

LIDIANE MARTINS LIMA CURY

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA
REGIÃO II DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO
ANTÍGENO DUFFY (DBP) EM ISOLADOS DE
*PLASMODIUM VIVAX***

RIO DE JANEIRO

2019

LIDIANE MARTINS LIMA CURY

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA
REGIÃO II DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO
ANTÍGENO DUFFY (DBP) EM ISOLADOS DE
*PLASMODIUM VIVAX***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Biomedicina da Universidade do Grande Rio como
requisito à obtenção do título de obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Ferreira da
Cruz

Coorientadora: MSc. Natália Ketrin Almeida de
Oliveira

RIO DE JANEIRO

2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho às seguintes pessoas

A Deus primeiramente por ter me conduzido até aqui; sendo autor da minha vida me iluminou em todo momento desta pesquisa.

A minha avó (i.m), por todo esforço que fez em toda sua vida para que eu chegasse onde eu queria e sempre se orgulhou de mim.

Ao meu esposo Alexandre por ter sido meu maior incentivador em todos os momentos durante minha graduação; e compreensão nos momentos difíceis.

A minha mãe Vânia, minha irmã Ana Beatriz, minha prima Helena, meu tio Valcyr e sua esposa Andréia, meu sogro Claudiones, minha sogra Fátima, meus cunhados Thiago e Davi, enfim todos familiares que de alguma forma me incentivaram a não desistir deste sonho.

A Rebecca minha amiga querida, que compartilhou comigo os momentos no laboratório; foram muitos experimentos e dias bem corridos que eram muito mais agradáveis com você ao meu lado.

A minha orientadora Dra. Fátima, pela oportunidade, por acreditar em mim e o incentivo de continuar amando fazer ciência.

A minha coorientadora, Natália por cada ensino, conselho, ajuda e amizade em todos os momentos. As palavras de motivação fazem toda a diferença na vida acadêmica.

A querida Aline Lavigne que me ensinou tanta coisa, e participou de muitos momentos dessa jornada, e sempre teve palavras de incentivo.

A professora Natália Cordeiro que mesmo com tantos alunos para ver os trabalhos, teve muita paciência, dedicação e carinho conosco. E mesmo grávida do João não media esforços em ajudar cada aluno a melhorar.

Enfim a todos aqueles que de alguma maneira participaram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoário *Plasmodium*, que por sua vez é transmitido ao humano pela fêmea infectada e infectante do vetor *Anopheles*. São 7 as espécies de plasmódio causadoras da infecção no homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. simium* e, mais recentemente, *P. cynomolgi*. Das 6 espécies de plasmódios que causam a doença no homem, o *P. vivax* é a espécie responsável pelo maior número de casos fora do continente africano, sendo predominante na Região das Américas, representando 74,1% dos casos de malária e 89% dos casos no Brasil. O *P. vivax* possui uma proteína de adesão chamada *Duffy binding protein (DBP)* que é muito importante no mecanismo de invasão do parasito no eritrócito. A DBP se liga aos eritrócitos através do receptor DARC do inglês *Duffy antigen receptor for chemokines* (antígeno *Duffy* / receptor para quimiocinas). A ligação DBP-DARC é irreversível, portanto os esforços para entender como bloquear essa ligação e impedir que o parasito escape do sistema imune tem sido feitos. Assim, uma boa estratégia é investigar os polimorfismos que ocorrem na região II da DBP, que é a região de ligação com o receptor, e consequentemente região mais polimórfica da proteína. Com esse fim, no presente estudo foram analisadas 216 amostras, 137 da Amazônia Legal e 79 da Mata Atlântica Fluminense e 12 de regiões não brasileiras. Foram identificados 27 polimorfismos, 1 sinônimo e 26 não sinônimos, distribuídos em 21 códons, sendo 17 com troca em um único nucleotídeo (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), 2 códons com substituição em 2 nucleotídeos e 2 códons com substituições nas 3 posições. Os polimorfismos encontrados nos aminoácidos: 417, 419 e 503 já foram descritos e mostraram fazer parte de epítomos que podem alterar o caráter antigênico da DBP. Tais resultados demonstram que alelos polimórficos de *vivax* estão amplamente distribuídos em diferentes áreas brasileiras e tais variantes deveriam entrar na composição de uma vacina que tenha como alvo a proteína DBP para aumentar a sua eficácia, inclusive em áreas de Mata Atlântica Fluminense.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium vivax*. proteína de ligação *Duffy*.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* protozoan which in turn is transmitted to humans by the infected and infecting female of Anopheles vector. There are 7 species of *Plasmodium* that cause infection in man: *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. Knowlesi*, *P.simum* and more recently , *P. cynomolgi*. *P. vivax* is the specie responsible for the largest number of cases outside the African continent, being predominant in the Region of the Americas, accounting for 74,1% of the malaria cases. In Brasil *P. vivax* is responsible for 89% of the cases. *P. vivax* has an adhesion protein called Duffy binding protein (DBP), which is very important in the erythrocyte parasite invasion mechanism. DBP binds erythrocytes through the DARC receptor of the Duffy antigen receptor for chemokines. The DBP-DARC binding is irreversible, so efforts to understand how to block this binding and prevent the parasite from escaping of the immune system have been done; a good strategy is to investigate the polymorphisms that occur in region II of DBP, which is the binding region with receptor, and hence the more polymorphic region of the protein. For this purpose, in the presente study, 216 samples were analyzed: 137 from the Legal Amazon, 79 from Fluminense Atlantic Forest and 12 from non-Brazilian regions. We identified 27 polymorphisms, 1 synonymous and 26 non-synonymous, distributed in 21 codons, 17 with single nucleotide polymorphism (SNP), 2 codons with substitution in 2 nucleotides and 2 codons with substitution in the all 3 positions. The polymorphisms found in amino acids 417, 419 and 503 have been described and have been shown to be part of epitopes that may alter the antigenicity of DBP. These results demonstrate that similar polymorphic *vivax* alleles are widely distributed in different Brazilian areas and such variants should be part of the composition of a vaccine targeting the DBP protein to increase its efficacy, even in areas of the Atlantic Forest.

