxidativo (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000). A rápida multiplicação do parasito é um exemplo disto e para equilibrar essas funções e aniquilar os danos, tanto ao hospedeiro quanto ao parasito, existem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR). Já o sistema antioxidante não-enzimático é composto de substâncias extracelulares como as vitaminas C e E, complexo B, além dos β -carotenos e de minerais como selênio, zinco, magnésio e cobre (KAPOOR & BANYAL, 2009).

Essas enzimas antioxidantes são capazes de converter esses reativos de oxigênio em outras substâncias que podem ser eliminadas mais facilmente pelo organismo. Dentre estas enzimas está a SOD-1, uma metaloproteína que catalisa a dismutação do ânion radicalar superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em humanos existem três formas de superóxido dismutase conhecidas atualmente, a SOD-1 está presente no citoplasma e no espaço mitocondrial, a SOD-2 nas mitocôndrias e a SOD-3 no líquido extracelular. A primeira é um dímero, enquanto que as outras são tetrâmeros (quatro subunidades). As SOD-1 e SOD-3 contém cobre e zinco, enquanto que SOD-2 contém manganês no seu centro reativo (VALENTINE et al, 2005).

Desde a sua descoberta como uma enzima com capacidade antioxidante em 1969 por McCord & Fridovich, vários estudos correlacionando os seus níveis e a sua atividade com diversas doenças foram traçados. No entanto, foi pela primeira vez em 2010 que relacionaram a atividade da SOD-1 com dano tecidual e mostraram que o nível plasmático de SOD-1 é um marcador de gravidade da malária vivax em uma população da Amazônia brasileira, onde *P. vivax* é endêmica, e se mostrou melhor marcador que o clássico TNF- α (ANDRADE et al, 2010).

Posteriormente, Khouri et al (2014) correlacionaram o quadro clínico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea (limitada e difusa) com a atividade da SOD-1, além de correlacionar também com a resposta ao tratamento e falha terapêutica. Os autores demonstraram que a atividade da SOD-1 foi maior na forma cutânea difusa quando comparada a forma limitada e ao grupo controle, sendo portanto um marcador de gravidade para esta doença. No que se refere à falha terapêutica os autores observaram que a SOD-1 também estava elevada nos pacientes com falha terapêutica.

No cenário da malária, Camelo (2015) correlacionou a carga parasitária de pacientes infectados por *P. vivax* com a quantificação da atividade da SOD-1, assim como avaliou o perfil de citocinas nesses pacientes. O referido autor observou que, apesar de não ter sido encontrada correlação entre parasitemia e atividade da SOD-1, a atividade dessa enzima foi proporcional aos níveis de TGF- β , que é uma citocina reguladora, sugerindo que a atividade do parasito estaria exercendo um efeito regulador da atividade inflamatória, reduzindo o ânion superóxido.

Diante disso, mais estudos se fazem necessários para esclarecer quais outros fatores influenciam nessa sensibilidade da SOD-1 como biomarcador de gravidade/elevada parasitemia, como o genótipo Duffy e as variantes do parasito.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a variante molecular do parasito, a atividade da SOD e o genótipo Duffy são marcadores de elevada parasitemia na malária causada por *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência da variante molecular e dos genótipos Duffy na carga parasitária de pacientes infectados com *P. vivax*.
- Quantificar a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no plasma dos pacientes e correlacionar com as variantes moleculares do parasito e com os genótipos Duffy de pacientes infectados com *P. vivax*.

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

O presente estudo iniciou-se na cidade de São Luís, capital do estado do Maranhão, onde se localiza o Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CREDIP), com estrutura para suporte clínico aos pacientes. A seguir, expandiu-se para os municípios de Cedral e Buriticupu, cidades que apresentaram surtos de malária no período deste estudo.

Ao todo, participaram do estudo 25 pacientes virgens de tratamento obtidos por conveniência, de ambos os sexos, com idade entre 3 e 58 anos, que tiveram o exame de gota espessa positivo para *Plasmodium vivax* e aceitaram participar do estudo por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE- anexo I). Para unificação da amostra foram excluídos os pacientes que apresentavam comorbidades ou coinfeções, como dengue, HIV e outra espécie de *Plasmodium* associada, assim como crianças abaixo de 3 anos, grávidas e idosos. Ficou assegurado o tratamento a todos os pacientes, inclusive os que não aceitaram participar do estudo. Após a assinatura do TCLE, os pacientes tiveram uma amostra de sangue coletada. O grupo controle foi constituído por 9 indivíduos saudáveis e clinicamente negativos para *Plasmodium* sp, oriundos de São Luís - MA. Esta pesquisa encontra-se aprovada no Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão (Nº de protocolo: 23115 008013/ 2010-07- anexo II).

4.2. Quantificação da carga parasitária por PCR Real Time

O DNA plasmodial foi extraído de uma alíquota dos eritrócitos utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN- Hilden, Alemanha), conforme orientações do fabricante. A PCR quantitativa em tempo real foi desenvolvida utilizando-se o kit comercial Máxima SYBR Green (Fermentas, Lituânia), preparando um mix de reação com um volume final de 15 µL que continha: 7,5 µL de Maxima SYBR Green master mixture, 0,5 µM de cada *primer*, 4,0 µL de água DNAase free e 2 µL de DNA genômico. O primer gênero-específico P1 (5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3') foi combinado com um oligonucleotídeo iniciador espécie-específico para *P. vivax*, V1 (5' CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3'). Estes *primers* permitiram a amplificação de um fragmento espécie-específico de 100 pb do gene 18S rRNA.

Os ensaios foram realizados no aparelho Mastercycler Realplex Gradiente Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em triplicata consistindo da desnaturação do DNA molde a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, com

aquisição de fluorescência ao final de cada passo da extensão. A amplificação foi imediatamente seguida por uma curva de dissociação que consistiu de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C e um passo de aumento de temperatura gradual de 0,2° C.s-1 até 95°C, com aquisição de fluorescência a cada transição de temperatura. O resultado obtido pelo software é dado em número de cópias do genoma plasmodial em uma amostra de DNA, que permite estimar o número correspondente de parasitos na amostra tomando por base a curva padrão construída com 10 pontos a partir da diluição seriada (1:10) da solução plasmodial com número conhecido de cópias da sequência alvo.

4.3. Dosagem enzimática de Superóxido Dismutase (SOD-1)

Todos os reagentes utilizados para determinação da atividade da SOD foram provenientes do kit de Ensaio da SOD (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Foram colocados 200 µL/poço da solução de trabalho WST previamente preparada. Nos poços das amostras e do branco 2 foram acrescentados 20 µL dos plasmas ou sobrenadantes para serem testados. Os poços das amostras e do branco 1 também receberam 20 µL da solução de trabalho da enzima. Os brancos 2 e 3 receberam 20 µL do tampão de diluição. Os brancos 1 e 3 receberam 20 µL de água destilada. A placa foi incubada à 37°C por 20 minutos e teve sua absorbância lida à 450 nm. Os resultados foram expressos na forma de atividade da SOD-1.

4.4. Genotipagem Duffy

A genotipagem do grupo sanguíneo Duffy foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Castillo et al. (2004), com modificações, para a identificação dos SNPs rs2814778. Os primers FYN1 (5'-CAA CAT CTG TGT ACC CTG-3') e FYN2 (5'-CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG-3') foram utilizados para amplificar a região promotora e os primers FYAB1 (5'-TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC-3') e FYAB2 (5'-CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG-3') foram utilizados para amplificar a região do exon 2 que compreende os SNPs G125A e C265T.

A mistura de 50 µL da reação de PCR foi composta de: Tampão 1X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 100 ng de DNA. As condições de ciclagem foram um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 50 segundos a 94°C, 50 segundos a 58°C e 50 segundos a 72°C, e uma etapa final de 10 minutos a 72°C. Após a PCR, os produtos amplificados da região promotora (189 pb) e do exon 2 (392

pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificar a eficiência da amplificação.