Key-words: Malaria. *Plasmodium vivax*. Duffy binding protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da malária no mundo	4
Figura 2: Distribuição da malária no Brasil.....	5
Figura 3:Ciclo biológico do Plasmodium vivax	7
Figura 4: Localização da DBP no merozoíto.....	10
Figura 5: Representação estrutural de DBP de P. vivax.....	10
Figura 6: Gel de Agarose representativo da amplificação do fragmento de 675pb referente à região II do gene DBP de P. vivax	17
Figura 7:Distribuição geográfica e número das amostras brasileiras coletadas	18
Figura 8: Frequência das mutações na MAF e na AL	21
Figura 9: Distribuição das mutações nas localidades da MAF e da AL	23
Figura 10: Frequência dos haplótipos de acordo com o número de amostras	27
Figura 11: Número de haplótipos da DBP por ano.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados na PCR de DBP-II descrito por SOUSA et al. (2010).	14
Tabela 2: Mistura dos reagentes e condições de ciclagem térmica da PCR de DBP-II descrito por SOUSA et al. (2010).	14
Tabela 3: Aminoácidos selvagens e mutados, de acordo com a localização no gene da DBP... ..	20
Tabela 4: Haplótipos presentes em 2 ou mais amostras de acordo com os perfis do gene DBP	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ASPECTOS GERAIS	1
1.2	CONTEXTO HISTÓRICO.....	1
1.3	EPIDEMIOLOGIA	3
1.4	CICLO BIOLÓGICO	6
1.5	<i>PLASMODIUM VIVAX</i>	7
1.6	VACINA.....	8
1.7	PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DUFFY (<i>DUFFY BINDING PROTEIN- DBP</i>)..	9
2	OBJETIVOS	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1	AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS	13
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA.....	13
3.3	PCR PARA O GENE DBP-II.....	14
3.4	REVELAÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR CONVENCIONAL	15
3.5	PURIFICAÇÃO DE DNA.....	15
3.6	SEQUENCIAMENTO.....	15
3.7	ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO GENE DBP	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A malária humana é uma doença infecciosa causada por protozoário do gênero *Plasmodium*, que por sua vez é transmitido ao homem por picada de fêmea infectada e infectiva do mosquito do gênero *Anopheles*. São 7 as espécies de plasmódio causadoras da infecção no homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. simium* e, mais recentemente descrito, *P. cynomolgi* (SINGH *et al.*, 2004; COX-SINGH *et al.*, 2008; SABBATANI *et al.*, 2010; TA *et al.*, 2014; BRASIL *et al.*, 2017).

A malária tem como principal característica a tríade de sintomas intermitentes composta por febre, sudorese e calafrio que podem variar a periodicidade, de acordo com a espécie plasmodial, podendo acontecer a cada 3 ou 4 dias, e ocorre no momento que o parasito lisa os eritrócitos. A tríade malárica pode ser acompanhada por sintomas inespecíficos como dores de cabeça, dores no corpo, anemia, icterícia e inchaço (MUTIS *et al.*, 2005; OMS, 2016).

1.2 CONTEXTO HISTÓRICO

A malária tem sua origem provável no continente africano, reconhecido como “berço da humanidade”, expandindo-se para a Europa e a Ásia. Os sintomas característicos da malária foram já eram descritos em 2700 a.C no manuscrito chinês *Nei Ching* e em papiros egípcios, os quais associavam os episódios febris intermitentes aos períodos após as cheias do rio Nilo. Tabuletas com escrita cuneiforme da Mesopotâmia também mencionam febres periódicas mortais, sugestiva de malária. Muitos textos antigos religiosos associavam febres sazonais a punição divina, no entanto, Hipócrates, na Grécia no século V, descartou tal superstição relacionando a doença com a sazonalidade e com locais frequentados pelos doentes. Também foi Hipócrates que descreveu detalhadamente o quadro clínico da malária e suas complicações (FRANCA *et al.*, 2008).

O termo italiano *mal'aria* que significa “ar ruim” ou no latim “*palus*” (pântano), que originou as palavras palustre e paludismo, foram adotados no século XIV para denominar a doença, mesmo sem se saber a respeito de sua transmissão (AMARAL, 2015).

No século XVI, a malária chega ao Novo Mundo através dos colonizadores espanhóis e portugueses. No século XVII, jesuítas na América do Sul observaram que indígenas utilizavam cascas de árvores, que deram o nome de Chinchona (1735), para o tratamento de doenças febris.

Logo levaram para Europa, onde se espalhou o uso do “pó dos jesuítas”. Mais tarde, somente em 1820, é que foi isolado o princípio ativo chamado de quinino (BIGGS & BROWN, 2001).

Em 1880, Charles Alphonse Laveran, médico francês, observou parasitas da malária no interior dos glóbulos vermelhos humanos; seguido por ele, em 1894, Patrick Manson, um médico escocês, sugeriu que parte do ciclo biológico do parasito dependia de um transmissor invertebrado, e em 1897, o médico britânico, Ronald Ross, trabalhando na Índia, elucidou o modo de transmissão ao observar parasitos no interior de um mosquito que havia se alimentado do sangue de um indivíduo portador da doença. No entanto, o complexo ciclo foi totalmente descrito no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe e Bastianelli e Battista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 (FRANCA et al., 2008).

No início do século XX, as pesquisas eram direcionadas a eliminar o vetor, principalmente o *Anopheles gambiae*, mosquito de origem africana, que levava a doença para diversos lugares no globo. Por outro lado, pesquisadores da Bayer, indústria farmacêutica que se tornou líder no mercado, desenvolveram antimaláricos sintéticos: a pamaquina (1924), eficaz no tratamento de malária por *P.vivax* e mepacrina (1930) utilizada no tratamento de malária por *P.falciparum*. Já em 1934, o químico alemão Hans Andersag patenteou a molécula que foi muito utilizada durante a II Guerra Mundial e ficou conhecida como cloroquina. Em 1939, Paul Muller desenvolveu o composto dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um inseticida de grande potência, grande atividade residual e baixo custo, na tentativa de combater o vetor (MANZALI DE SÁ, 2011; D’AMATO, 2002). A utilização do DDT foi fundamental para a redução dos casos de malária em todo o mundo, incluindo no Brasil, e por isso até os dias atuais o controle vetorial constitui uma das principais estratégias de controle da malária (OXBOROUGH, 2016; SOUGOUFAR, 2017).

No Brasil, a malária é registrada desde 1587, possivelmente introduzida por colonizadores e por escravos vindos da África. Ao longo dos anos, a situação se agravou progressivamente e, no final do século XIX todo o país era assolado pela endemia (CAMARGO, 2003). Somente após a Segunda Guerra Mundial, com o aparecimento do DDT e da cloroquina foi possível controlar sua transmissão nos anos 80. No entanto, a migração interna, relacionada aos projetos agropecuários, à construção de rodovias e hidrelétricas e às atividades de garimpo e mineração desenvolvidas na região amazônica reintroduziram a doença no Norte do país. A região da Amazônia Legal, que compreende nove estados e abrange 60%

do território nacional, continua endêmica até os dias atuais (COURA, 2005; SAWYER, 1993; VIGILÂNCIA, 2013).

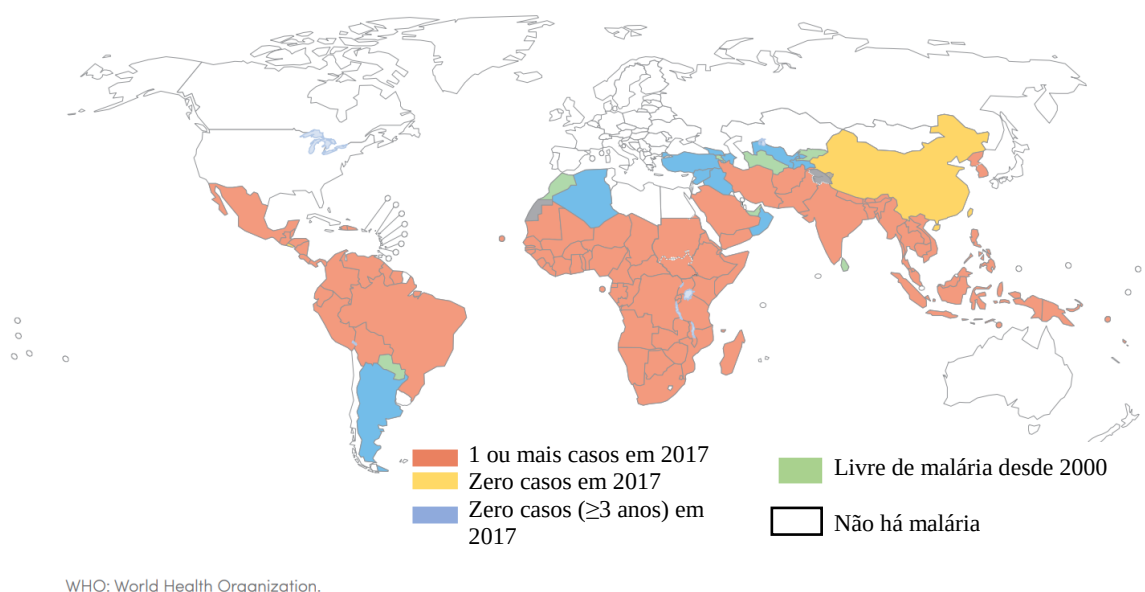
1.3 EPIDEMIOLOGIA

Atualmente, a malária é considerada um problema de saúde pública, prevalente nas zonas tropical e subtropical do globo, como demonstrado na Figura 1. Quase metade da população mundial corre o risco de contrair malária. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), cerca de 91 países apresentam transmissão contínua da doença. A região mais assolada pela endemia é o continente africano responsável por 92% dos casos e 93% das mortes, o *P. falciparum* é o mais prevalente na região representando 99,7% dos casos estimados de malária em 2017. Enquanto que, o *P. vivax* é predominante nas Américas, representando 74,1% dos casos de malária (WHO, 2018).

O último relatório global divulgado pela OMS sobre a malária, publicado em novembro de 2018, divulgou que em 2017 foram registrados 219 milhões de casos, e estimado que as mortes por malária chegaram a 435 mil. Crianças menores de 5 anos são um grupo altamente vulnerável a doença; representando 61% das mortes por malária ao redor do mundo e vale lembrar que a cada 2 minutos morre uma criança de malária (WHO, 2018).

Todas as regiões do mundo, exceto a região das Américas, registraram reduções na mortalidade em 2017 em comparação com 2010. O fato da América do Sul não ter reduzido o número de mortes por malária deve-se, em parte, pelo fato de nos últimos anos aumentarem o número de casos de *P. vivax* associados a doença grave na região (LACERDA, 2012) e por essa espécie responder mais lentamente as estratégias de controle quando comparada ao *P. falciparum*. Apesar destes ganhos, a redução na taxa de mortalidade por malária diminuiu desde 2015, refletindo as tendências de aumento na incidência dos casos. Há desafios que ainda impedem os países de permanecer no caminho e avançar para a eliminação, que incluem a falta de financiamento governamental, os riscos impostos pelo conflito em zonas endêmicas, a resistência do parasita a antimaláricos e resistência do mosquito a inseticidas. Espera-se que a comunidade global de saúde aumente o financiamento de programas de combate à malária assim como o investimento na pesquisa e no desenvolvimento de novas ferramentas que possam de fato erradicar a malária (WHO, 2018).

Figura 1: Distribuição da malária no mundo



Países com zero casos pelo menos nos últimos 3 anos consecutivos são considerados como livres de malária. Todos os países da Região Europeia registraram zero casos nativos em 2016 e novamente em 2017. Em 2017, China e El Salvador também relataram zero casos.