Digestão das amostras: os produtos de PCR foram digeridos overnight com enzimas de restrição apropriadas (Fermentas, Vilnius, Lituânia), seguindo as instruções do fabricante. Para a caracterização do polimorfismo G125A, a enzima *BanI* foi utilizada, resultando em fragmentos de 212, 94 e 86 pb para o alelo *FY*A* e fragmentos de 306 e 86 pb para o alelo *FY*B*. Para a caracterização do polimorfismo T-33C, a enzima *StyI* foi utilizada, resultando em fragmentos de 108 e 81 pb para o alelo normal e 108 e 69 pb para o alelo *FY*B^{ES}*. Já para a caracterização do polimorfismo C265T, a enzima *MSPAII* foi utilizada, resultando em fragmentos de 124, 119, 85, 37 e 27 pb para o alelo normal, enquanto que para o alelo *FY*X* eram esperados fragmentos de 161, 119, 85 e 27 pb. Os produtos resultantes da digestão foram eletroforeticamente separados em gel de poliacrilamida 12,5%, na presença de um marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e corados com nitrato de prata à 0,3%.

4.5. Polimorfismo da CSP

- Extração do DNA plasmodial

As hemácias foram obtidas após a separação das PBMC e tiveram o DNA plasmodial extraído utilizando o Easy-DNA™ Kit (Invitrogen), conforme orientações do fabricante.

- Reação de PCR

A amplificação foi realizada seguindo o descrito por Cassiano et al. (2011) com algumas modificações. Foi preparado um mix de reação com volume final de 25µL, contendo: DNA de *P. vivax*, 1 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM de MgCl, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada oligonucleotídio iniciador (5' AGGCAGAGGACTTGGTGAGA 3' e 5'CCACAGGTTACTGTCATGG 3') e 1 U de Taq Platinum (Invitrogen). A amplificação foi realizada em termociclador (DNA MasterCycler, Eppendorf, Alemanha) como a seguir: um ciclo inicial de 94°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final à 72°C por 10 min. Como controle positivo, foram utilizados três plasmídeos contendo uma inserção do gene da porção repetitiva da CSP amplificado a partir das variantes de *P. vivax* VK210, VK247 e *P.vivax-like* (BlueScript, Stratagene, La Jolla, USA). Para controle negativo de reação, foi utilizada água estéril.

- Análise do produto de PCR

Cinco microlitros (5µL) do produto de PCR foram submetidos a eletroforese à 100 V

por 50 min juntamente com um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen) em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O DNA alvo foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta.

As variantes da CSP de *P. vivax* foram caracterizadas pela análise do Polimorfismo dos Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (RFLP), seguindo o descrito por Cassiano et al. (2011) com modificações. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 20 μ L, contendo: 10 U de AluI (Invitrogen), 2 μ L do tampão de reação da enzima, 10 μ L do produto de PCR e 7 μ L de água esterilizada e livre de DNase. As reações ocorreram em banho-maria à 37°C overnight. Os produtos resultantes da digestão foram eletroforicamente separados em gel de poliacrilamida 12,5%, na presença de um marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen) e corados com nitrato de prata à 0,3.

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Foi utilizado o teste de D'Agostino-Pearson para determinar se a variabilidade das amostras seguiu um padrão de distribuição normal. A significância das diferenças observadas entre pacientes e controle foi determinada utilizando-se teste bicaudal de Mann-Whitney. Para comparação do padrão entre as variantes foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos fatores intrínsecos ao parasito

O grupo infectado apresentou carga parasitária variando entre 2 parasitos/uL e 23333 parasitos/uL, como demonstrado na Figura 10, com parasitemia mediana de 1030 parasitos/uL. Nenhum paciente infectado demonstrou valor de parasitemia igual a zero e todos apresentaram infecção apenas com a espécie *P. vivax*. Todos os indivíduos do grupo controle apresentaram carga parasitária igual a zero.

As cargas parasitárias, em geral, tiveram valores baixos se comparados aos valores obtidos em infecção por *P. falciparum*. Como já referido anteriormente o grupo sanguíneo Duffy possui um receptor para *P. vivax* sendo, portanto, importante na invasão do parasito na célula sanguínea e àqueles que não possuem o antígeno Duffy são naturalmente resistentes (MILLER et al, 1976). Um ensaio de citometria de fluxo descrito por Wolley et al (2000) demonstrou que há maior expressão de Fy na superfície de reticulócitos do que em hemácias maduras no sangue periférico. Tal fato ajuda a comprovar a predileção do *Plasmodium vivax* por hemácias mais jovens, justificando assim a baixa parasitemia geralmente encontrada nesse tipo de malária pois os reticulócitos perfazem pequena porcentagem das células sanguíneas, em torno de 2%.

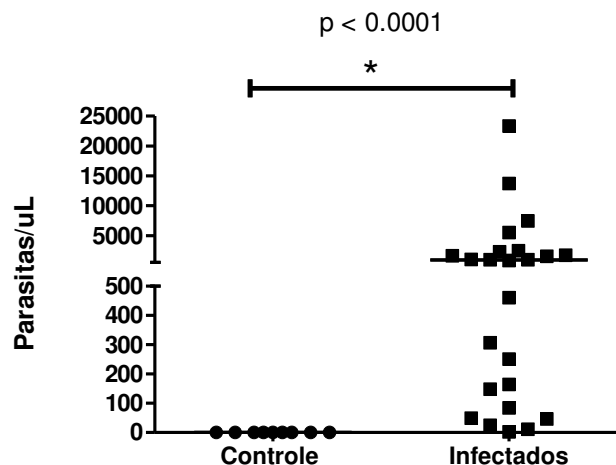


Figura 10. Carga parasitária grupo controle e infectados por *P. vivax*. A carga parasitária foi determinada por PCR real-time. A linha representa a mediana dos grupos (N controle = 9 e N infectados = 24).).

No que se refere ao polimorfismo da proteína circunsporozoíta (CSP), dentre os pacientes infectados, houve predomínio da variante VK210. Numericamente, 56% (14), dos pacientes infectados apresentaram a variante VK210, 24% (6) apresentaram a VK247 e 20%

(5) com infecção mista com as duas variantes. Não houve nenhum paciente com a variante *P. vivax*-like (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de pacientes quanto ao polimorfismo da CSP

Variantes	N	%
VK210	14	56
VK247	6	24
Mista	5	20
<i>P. vivax</i> like	0	0
Total	25	100%

Tais dados corroboram com a literatura, pois nessa região da Amazônia Legal, a variante VK210 é a mais frequente em infecção simples, como demonstrado por Storti-Melo et al (2008) onde 58,7% dos pacientes possuíam essa variante. No entanto, diferentemente do trabalho mencionado, no nosso não encontramos a variante *P. vivax*-like.

Com os recentes casos de agravamento desta doença, até então considerada benigna, foi questionado se os responsáveis por tais acontecimentos eram fatores atribuídos ao hospedeiro ou fatores intrínsecos ao parasito. No que se refere ao parasito, dados contidos na literatura relatam que as variações genéticas em proteínas do parasito, dentre elas a Proteína Circunsporozoíta são grandes alvos imunogênico (RIBEIRO, 2013). Como uma das funções conhecidas da CSP é seu envolvimento na motilidade e invasão do esporozoíta durante sua entrada no hepatócito, sua variação pode ter influência direta nesse processo também.

Estudos anteriores como o de Souza-Neiras et al (2010) já demonstraram que a CSP é um epítipo altamente imunogênico, e que na presença de VK210 ocorre uma menor resposta de anticorpos à VK247 e que a resposta contra estas duas variantes também se torna menor na presença de *P. vivax*-like.