Fonte: MALÁRIA REPORT (2018)

Nas Américas, mais de 93% dos casos de malária estão concentrados em seis países: Colômbia, Guiana, Haíti, Peru, Venezuela e Brasil (PAHO, 2017).

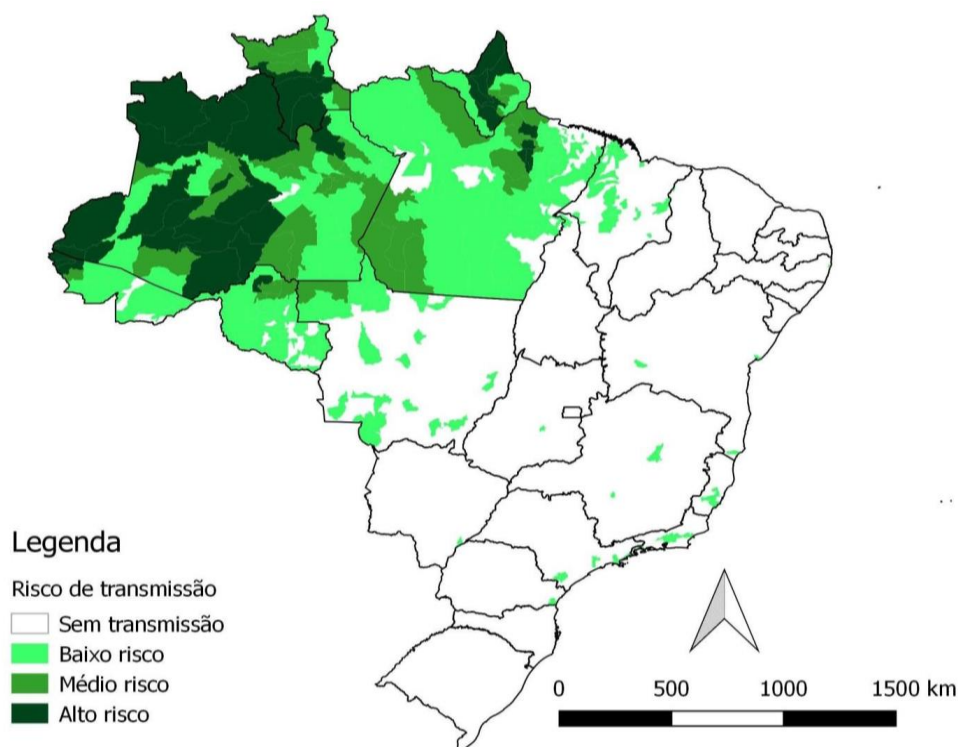
A situação epidemiológica em 2018 no Brasil, de acordo com o relatório do Ministério da Saúde, apontou a ocorrência de 194.513 casos. Até março de 2019 foram contabilizados 31.872 casos havendo uma redução de 38% em relação ao mesmo período no ano anterior (OMS, 2018; PORTAL MS, 2019). No país 89% dos casos são ocasionados por *P. vivax* e 11% por *P. falciparum* (WHO, 2018)

É importante salientar que devido aos problemas políticos, sociais e econômicos muitos cidadãos da Venezuela, migraram para outros países, inclusive o Brasil, a partir de 2016, o que parece ter ocasionado um aumento nos números de casos de malária (ESPINOZA, 2019).

Como é possível visualizar na Figura 2, 99% dos casos de malária no Brasil estão concentrados na Amazônia Legal, que é constituída por 9 estados da bacia amazônica, são eles os estados de Amazonas, Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Tocantins e parte do Maranhão, juntos correspondem a 60% do território nacional e possuem 13% da população nacional (IBGE, 2010). Mas, como dito, os casos não se restringem a Amazônia Legal; a Região Extra-Amazônica, principalmente a área de Mata Atlântica, possui casos

autóctones de malária tornando necessária estratégias de controle para evitar a disseminação dos casos e mesmo a reintrodução da malária em locais onde a doença está controlada (PORTAL MS, 2018).

Figura 2: Distribuição da malária no Brasil



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017)

No Brasil, o principal vetor transmissor da doença é o *Anopheles darlingi*, no entanto os casos de malária na Mata Atlântica são transmitidos pelo *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, espécie que ovipõe na bromélia, daí o nome Kerteszia.

As estratégias de controle da malária visam o vetor e o rápido diagnóstico e tratamento com drogas antimaláricas. Como parte das ações de controle vetorial, adotou-se o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, assim como a borrifação intradomiciliar com inseticidas. O pronto diagnóstico é realizado por microscopistas experientes para identificação da espécie plasmodial, já que cada espécie possui um tratamento específico (MARTINS CAMPOS et al., 2012; VITOR-SILVA et al., 2016).

1.4 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* é dividido em dois hospedeiros, um vertebrado, neste caso o homem, e um invertebrado, o mosquito anofelino. Como visualizado na FIGURA 3, a infecção se inicia quando a fêmea infectada e infectante do mosquito realiza o repasto sanguíneo, inoculando na derme do hospedeiro os esporozoítos, que migram através do sistema linfático até chegarem ao fígado dando início a fase hepática da doença, chamada fase pré-eritrocítica. Ao penetrar nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em merozoítos e se multiplicam assexuadamente formando esquizontes. Os merozoítos são liberados na luz dos sinusóides hepáticos em vacúolos chamados merossomos, que ao romperem liberam os merozoítos que invadem hemácias, dando início a fase eritrocítica, que é a fase sintomática da doença. Cada espécie plasmodial possui preferências por estágios de maturação dos eritrócitos. O *P. vivax*, espécie responsável pelo maior número de casos no Brasil, possui preferência por hemácias jovens – os reticulócitos – dificultando dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas *in vitro* que necessitem da manutenção do cultivo *in vitro* (NOULIN, 2013), enquanto que o *P. falciparum*, considerado o mais patogênico, invade hemácias em todas as fases de desenvolvimento da célula.