Então decidimos investigar a influência que o polimorfismo da CSP do parasito tinha na carga parasitária, assim como sua influência no estresse oxidativo do paciente. No que se refere à primeira mencionada, evidenciamos diferença na carga parasitária entre as variantes. A variante VK247 apresentou maior parasitemia entre as demais, com valor de mediana igual a 2228 parasitas/uL e valores absolutos que variaram entre 977 parasitas/uL e 7465 parasitas/uL quando comparada a VK210 que apresentou mediana igual a 267 parasitas/uL e

quando comparada à infecção mista (VK210 + VK247) com mediana igual a 140 parasitas/uL (Figura 11).

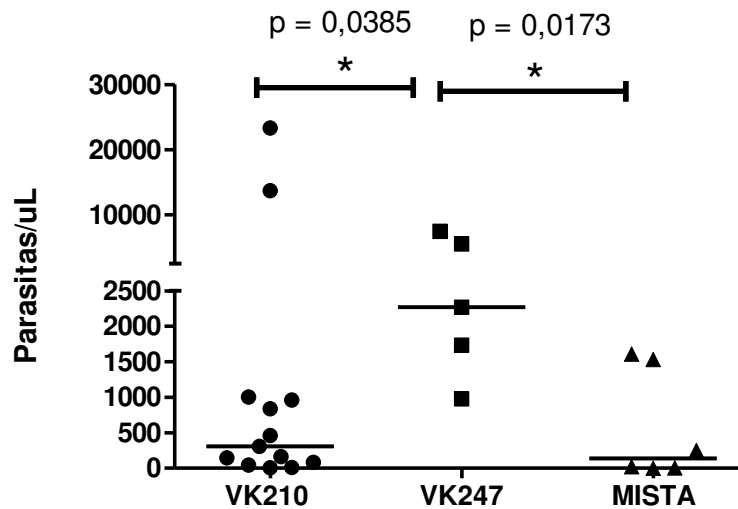


Figura 11. Influência da variante molecular do parasito na carga parasitária. As variantes moleculares foram caracterizadas por PCR-RFLP. A linha representa a mediana dos grupos (VK210 = 267 parasitas/uL, VK247 = 2228 parasitas/uL e Mista = 140 parasitas/uL, respectivamente).

Aparentemente, como demonstrado em nosso estudo e em um estudo anterior de Gonçalves et al (2009), a variante *P. vivax*-like ainda se encontra ausente no Maranhão, apesar de ser encontrada em regiões próximas, como Belém – PA. Tal fato já foi descrito por outros autores e pode dever-se à diferente susceptibilidade do vetor às variantes moleculares de *P. vivax* (SILVA et al, 2006a; ALVES et al, 2007; MOON et al, 2009). A ausência da variante VK247 em infecção única (não mista) em trabalhos anteriores a 2008 e sua detecção por Storti-Melo et al (2008) mostra que o perfil de infecção dessa variante vem se alterando. Em nosso estudo encontramos 5 pacientes com essa variante, ainda que em menor frequência, pode sugerir que essa modificação do perfil é uma adaptação dessa variante ou que houve recente entrada da mesma em nossa região.

5.1. Fatores intrínsecos ao hospedeiro

A genotipagem do Duffy foi realizada nos 25 pacientes infectados, entre estes, o genótipo FyA/FyB foi o mais frequente, expressado por 9 (36%) dos pacientes infectados. Os genótipos genótipos FyB/FyB e FyA/FyB^{ES} estiveram, cada um, presentes em 6 pacientes, ao passo que o genótipo FyB/FyB^{ES} foi apresentado por apenas 3 pacientes e o genótipo FyA/FyA, por apenas 1 paciente. Dentre os 4 fenótipos existentes, o A+B+ foi expressado por 9 pacientes, o A+B- por 7 pacientes e o A-B+ por 9 pacientes. O fenótipo Duffy negativo [A-B-

(FyB^{ES}/FyB^{ES})] não foi apresentado por nenhum paciente desse estudo. O alelo FYX também não foi encontrado. (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência do genótipo Duffy

Genótipo Duffy	N	%
FyA/FyA	1	4%
FyA/FyB	9	36%
FyB/FyB	6	24%
FyB/FyB ^{ES}	3	12%
FyA/FyB ^{ES}	6	24%
FyB ^{ES} /FYB ^{ES}	0	0%

Como dito anteriormente, o genótipo mais frequente foi o FyA/FyB. Este resultado corrobora com outros trabalhos, onde estudos têm mostrado que o genótipo heterogêneo para o Duffy favorece a infecção por *Plasmodium vivax* na região da Amazônia brasileira, ou seja, a presença de ambos os alelos funcionais do genótipo Duffy aumenta o risco de infecção por *P. vivax*, como descrito por Cavasini et al (2007). Neste estudo citado, o segundo genótipo mais frequente foi FyB/FyB seguido dos FyA/FyB^{ES} e FyB/FyB^{ES}. Em nosso estudo, obtivemos frequências semelhantes, divergindo nas frequências dos genótipos FyA/FyA (encontrado em 14% naquele e em apenas 4% entre nossos pacientes), e o Duffy negativo – em baixa porcentagem naquele e ausente no presente estudo. Tal fato podemos atribuir ao número diferente de pacientes estudados (321 x 25) e as regiões distintas de colonização.

Analisando cada genótipo Duffy com a carga parasitária foi observado que os pacientes com o genótipo FyB/FyB apresentaram carga parasitária maior que os demais, sendo essa diferença significativa apenas quando comparada a do genótipo FyA/FyB. Os demais grupos apresentaram carga parasitária semelhante.

Dentre os genótipos, o FyA/FyB possui a mediana mais baixa, com concentração dos valores mais inferiores e igual a 146 parasitos/uL (Figura 12). O FyA/FyA foi apresentado somente por 1 paciente, com parasitemia igual a 2872 parasitos/uL. (FIGURA 12).

Percebemos ainda que os 2 genótipos que detinham um alelo FyA (FyA/FyB e FyA/FyB^{ES}) apresentaram menor parasitemia em comparação aos que não possuíam tal alelo (FyB/FyB e FyB/FyB^{ES}). Tais dados corroboram com a pesquisa de King et al (2011) que referiram que o alelo FyA estava relacionado a menor susceptibilidade ao *P. vivax* por apresentarem menor eficiência de ligação do parasito à PvDBP e, portanto, menor parasitemia. Ao investigar os mecanismos responsáveis por essa ligação diferencial entre os alelos, estes pesquisadores sugeriram ser as diferenças de carga eletrostática entre Fya e Fyb as responsáveis. Isto porque a região N-terminal (da CSP) é carregada negativamente e a PvDBP positivamente. Como há neutralidade eletrostática da glicina presente no FyA isso desencadearia uma ligação com menor força, logo menos eficiente à PvDBP, diferentemente da negatividade observada no ácido aspártico do alelo FyB, que atribui maior força à ligação e conseqüentemente maior eficiência na invasão da célula sanguínea humana.

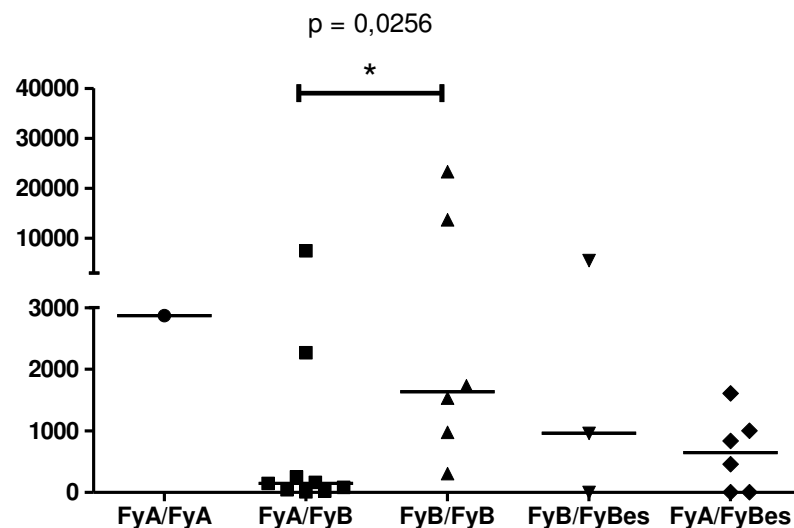


Figura 12. Influência do genótipo Duffy sobre a carga parasitária. A linha representa a mediana dos grupos: FyA/FyA N = 1, FyA/FyB N = 9, FyB/FyB N = 6, FyB/FyB^{ES} N = 3 e FyA/FyB^{ES} com N = 6 respectivamente.

Como não encontramos pacientes infectados com o genótipo Duffy negativo, não podemos concluir se não há susceptibilidade à malária com esse genótipo nesta região, apesar de relatos de diversos autores. Menard et al (2010) em um estudo em Madagascar, acreditam que cepas com capacidade de invasão de eritrócitos Fy- foram selecionadas por circular em regiões altamente endêmicas entre indivíduos Duffy+. Em um estudo posterior, Zimmerman et al (2012) ao observarem pacientes Duffy negativos com malária vivax na região da Amazônia Legal, levantaram a hipótese de que este parasito é capaz de utilizar vias alternativas, com

proteínas ligadoras na região do micronema, para invasão e que tais artefatos apenas permanecem ocultos na presença do antígeno Duffy.

O alelo FyA é caracteristicamente fixado em populações brancas, Europeias e Asiáticas, enquanto o alelo FyB predomina nas populações negras (King et al, 2011). Tal fato não pode ser observado com tanta precisão na maior parte da população brasileira, que sofreu forte influência da colonização de diversos países do mundo. Acreditamos que esse seja talvez o mecanismo responsável pela presença predominante do genótipo heterozigoto. No estudo citado, os autores sugeriram ainda a seleção do alelo FyA pela sua capacidade de diminuir a eficiência da infecção, sendo, portanto, um fator que melhoraria a performance humana frente ao parasito. Tal fato pode ser sustentado com a observação da fixação desse alelo em regiões da Ásia e da América com alta endemicidade.

5.2. Relação entre fatores do parasito e do hospedeiro

Ao avaliarmos a carga parasitária e seus valores associados ao genótipo e à parasitemia observamos que a variante VK210 apresentou maior parasitemia (12454,3 parasitas/uL) no genótipo FyB/FyB que a variante VK247, ao contrário do que verificamos entre os demais genótipos. Houve diferença estatística apenas entre as variantes VK210 dos genótipos FyA/FyB e FyB/FyB com $p = 0,0357$, não havendo entre as demais.

Em termos percentuais, a tabela 3 mostra a frequência das variantes (coluna) associada ao genótipo Duffy (linha). Dentre a variante VK210, o genótipo FyA/FyA representa 7,14% (menor valor) do total de pacientes com a mesma variante enquanto o genótipo FyA/FyB representou 35,7% (maior porcentagem).

Tabela 3. Frequência da variante relacionada ao genótipo

	Variante	VK210	VK247	MISTA	Total
Genótipo	FyA/FyA	1 (7,14%)	0	0	1 (4%)
	FyA/FyB	5 (35,7%)	2 (40%)	2 (33,33%)	9 (36%)
	FyB/FyB	3 (21,42%)	2 (40%)	1 (16,66%)	6 (24%)
	FyB/FyBES	1 (7,14%)	1 (20%)	1 (16,66%)	3 (12%)
	FyA/FyBES	4 (28,56%)	0	2 (33,33%)	6 (24%)
	Total	14 (100%)	5 (100%)	6 (100%)	25 (100%)

Os dados do presente estudo, no que se refere à carga parasitária relacionada à variante de CSP corrobora com outros autores, onde a variante VK210 em geral apresenta menores parasitemias quando comparado à variante VK247 (FIGURA 13). Arruda et al (2007) demonstraram que há resposta de anticorpo menor em presença da última variante, sugerindo que tal fato ocorresse pela recente inserção desse polimorfismo em nossa região. Hipótese essa sustentada em diversos trabalhos (King et al, 2011; Storti-Melo et al, 2008). Portanto, parece que assim como o alelo FyA, tal variante ainda não apresenta total adaptação à nossa região, visto que provoca parasitemias mais elevadas, assim como estresse oxidativo e sintomas mais severos, exercendo um perfil mais inflamatório que regulador, o que será discutido de forma mais aprofundada adiante.

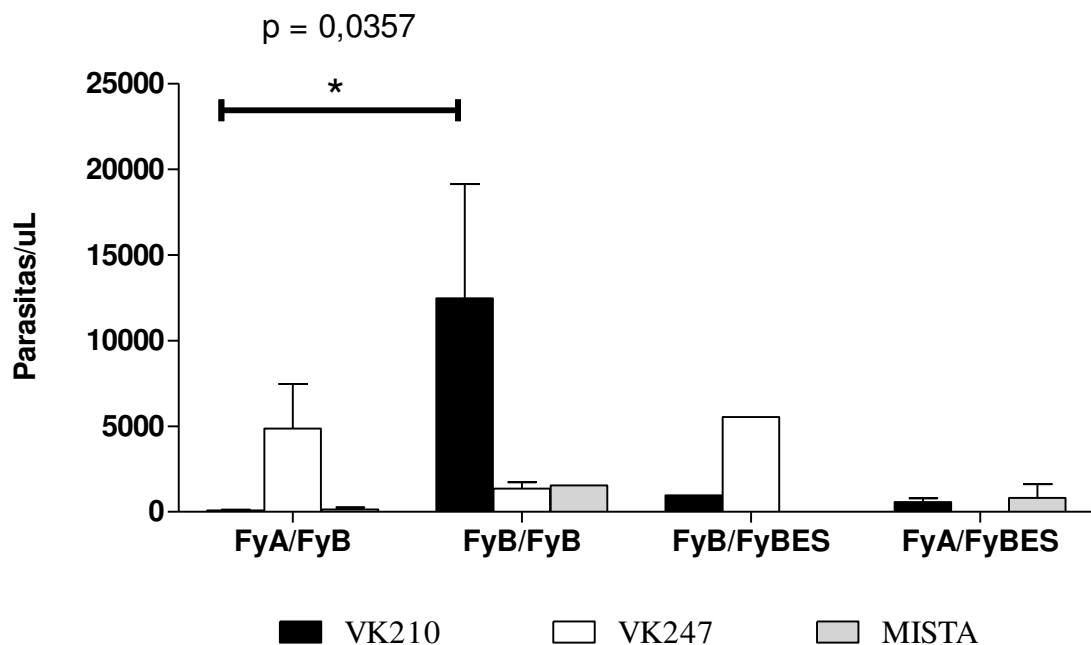


Figura 13. Análise entre carga parasitária, o genótipo Duffy e as variantes do parasito. N da variante VK210 = 14, da VK247 = 5 e Mista = 6. N dos genótipos: FyA/FyB = 9, FyB/FyB = 6. FyB/FyB^{ES} = 3, FyA/FyB^{ES} = 6. Houve diferença estatística entre a densidade parasitária do genótipo FyB/FyB que apresentou a variante VK210 e o genótipo FyA/FyB que apresentou a mesma variante. $p = 0,0357$.