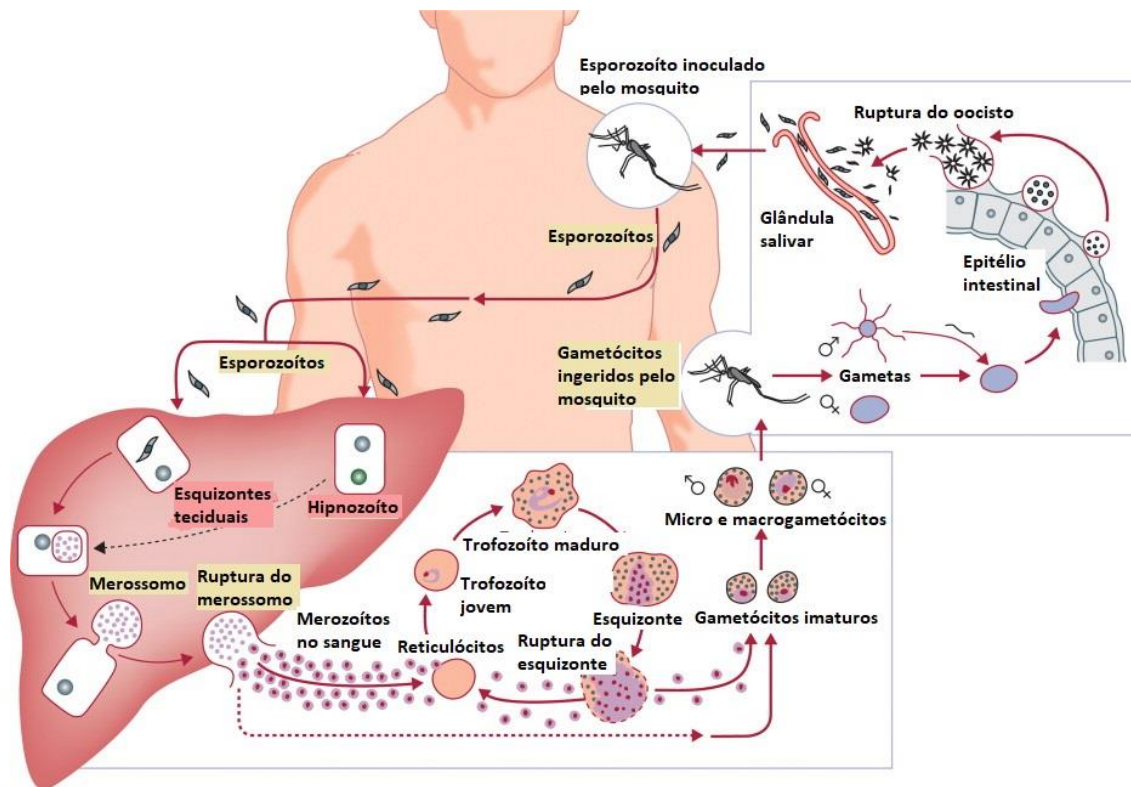
É importante salientar que no ciclo biológico do *P. vivax* e *P. ovale*, alguns dos esporozoítos que invadem os hepatócitos permanecem numa forma latente que pode durar por vários dias, meses ou até mesmo anos, chamados de hipnozoítos. Os hipnozoítos são responsáveis por recaídas da doença (VAUGHAN et al., 2008).

Uma vez na hemácia, o parasito se transforma em trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e, por fim, em esquizonte. Com o rompimento celular são liberados merozoítos que invadem novos reticulócitos dando continuidade ao ciclo eritrocítico. Nesse momento, ocorre o aparecimento de sintomas da doença. Os parasitos ainda se diferenciam, por mecanismos ainda não elucidados, em gametócitos, que são suas formas sexuais - microgametócito (masculino) e macrogametócito feminino - responsáveis pela continuação do ciclo no mosquito (COWMAN AND CRABB, 2006).

Ao serem ingeridos pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, os gametócitos chegam à cavidade abdominal do mosquito e se fundem formando o zigoto, que se modifica em oocineto, forma móvel que atravessa o epitélio intestinal do mosquito, transformando-se em oocisto que se rompe liberando milhares de novos esporozoítos. Essa forma alongada e móvel migra para as glândulas salivares do mosquito, e dessa forma, ao realizar o repasto sanguíneo,

os mosquitos inoculam estes esporozoítos assegurando a manutenção do ciclo parasitário (Figura 3). (MUELLER *et al.*, 2009).

Figura 3: Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*



Fonte: Adaptado de MUELLER *et al.*, 2009.

1.5 PLASMODIUM VIVAX

O *P. vivax* é a espécie plasmodial causadora da malária mais amplamente distribuída no mundo, fora do continente africano. Durante muito tempo, a malária causada pelo *P. vivax* foi considerada uma doença benigna, porém esse conceito vem mudando nos últimos anos devido ao aumento de complicações clínicas e à morbidade causada pela malária vivax, bem como, indícios de resistência à fármacos (PRICE *et al.*, 2009). Esses dados reforçaram a urgência de incluir a doença no plano de ações estratégicas global da OMS para o seu controle e eliminação (WHO, 2015). Esforços para conter o *P. vivax* são limitados por uma compreensão limitada da biologia básica do parasito, em parte devido à incapacidade de manter esta espécie em cultivo contínuo, explicado pela sua preferência por invadir reticulócitos (hemácias jovens) (BERMÚDEZ *et al.*, 2018). Adicionando ainda mais complexidade, a biologia do *P. vivax* traz

particularidades que prejudicam seu controle, como as recaídas ocasionadas pelos hipnozoítos (forma latente do parasito no fígado) e a produção precoce de gametócitos, diferente das outras espécies, facilitando a transmissão da doença até mesmo antes do aparecimento dos sintomas (PRICE *et al.*, 2009; BATTLE *et al.*, 2014).

Interromper a transmissão de *P. vivax* pode exigir o desenvolvimento de uma vacina eficaz e sistemas de vigilância melhorados, devido à alta proporção de infecções submicroscópicas, uma vez que a quantidade de reticulócitos circulantes num organismo saudável varia de 0,5 a 1,8% de glóbulos vermelhos (LONGLEY *et al.*, 2017). Além disso, sabe-se que o *P. vivax* possui alta diversidade genética, quase duas vezes mais que o *P. falciparum*, e que essa variação pode ser um obstáculo na eficácia de uma vacina (NEAFSEY *et al.*, 2012). Estudos genéticos fornecem uma abordagem alternativa para obter nova compreensão sobre o parasito, a partir dos quais ferramentas epidemiológicas e abordagens terapêuticas podem ser desenvolvidas para aplicação clínica (AUBURN *et al.*, 2016).

1.6 VACINA

O desenvolvimento de vacina é considerado uma das mais promissoras estratégias para o controle da malária. Durante décadas, o investimento em estudos para o desenvolvimento de vacinas se concentrou na espécie causadora da malária mais virulenta, *P. falciparum*. No entanto, na última década o progresso no controle da malária com o objetivo de alcançar a sua erradicação, torna reconhecida a necessidade de uma vacina também para a espécie *P. vivax* (GREENWOOD *et al.*, 2009).

Na atualidade já existem estudos em andamento de candidatos vacinais de *P. vivax*, mas pela sua grande diversidade genômica, pouco se sabe dessa distribuição genética geoespacial, o que pode se tornar um desafio no que se refere a resistência do parasito a vacina. Em *P. vivax*, o estágio eritrocítico tem uma grande importância, pois a invasão nos reticulócitos requer a interação entre os ligantes da proteína nos merozoítos e seu receptor nos reticulócitos. Portanto, vacinas que impeçam a interação entre o ligante e o seu receptor, produzindo anticorpos contra este, poderiam bloquear a invasão do parasito nos reticulócitos, interrompendo dessa forma a transmissão da doença (GRUPTA *et al.*, 2018). Dentre os antígenos que estão sendo estudados, na fase eritrocítica foi identificado a proteína de ligação Duffy (DBP, do inglês *Duffy binding protein*) (ARÉVALO-HERRERA, 2010; PAROBK, 2014).

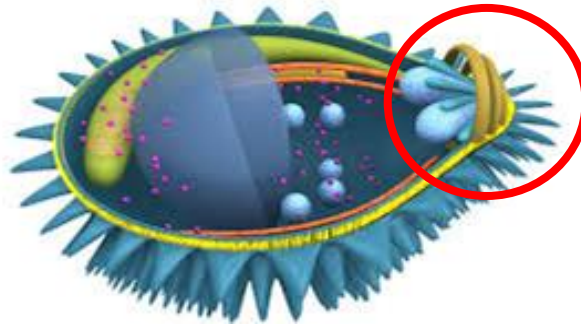
1.7 PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DUFFY (*DUFFY BINDING PROTEIN*- DBP)

Os merozoítos de *P. vivax* são dependentes de uma interação entre a proteína de ligação Duffy (DBP) que está localizada nos micronemas, região apical do parasito (Figura 4) e o seu receptor, o antígeno *Duffy* / receptor para quimiocinas (DARC- *Duffy antigen receptor for chemokines*) expressos na superfície de reticulócitos. A glicoproteína transmembranar DARC é expressa em células vermelhas de indivíduos que possuem o grupo sanguíneo Duffy que atua reduzindo os níveis de quimiocinas tóxicas presentes no organismo em determinadas condições patológicas (NTUMNGIA *et al.*, 2016). Notavelmente, indivíduos Duffy negativos são resistentes a doença causada por *P. vivax*, como observado na África subsaariana onde 90% da população é *Duffy* negativa, o que justifica a doença não ser endêmica na região (HOSTETLER *et al.*, 2016). Ainda que nos últimos anos tenham sido relatados infecções por *P. vivax* em indivíduos *Duffy* negativos, até a presente data, este evento é raro e, a completa invasão do parasito nesses eritrócitos permanece desconhecida. Estudos desenvolvidos com isolados de *P.vivax* coletados desses indivíduos *Duffy* negativos evidenciaram a duplicação do gene DBP, indicando que, provavelmente a nova via de invasão a eritrócitos ainda pode envolver a proteína DBP (SOUZA, 2014). Sendo assim, a DBP é um promissor alvo vacinal em *P. vivax* (CHEN, 2015).

A DBP possui um peso molecular de aproximadamente 140 KiloDaltons (kDa) e 330 aminoácidos, o domínio de ligação ao DARC encontra-se na região II (Figura 5), rica em cisteínas e possui, um sítio de ligação de 170 aminoácidos entre as cisteínas 4 e 7. A entrada do parasito nas hemácias é um processo rápido que leva em média 30 segundos após o contato primário do merozoítos. Este processo de invasão de reconhecimento e adesão na célula hospedeira, com reorientação ligando a extremidade apical do merozoíto à membrana do reticulócito (DBP-DARC), é uma interação irreversível e finaliza com a penetração ativa na célula hospedeira (HANS *et al.*, 2005; CHITNIS & MILLER,1994).

A ocorrência natural de alguns polimorfismos que flanqueiam a região funcional em DBP-II sugere que os anticorpos protetores que visam as regiões funcionais em DBP-II conduzam a perturbação da dimerização com consequente prevenção da ligação ao receptor (BATCHELOR *et al.*, 2011).

Figura 4: Localização da DBP no merozoíto



Destaque na localização dos micronemas do merozoíto no qual se encontra a DBP.

Fonte: Adaptado de Qiagen.com

Figura 5: Representação estrutural de DBP de *P. vivax*



Éxons: representados como blocos; I a VI: região de domínio extracelular; região VII consiste nos domínios transmembrana (TM) e citoplasmático (C). A proteína possui um domínio N-terminal rico em cisteína, a região II e a região VI. O sítio de reconhecimento do receptor está localizado entre as cisteínas 5 (C5) e 7 (C7); sendo a região mais polimórfica da proteína.

Fonte: Adaptado de CERÁVOLO (2007).