5.3. Quantificação da atividade da SOD-1 no Plasma, sua correlação com a parasitemia e análise da influência do genótipo Duffy na atividade desta enzima

Andrade et al (2010) encontraram correlação significativa entre a SOD e a carga parasitária em pacientes gravemente infectados por malária vivax, mostrando que os níveis de SOD-1 foram bem mais eficazes em prever a gravidade desta infecção do que o TNF- α . Baseados nestes achados avaliamos então se essa mesma característica se estenderia à infecção

simples encontrada em nossa região e se haveria sua relação com o genótipo Duffy expresso nos pacientes. Como já mencionado, o radical superóxido é vital para as células de defesa do organismo e devido a isso a atividade da SOD no grupo controle, mesmo não havendo estresse oxidativo nesse grupo, é diferente de zero. Já no grupo infectado o maior nível de atividade da SOD-1 provavelmente deve-se ao estresse oxidativo ocasionado por dois mecanismos principais: resposta imune ativada do hospedeiro e replicação do parasito com posterior degradação da hemoglobina. Apesar desta ser sua fonte de aminoácidos, a reprodução intraeritrocitária do parasito provoca degradação da hemoglobina, com produção de heme livre, tóxico, e radicais livres de oxigênio, conferindo insulto oxidativo na célula hospedeira. No entanto, para sobreviver nesse meio o parasito também possui um sistema enzimático de defesa antioxidante, incluindo as proteínas glutathiona e tioredoxina descritas por Becker et al (2004), que constituem em um mecanismo de escape do parasito. Portanto, o sistema redox desempenha um papel indispensável para a sobrevivência de *Plasmodium* no interior do hospedeiro.

A quantificação da atividade da SOD-1 no plasma foi analisada entre os grupos controle e infectados, demonstrando diferente atividade entre os mesmos. Dentre o grupo controle, a atividade da SOD-1 teve valores que variaram entre 48,2 U/mL e 93,5 U/mL e com concentração mediana igual a 60 U/mL. Já nos pacientes infectados, os valores variaram entre 15,9 U/mL e 101,9 U/mL, com mediana igual a 77,8 U/mL (Figura 14).

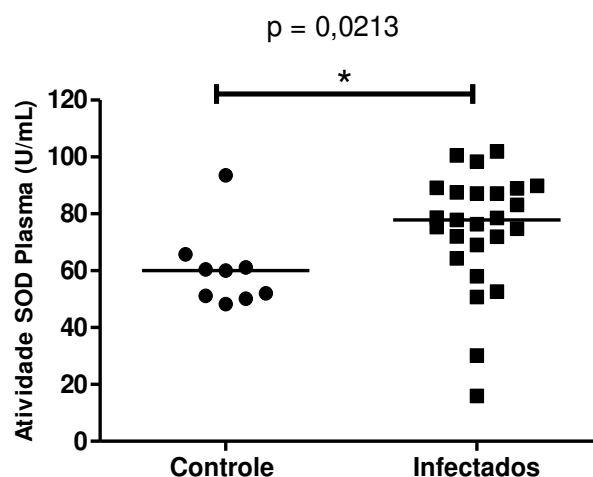


Figura 14. Quantificação da atividade da SOD-1 no plasma dos grupos controle e infectados por malária vivax. O traço representa a mediana dos grupos (Controle N = 9 e Infectados N = 23).

Apesar de encontrarmos níveis maiores de atividade da SOD-1 no grupo infectado, ao correlacionarmos a parasitemia com a atividade dessa enzima nesse grupo, não encontramos

significância ($p = 0,304$). No trabalho de Andrade et al (2010), essa correlação foi positiva, onde quanto maior era a parasitemia, maior o nível da SOD-1. No entanto, neste estudo, a SOD-1 foi avaliada como marcadora em pacientes com malária grave ocasionada por *P. vivax*, diferentemente do nosso estudo, onde eram todos com infecção simples. Adicionalmente, no estudo citado, os valores de parasitemia eram bem superiores aos que encontramos. Ao avaliarmos a atividade da SOD em relação ao genótipo Duffy, a atividade dessa enzima apresentou importante variação entre os genótipos, com valor mínimo de 15,91 U/mL no genótipo FyB/FyB e valor máximo de 101,9 U/mL no genótipo FyA/FyB (Figura 15 B). Observando as medianas, percebemos que dentre os grupos que apresentaram maior parasitemia (ausência do alelo A), houve menor atividade da SOD-1, e nos grupos de menor parasitemia (FYA/FyB e FyA/FyB^{ES}) houve maior atividade da enzima superóxido dismutase, com diferença estatística entre os genótipos FyA/FyB e FyB/FyB e entre este último e o genótipo FyA/FyB^{ES} (Figura 15).

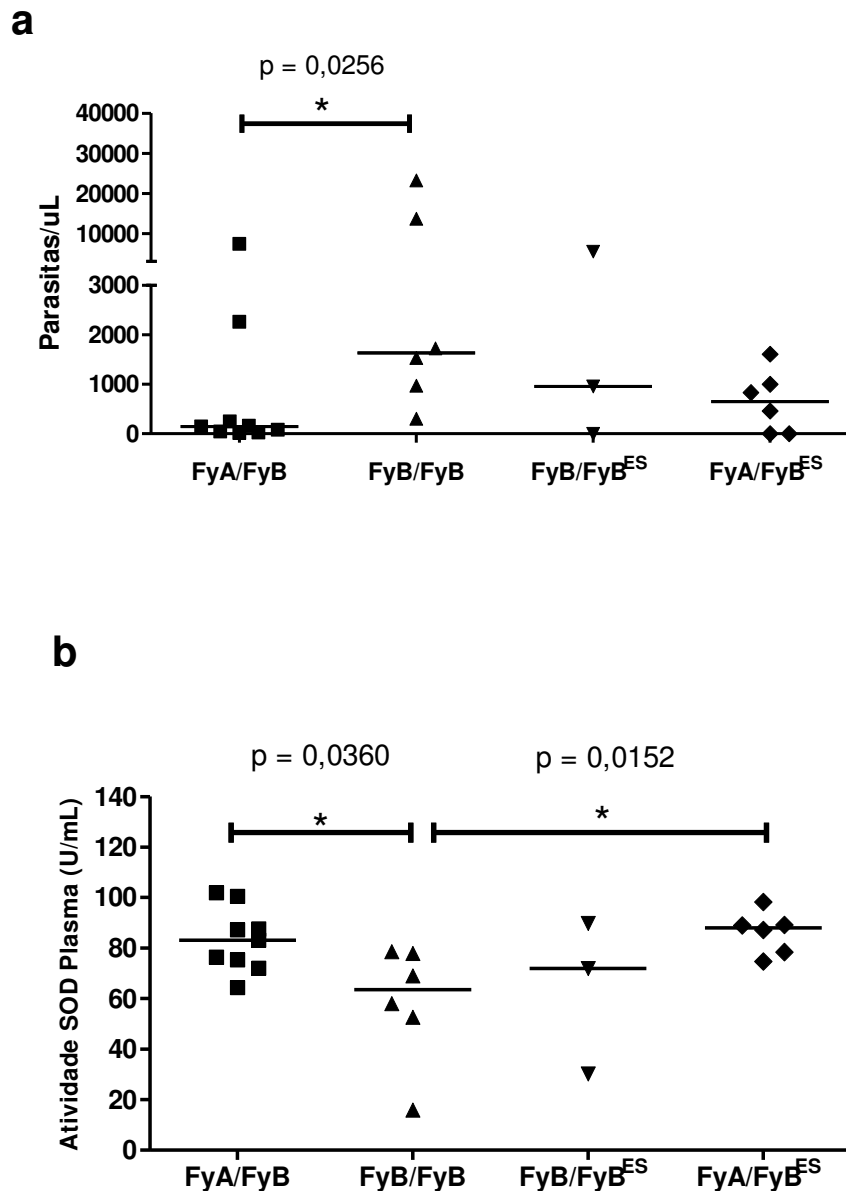


Figura 15. Comparação entre os genótipos Duffy de acordo com a carga parasitária e a atividade da SOD-1. a) Carga parasitária e Genótipo Duffy. Houve diferença estatística entre os genótipos FyA/FyB, que teve a menor mediana de parasitemia entre todos e FyB/FyB, com valor de $p = 0,0256$. Não houve diferença entre os demais genótipos. **b) Genótipo Duffy e Atividade da SOD-1 no Plasma.** A linha representa a mediana dos grupos (FyA/FyB N = 9, FyB/FyB N = 6, FyB/FyB^{ES} N = 3 e FyA/FyB^{ES} com N = 6 respectivamente). Dois p significativos: $p = 0,0360$ entre FyA/FyB e FyB/FyB e outro $p = 0,0152$ entre FyB/FyB e FyA/FyB^{ES}.