A atenção nos estudos da DBP tem se concentrado em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que são comuns e parecem resultar em respostas imunes específicas. Os SNPs ocorrem quando um nucleotídeo dentro do códon é substituído por outro, podendo ser uma mutação sinônima, quando o aminoácido traduzido é o mesmo do inicial, ou não-sinônima quando o aminoácido traduzido é diferente do gene selvagem e como consequência a estrutura da proteína pode ser modificada, facilitando o escape do parasita do sistema imune do hospedeiro (NÓBREGA *et al.*, 2011).

Neste cenário, os estudos de perfis gênicos da DBP são importantes no que diz respeito a mudança populacional do parasito, sua origem geográfica ou até mesmo no desenvolvimento de antígenos vacinais eficazes (PAROBK *et al.*, 2014).

Até a presente data não há publicações que contemplem estudos de diversidade do gene DBP na Mata Atlântica Fluminense, onde o risco de reintrodução da malária é real. Portanto, no presente estudo iremos investigar os polimorfismos em DBP-II e comparar os resultados com os já descritos no Brasil e em outros países.

2 OBJETIVOS

Geral:

Investigar polimorfismos no gene DBP de parasitos de *P. vivax*, oriundos da Amazônia Legal (AL), da Mata Atlântica Fluminense (MAF) e de países não brasileiros.

Específicos:

- Analisar os SNPs no gene DBP comparando a distribuição e frequência dos polimorfismos entre as regiões estudadas
- Comparar e discutir os resultados obtidos com os descritos na literatura em áreas da Amazônia brasileira e de outros países endêmicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS

O Brasil é um país de proporções continentais e possui 3 perfis de transmissão da malária: a primeira e mais importante responsável pela maioria dos casos, ocorre na AL; a segunda envolve os casos importados de malária, que corresponde às infecções que são adquiridas em local diferente daquele onde o diagnóstico é feito, como os casos importados da AL ou de outros países e; o terceiro tipo de transmissão representa 0,03% dos casos e é causado por malária autóctone na Mata Atlântica (MA).

No presente estudo, investigaremos os polimorfismos do gene da DBP, nesses 3 perfis de malária detectados no país, contribuindo para a caracterização da diversidade gênica do alvo entre as diferentes regiões.

Foram testadas 238 amostras de *P. vivax* coletadas em Tucuruí, Pará (45) e 193 de pacientes que recorreram ao INI (Instituto Nacional de Infectologia) – FIOCRUZ/RJ com suspeita de malária. As amostras foram coletadas de janeiro de 2011 a março de 2018. O procedimento padrão da avaliação diagnóstica compreendeu a confecção de lâmina de gota espessa para a confirmação do diagnóstico parasitológico de *P.vivax* e/ou o diagnóstico molecular. Em seguida, uma amostra de sangue foi coletada por punção venosa em tubo *Vacutainer*[®] (Becton, Dickinson & Company, NJ, EUA) contendo EDTA para realização do exame molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). As amostras de sangue foram estocadas no Laboratório de Pesquisas em Malária do IOC/Fiocruz, para o processamento.

O protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/ Fiocruz sob o número CEP 053515/2014.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA a partir do volume de 1mL de sangue foi realizada pela técnica de colunas (método de centrifugação), utilizando-se o *QIAamp*[®] *DNA blood midi kit* (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 200µL de água livre de nuclease, fornecida pelo kit.

3.3 PCR PARA O GENE DBP-II

O DBP-II corresponde aos nucleotídeos 870 a 1.545 (aminoácidos de 290 a 515, sequência de referência: Salvador I), essa região apresenta diversos haplótipos de acordo com distintas áreas geográficas, portanto amplificamos parte desse gene para determinar as suas variantes e correlacionar seus polimorfismos e seu caráter antigênico em diferentes regiões brasileiras. O protocolo foi adaptado a partir do descrito por Sousa e colaboradores (2010), os oligonucleotídeos iniciadores mantiveram-se como os previamente descritos (Tabela 1), enquanto que as condições térmicas foram otimizadas, conforme descrito na Tabela 2. A reação foi preparada utilizando o máster mix 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix (Solis Biodyne, Hanôver, Alemanha) como fonte de enzima HOT FIREPol® DNA polimerase, de 1 mM desoxinucleotídeos trifosfatados (dNtp), 12.5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão (solução salina) e corantes para aumentar a densidade da amostra durante a eletroforese em gel de agarose. Além desse reagente foi acrescentado 10pmol/μL de cada oligonucleotídeo iniciador; água livre de nuclease Gibco (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 2 μL de DNA, num mix contendo 20 μL de volume final. O produto da PCR foi de 675 pares de bases (pb).

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados na PCR de DBP-II descrito por SOUSA *et al.* (2010).

Identificação do primer	Sequência (5' – 3')
DBPS-F1	ATGTATGAAGGAAGTTACGAAT
DBPS-R1	ACCTGCCGTCTGAACCTTTT

Tabela 2: Mistura dos reagentes e condições de ciclagem térmica da PCR de DBP-II descrito por SOUSA *et al.* (2010).

Reagentes				Concentração	
5x HOT FIREPol® Blend				1x	
Primer F				10 pmol	
Primer R				10 pmol	
DNA				2 µL	
Ciclagem térmica					
Hold 1	30 Ciclos			Hold final	
95 °C °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
12’	30’’	45’’	1’	7’	∞

' : indicação de minutos; '' : indicação de segundos.

3.4 REVELAÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR CONVENCIONAL

Os amplicons (produto da PCR) foram aplicados em gel de agarose a 2% (LGC Biotecnologia) corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL (Invitrogen), para análise por eletroforese em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04M e EDTA 0,001M –Thermo Fisher Scientific), numa voltagem constante de 100 V durante aproximadamente 90 minutos. Utilizamos 5 µL de amostra, 1 µL do tampão 6X *Loading Dye*[®] (10mM Tris- HCl – pH 7.6, 0,03% azul de bromofenol, 0,005% de xileno cianol e 10% de glicerol - Thermo Fisher Scientific) e padrão de peso molecular de 50 pb (0,5µL/mL – Thermo Fisher Scientific) para estimar o tamanho do produto de amplificação. A visualização e registros das bandas foram feitas no foto-documentador *Multidoc-It digital Imaging System*[®] (UVP).