Como já mencionado, na replicação do parasito existe a formação de superóxido de hidrogênio, que, por mecanismos de defesa do hospedeiro mediado pela SOD, é dismutado originando peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em situação fisiológica, ou seja, na ausência do

parasito, quando há produção do peróxido, outras enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathione redutase o convertem em água com posterior eliminação, sem danos ao organismo. No entanto, na presença do parasito e na degradação da hemoglobina, muito heme e ferro livre são liberados e esse metal é catalisador para a reação de Fenton, potencializando a formação do radical hidroxila, que é ao mesmo tempo lesivo ao organismo e ao parasito. A reação mencionada consiste na produção do radical hidroxila a partir do metabólito H_2O_2 catalisado pelo ferro livre ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + \cdot OH$). Ou seja, a SOD fornece o substrato da reação (H_2O_2) e o ferro livre catalisa, havendo produção facilitada do radical hidroxila (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A SOD-1 que quantificamos em nosso estudo é um marcador do plasma do hospedeiro, demonstrando a atividade da enzima SOD. Em termos numéricos, quanto maior a atividade de superóxido dismutase, maior deveria ser a dismutação do ânion superóxido. Mas tal fato seria diretamente proporcional também à produção de radical hidroxila, que é lesivo tanto para o hospedeiro quanto para o parasito, resultando em sua morte e/ou eliminação do organismo.

Dessa forma, acreditamos que o parasito desenvolve um mecanismo de escape a essa reação tóxica, mantendo um perfil imune regulador, para que não haja produção de superóxido pelo sistema imune do hospedeiro a fim de não desencadear todo o processo mencionado. Hipótese esta sustentada pela característica apresentada por células inflamatórias, descrito por Imlay em 2003, onde a produção dos intermediários de oxigênio ocorre principalmente por ação catalítica das enzimas NADPH oxidase, a qual acelera a formação do radical ânion superóxido. Ou seja, ter células com perfil inflamatório seria mais um fator somatório na produção das EROS, e portanto lesivo ao parasito. Tal análise corrobora com os dados encontrados por Camelo (2015) e Ribeiro (2013) onde o perfil de citocinas desencadeado pelo parasito em malária vivax simples estudados era regulador e não inflamatório, mantendo no geral uma menor parasitemia. Mais estudos são necessários para esclarecer todas as enzimas, citocinas e substâncias envolvidas nessas reações, mas sugerimos no presente estudo que esses mecanismos são mais eficientes quanto maior a eficiência de invasão do parasito na célula sanguínea.

Por fim, para melhorar a qualidade de vida de milhões de pessoas que são anualmente infectadas pelo *Plasmodium vivax*, além de avanços com a terapia, e ainda mais importante que isso, está a profilaxia. Os métodos atuais de combate ao mosquito e proteção pessoal com mosquiteiros e repelentes não são suficientes e o desenvolvimento de uma vacina alcançaria um patamar de profilaxia necessário. Para sucesso na formulação de uma vacina desta doença depende-se de diversos fatores ainda desconhecidos como a identificação e caracterização dos

diversos antígenos pré-eritrocitários, a exemplo da CSP, das proteínas de superfície do merozoíto no estágio sanguíneo (MSP-1), do antígeno de membrana apical (AMA-1) e o completo entendimento sobre a Proteína de Ligação ao Antígeno Duffy, assim como compreender a modulação genética e de resposta imune existentes nessa infecção. Portanto, mais pesquisas se fazem necessárias no intuito de ajudar no combate desta doença.

6. CONCLUSÕES

- A variante VK247 determinou maior carga parasitária quando comparada à variante VK210.
- O genótipo FyB/FyB demonstrou maior carga parasitária, enquanto que o alelo FyA foi relacionado às menores parasitemias.
- A quantificação da atividade da SOD-1 não apresentou diferença estatística quando comparada entre as variantes assim como não demonstrou correlação com a parasitemia.
- A SOD-1 foi inversamente proporcional à parasitemia quando comparada dentro de cada genótipo específico.

7. REFERÊNCIAS

ALVES R, PÓVOA M, GOLDMAN I, CAVASINI C, ROSSIT A, MACHADO R. A new polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism protocol for *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotype (VK210, VK247, and *P. vivax*-like) determination. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 2007; 59: 415– 419.

ALEXANDRE M, FERREIRA C, SIQUEIRA A, MAGALHAES BL, MOURAO MP, LACERDA MV, ALECRIM MG. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, 2010. 16: 1611-1614.

ALLEN, R.G. & BALON, A.K. Oxidative influence in development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. **Free Radical Biology & Medicine** 1989. 6: 631–661.

AMINO R, THIBERGE S, MARTIN S, CELLI S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F & MÉNARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine** 2006. 12: 220 - 224.

ANDRADE B, REIS-FILHO A, SOUZA-NETO S, RAFFAELE NETTO I, CAMARGO L, BARRAL A, BARRAL-NETTO M. Plasma Superoxide Dismutase-1 as a Surrogate Marker of Vivax Malaria Severity. **PLoS Neglected Tropical Disease** 2010. 4(4): e650.

ANDRADE B, REIS-FILHO A, SOUZA-NETO S, CLARÊNCIO J, CAMARGO L, BARRAL A, BARRAL-NETTO M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, 2010, 9:13.

AREVALO-HERRERA M, HERRERA S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. **Molecular Immunology** 2001, 38: 443-455.

ARNOT DE, BARNWELL JW, TAM JP. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science** 1985; 230: 815-817.

BARNWELL J, NICHOLS M, RUBINSTEIN P. Vitro evaluation of the role of the duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **Journal of Experimental Medicine** 1989. Volume 169: 1795-1802.

BASSAT Q, ALONSO P. Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. **Nature Medicine** 2011. 17; 48-49.

BECKER K, TILLEY L, VENNERSTROM JL, ROBERTS D, ROGERSON S, GINSBURG H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**. 2004: 163-89.

BEESON J, CRABB S. Towards a Vaccine against *Plasmodium vivax* Malaria. **PLoS Medicine** 2013; 4 (12): e350.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 2. ed. – Brasília, 2009. 116 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília : Ministério da Saúde, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. 2011. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 30 de julho de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília, 2014. Volume único, p 569-600.

BARBER B, WILLIAM T, GRIGG M, PARAMESWARAN U, PIERA K, PRICE R, TSIN W, NICHOLAS M. Parasite Biomass-Related Inflammation, Endothelial Activation, Microvascular Dysfunction and Disease Severity in Vivax Malaria. **PLoS Pathogens** 11(1): e1004558.

CAMARGO, EP (2003). MALÁRIA, MALEITA, PALUDISMO. **Ciência e Cultura** 2003. vol.55 no.1 São Paulo.

CAMELO DMF. Influência do perfil de citocinas e da superóxido dismutase sobre a carga parasitária na infecção aguda por *Plasmodium vivax*. Monografia (Graduação em Medicina) – Universidade Federal do Maranhão, 2015.

CASSIANO GC, STORTI-MELO LM, POVOA MM, GALARDO AKR, ROSSIT ARB, MACHADO RLD. Development of PCR–RFLP assay for the discrimination of Plasmodium species and variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in Anopheles mosquitoes. **Acta Tropica** 2011. 118: 118.

CAVASINIC, DE MATTOS L, COUTO A, COUTO V, GOLLINO Y, MORETTI L, BONINI-DOMINGOS CR, ROSSIT A, CASTILHO L, MACHADO R (2007). Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malaria Journal** 2007. 6:167.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria 2012. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>> Acesso em 09 de janeiro de 2015.

CHITNIS, CE. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. **Current opinion in hematology** 2001. 85-91.

CUIL, MASCORRO CN, FAN Q, RZOMP KA, KHUNTIRAT B, ZHOU G, CHEN H, YAN G, SATTABONGKOT J. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2003, 68:613-619.

CUNHA C, CUNHA B. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. **Journal of Vector Borne Diseases** 2008, pp. 194–199.

CUTBUSH M, MOLLISON PL, PARKIN DM. A new human blood group. **Nature** 1950, p 165-88.

FERREIRA A, MATSUBARA L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina Brasileira** 1997; v.43, n.1, p.61-68.

GONÇALVES E, MACHADO R, SANTOS A, MATOS W, SILVA A. Caracterização de genótipos de *Plasmodium vivax* na Ilha de São Luís, Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2009; 42: 315-317.

GREENWOOD B, BOJANG K, WHITTY C, TARGETT G. Malaria. **Lancet**, 2005; 365: 9469, 1487-149.

GUILLEMIN, J. Choosing Scientific Patrimony: Sir Ronald Ross, Alphonse Laveran, and the Mosquito-Vector Hypothesis for **Malaria**. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences** 2002. Volume 57, Number 4, pp. 385-409.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWEL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annual of the New York Academy of Sciences**, 200. v.899, p.136- 147.

HADLEY T, PEIPER C. From malária to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood Journal** 1997; vol. 89, p 3077-3091.

HAFALLA JC, SILVIE O, MATUSCHEWSKI K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews** 2011; 240: 297–316.

HANSCHIED T, LANGIN M, LELL B, POTSCHEKE M, OYAKHIROME S, KREMSNER P, GROBUSCH M. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. **Malaria Journal** 2008; 7:109.

HENRY-HALLDIN C, SEPE D, SUSAPU M, MCNAMARA D, BOCKARIE M, KING C, ZIMMERMAN P. High-throughput molecular diagnosis of circumsporozoite variants VK210 and VK247 detects complex *Plasmodium vivax* infections in malaria endemic populations in Papua New Guinea. **Infection, Genetics and Evolution**. 2011. 11(2): 391-398.

HOWES RE, PATIL AP, PIEL FB, NYANGIRI OA, KABARIA CW, GETHING PW, ZIMMERMAN PA, BARNADAS C, BEALL CM, GEBREMEDHIN A, MÉNARD D, WILLIAMS TN, WEATHERALL DJ, HAY SI. The global distribution of the Duffy blood group. **Nature Communications** 2011. 2:270.

HYE-LIM J, JUNG-MI K, SUNG-UNG M, JUNG-YEON K, HYEONG-WOO L, KHIN L, WOON-MOK S, JIN-SOO L, TONG-SOO K, BYOUNG-KUK N. Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates. **Malaria Journal** 2012; 11:60.

IKIN EW, MOURANT AE, PETTENKOFFER HJ, BLUMENTHAL G. Discovery of the excepted haemagglutinin anti-Fyb. **Nature** 1951; 168:1.077.

IMLAY, JA. Pathways of Oxidative Damage. **Annual Review of Microbiology**, 2003. Vol. 57: 395-418.

KAIN K, BROWN A, WEBSTER H, WIRTZ R, KEYSTONE J, RODRIGUEZ M, KINAHAN J, ROWLAND M, LANAR D. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* dried blood specimens. **Journal of Clinical Microbiology** 1992, 30: 1863-1866.

KAPOOR, G.; BANYAL, H.S. Glutathione reductase and thioredoxin reductase: novel antioxidant enzymes from *Plasmodium berghei*. **Korean Journal of Parasitology**, 2009. v.47, n.4, p.421-424.

KIBRIA M, ELAHI R, MOHON A, KHAN W, HAQUE R, ALAM M. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in clinical isolates from Bangladesh. **Malaria Journal** 2015, 14:267.

KING C, ADAMS J, XIANLI J, GRIMBERGA B, MCHENRYC A, GREENBERGA L, SIDDIQUIA A, HOWESD R, SILVA-NUNESE M, FERREIRAE M, ZIMMERMAN P. *Fya/Fyb* antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)** 2011. Vol 108 n° 50.

KOCHAR DK, SAXENA V, SINGH N, KOCHAR SK, KUMAR SV, DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. **Emergence Infectious Disease** 2005; 11: 132-134.

KWIATKOWSKI D, NOWAK M. Periodic and chaotic host-parasite interactions in human malaria. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences** 1991. Vol. 88, pp. 5111-5113.

LACERDA M, FRAGOSO S, ALECRIM M, ALEXANDRE M, MAGALHÃES B, SIQUEIRA A, FERREIRA L, ARAÚJO J, MOURÃO M, FERRER M, CASTILLO P, MARTIN-JAULAR L, FERNANDEZ-BECERRA C, del PORTILLO H, ORDI J, ALONSO P, BASSAT Q. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? **Clinical Infectious Disease** 2012; e 67-74.

LAMIKANRA A, BROWN D, POTOCNIK A, CASALS-PASCUAL C, LANGHORNE J, ROBERTS DJ. Malarial anemia: of mice and men. **Blood Journal** 2007; 110: 18–28.

LOIOLA C, SILVA C, TAUIL P. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana Salud Publica** 2002. 11: 235-244.

MACHADO R, FIGUERIREDO-FILHO A, CALVOSA V, FIGUEREDO M, NASCIMENTO J, PÓVOA M. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. **Brazilian Journal of Infectious Disease** 2003; 7:175-177.

MCCORD J, FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal Biology Chemistry** 1969. 244 (22), 6049-55.

MENDES C, DIAS F, FIGUEIREDO J, MORA VG, CANO J, DE SOUSA B, ET AL. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax* –molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). **PLoS Neglected Tropical Disease**. 2011; 5:e1192.

MENARD D, BOUCHIER C, HENRY-HALLDIN C, GRAY L, RATSIMBASOA A, THORNIER V, CAROD J, DOMARLE O, COLIN Y, BERTRAND O, PICOT J, KING C, GRIMBERG B, PUIJALON O, ZIMMERMAN P. *Plasmodium vivax* clinical malária is

commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 2010, v. 78, p. 345-348.

MERCEREAU-PUIJALON O, MÉNARD D. Plasmodium vivax and the Duffy antigen: a paradigm revisited. **Transfusion Clinique et Biologique** 2010; Sep :176-83.

MILLER LH, MASON SJ, CLYDE FD, McGINNISS MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **The New England Journal of Medicine** 1976; 295- 302.

MILLER, LH, MASON SJ, DVORAK JA, Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. **Science** 1975; 189:561.

MOON S, LEE H, KIM JY, NA BK, CHO SH, LIN K, SOHN WM, KIM TS. High frequency of genetic diversity of Plasmodium vivax field isolates in Myanmar. **Acta Trop.** 2009; 109:30–36.

MOURÃO F, DA CUNHA A, SILVA R, SOUZA E. A vigilância da malária na Amazônia Brasileira. **Biota Amazônia** 2014. Disponível em <http://periodicos.unifap.br/index.php/biota>.

PESSOA S, MARTINS A. Gênero Plasmodium - Parasitas da malária. **Parasitologia Médica** 1982. 11^a.ed. Rio de Janeiro; 11: 280-291.

PRAKASH J, SINGH A, KUMAR N, SAXENA R. Acute renal failure in Plasmodium vivax malaria. **Journal of the Association Physicians India** 2003, 51:265-267.

QARI S, SHI Y, GOLDMAN I, UDHAYAKUMAR V, ALPERS M, COLLINS W, LAL A. Identification of *Plasmodium vivax*- like human malaria parasite. **Lancet** 1993; 341: 780-783.

RENAULT C, BASTOS F, FILGUEIRA J, HOMMA, T. Epidemiologia da malária no município de Belém – Pará. **Revista Paraense de Medicina** 2007; 21(3):19-23.

RIBEIRO BP. Citocinas na malária vivax: influência das variantes moleculares do parasito ou das características do hospedeiro? Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Maranhão, 84f, 2013.

RICCIARDI A, NDAO M. Diagnosis of Parasitic Infections: What's Going On? **Journal of Biomolecular Screening** 2015, Vol. 20(1) 6–21.

ROSENBERG R, WIRTZ R, LANAR D, SATTABONGKOT J, HALL T, WATERS A, PRASITTISUK C. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science** 1989; 245: 973–976.

SILVA A, SANTOS C, LACERDA R, MACHADO R, PÓVOA M. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2006; 101:547–550.

SINKA M, BANGS M, MANGUIN S, RUBIO-PALIS Y, CHAREONVIRIYAPHAP T, COETZEE M, MBOGO C, HEMINGWAY J, PATIL A, TEMPERLEY W, GETHING P, KABARIA C, BURKOT T, HARBACH R, HAY S. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors** 2012, 5:69.

SOUZA-NEIRAS W, STORTI-MELO L, CASSIANO G, COUTO V, COUTO A, SOARES I, CARVALHO L, CUNHA M, PÓVOA M, HERRERA S, HERRERA M, ROSSIT A, CARARETO C, MACHADO R. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? **Malaria Journal** 2010, 9:178.

STEFANI A, DUSFOUR I, CORRÊA A, CRUZ M, DESSAY N, GALARDO A, GALARDO C, GIROD R, GOMES M, GURGEL H, LIMA A, MORENO E, MUSSET L, NACHER M, SOARES A, CARME B, ROUX E. Land cover, land use and malaria in the Amazon: a systematic literature review of studies using remotely sensed data. **Malaria Journal** 2013. 12: 192.

STORTI-MELO L, DE SOUZA-NEIRAS W, CASSIANO G, JOAZEIRO A, FONTES C, BONINI-DOMINGOS C, D'ALMEIDA COUTO Á, POVOA M, DE MATTOS L, CAVASINI

C. Plasmodium vivax circumsporozoite variants and duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 2009; 103:672–678.

TUTEJA R. Malaria – an overview. **FEBS Journal** 2007. Volume 274, Issue 18, pages 4670–4679.

VALENTINE J, DOUCETTE P, POTTER S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual Review Biochemistry** 2005. 74:563–93.

WILSON, M. Malaria Rapid Diagnostic Tests. **Clinical Infectious Diseases** 2012; 1637–41.

WOOLLEY I, HOTMIRE K, SRAMKOSKI R, ZIMMERMAN P, KAZURA J. Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. **Transfusion**, 2000. 40, 949-953.

ZAKERI S, MEHRIZI A, DJADID N, SNOUNOU G. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical Plasmodium vivax isolates from Iran. **Tropical Medicine and International Health** 2006; 2: 729-737.

ZIMMERMAN P, FERREIRA M, HOWES R, MERCEREAU-PUJALON O. Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax. **Advances in Parasitology** 2013 ; 81: 27–76.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ao assinar este termo, consinto livremente, após esclarecimentos prévios, em participar da pesquisa intitulada “Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão”, coordenado pelos professores doutores Flávia Raquel F Nascimento e Antônio Rafael da Silva. Estou ciente que o projeto visa caracterizar os aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da malária causada por *P. vivax* para melhor entender a doença, a sua progressão e a melhor forma de tratamento. Minha participação nesta pesquisa restringe-se à entrevista, à doação de amostra de sangue e à obediência ao protocolo de tratamento que me será dado pelos médicos da equipe. O meu sangue será utilizado para realização de experimentos biológicos para avaliar parâmetros relacionados ao parasito causador da Malária. O sangue que eu doar será estocado para pesquisas futuras. Estou ciente de que será feito acompanhamento clínico e exames parasitológicos regulares para verificação da eficácia do tratamento. Para isso, deverei retornar sempre que chamado pelos médicos da equipe e para isso receberei vales transportes para o deslocamento. Atesto, portanto, que entendi a proposta do projeto e concordo em participar da pesquisa doando amostras de sangue e cooperando com o tratamento. Atesto ainda que os pesquisadores garantiram que o meu tratamento será garantido mesmo que eu não concorde em responder o questionário ou doar as amostras de sangue para a pesquisa.

Nome _____ Data _____

Endereço _____

Testemunha _____

Pesquisadores responsáveis:

Profa. Dra. Flávia Raquel F. Nascimento e Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva

Universidade Federal Do Maranhão

Endereço: Av dos Portugueses s/n, Campus do Bacanga, Integrado Bloco I, Lab. de Imunofisiologia

Telefone:98 33018548

E-mail:nascimentoofrf@yahoo.com.br

ANEXO II

ANEXO I



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

x PROJETO DE PESQUISA	Número do Protocolo	23115 008013/2010-07
PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	Data de entrada no CEP	18/06/2010
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	Data da assembleia	15/09/2010

I - Identificação:

Título do projeto:	Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por <i>Plasmodium vivax</i> no Estado do Maranhão		
Identificação do Pesquisador Responsável:	Profa Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento		
Identificação da Equipe executora:	Flavia Raquel Fernandes do Nascimento, Antonio Rafael da Silva, Eloisa d Graça do Rosário Gonçalves, Valério Monteiro Neto, Ricardo Luiz Dantas Machado, Maria Regina D'Imperio Lima, Cláudio Romero Farias Marinho, Marcos Grigolin Grisotto.		
Instituição onde será realizado:	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	III	Multicêntrico:	Não
Cooperação estrangeira:	Não	Patrocinador:	Sim
		Data de recebimento:	25/08/2010
		Data de devolução	14/09/2010

II - Objetivos:

Geral:

Correlacionar os aspectos clínico-epidemiológicos com os achados moleculares e imunológicos da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão.

Específico:

1. Caracterizar os aspectos clínicos e epidemiológicos da malária por *P. vivax*;
2. Determinar a frequência dos genótipos da proteína Duffy na população estudada;
3. Determinar a carga parasitária e a frequência dos genótipos da proteína circunsporozoítica em amostras de pacientes;
4. Analisar o perfil de citocinas e de anticorpos e o fenótipo dos leucócitos no sangue de pacientes;
5. Identificar e caracterizar novos alvos biológicos com finalidade diagnóstica e terapêutica;

III - Sumário do projeto:

O projeto de pesquisa "Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão" busca o aprimorar o conhecimento molecular acerca das variantes do *Plasmodium vivax* existentes no estado de modo a correlacionar estes achados com as características clínico - epidemiológicas de casos com desfechos de maior gravidade, tais como coagulopatias, comprometimento cerebral, insuficiência renal, dentre outras. Para tanto, estão associados em consórcio o Centro de Referência em Doenças Infecciosas do Departamento de Patologia e os Laboratórios de Imunofisiologia e de Genética e Biologia Molecular, cujas produções técnico - científicas dão substrato confiável à execução do mesmo. O recrutamento de pacientes será realizado pelo centro de referências, onde os mesmos serão atendidos e acompanhados clinicamente. O projeto descreve ainda todos os cuidados e atenção necessários aos pacientes quer aceitem ou não a participação no projeto. Este é um estudo com pleno financiamento pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão - FAPEMA.