3.5 PURIFICAÇÃO DE DNA

Os amplicons obtidos nas reações de PCR foram purificados com o *kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), segundo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi eluído em 15µL de água livre de nuclease, fornecida pelo kit.

3.6 SEQUENCIAMENTO

A reação de sequenciamento foi preparada em placa de 96 poços (Applied Biosystems), com 1 µL de cada primer – senso e antissenso, aplicados separadamente em cada poço na concentração de 3,2 pmol/µL –, 5 µL de amostra purificada e 1,5 µL de água comercial *UltraPure[™] DNase/RNase-Free Distilled Water* (Invitrogen), 1µL de *sequencing buffer (5X)* e 1,5 µL de *BigDye[®]*, totalizando 10µL por poço, de acordo com o protocolo recomendado pelo *kit BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction version 3.1* (Applied Biosystems). As sequências foram obtidas no equipamento *ABI PRISM DNA Analyzer[®] 3730* (Applied Biosystems) da plataforma genômica PDTIS/Fiocruz.

3.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO GENE DBP

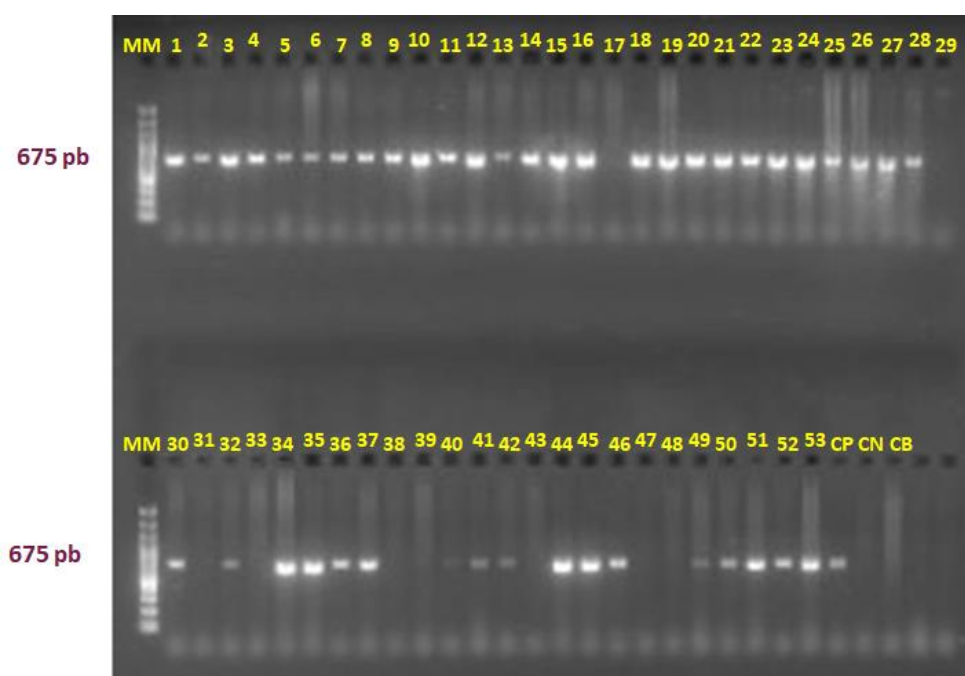
As análises dos polimorfismos foram realizadas no software *NovoSNP*[®] (WECKX, S. *et al.*, 2005); *Bioedit*[®] (HALL, 1999).

A cepa Salvador I (número de acesso: PVX_110810 plasmodb.org) foi utilizada como referência na análise dos polimorfismos do fragmento do gene que codifica a região da DBP-II nos isolados investigados. Esta cepa é mundialmente utilizada em estudos de análise molecular do *P. vivax* por ser o primeiro isolado do parasito a ter seu genoma completamente sequenciado por CARLTON *et al.* (2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 238 amostras, 228 amplificaram e 10 não amplificaram e, consequentemente, foram excluídas do estudo (Figura 6). As 228 amostras que geraram produtos de amplificação foram analisadas de acordo com a localidade de infecção e o ano de coleta. Nesse contexto, 79 amostras eram provenientes de localidades da Mata Atlântica Fluminense (MAF), 137 da Amazônia Legal (AL) distribuídas nos estados do Pará (50), Amazonas (48), Acre (11), Roraima (3), Rondônia (17) e Amapá (8). A distribuição do número de amostras em função das localidades de MAF e da AL está descrita na Figura 7. Também foram incluídas nessas 228 amostras, 12 amostras não brasileiras sendo 5 da África, 6 da América do Sul (1 da Colômbia, 1 da Guiana Francesa, 1 do Peru, 1 do Suriname e 2 da Venezuela) e 1 da América Central (Haiti). As amostras investigadas foram coletadas de janeiro de 2011 a março de 2018; entre elas 45 foram coletadas em Posto de Saúde de Tucuruí, município do Estado do Pará em 2011 e as demais foram coletadas de pacientes que recorreram ao INI / LPM – CPDMal, Fiocruz RJ, para diagnóstico.

Figura 6: Gel de Agarose representativo da amplificação do fragmento de 675pb referente à região II do gene DBP de *P. vivax*



MM: Marcador Molecular; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; CB: Controle Branco; As amostras: 1 a 16, 18 a 28, 30, 32, 34 a 37, 40 a 42, 44 a 46, 49 a 53 amplificaram conforme o esperado; as amostras: 17, 29, 31, 33, 38, 39, 43, 47 e 48 não amplificaram.

Figura 7: Distribuição geográfica e número das amostras brasileiras coletadas



Número de amostras que foram amplificadas, de acordo com o Estado de origem.

Por ocasião da análise das sequências através do Clustal W no programa BioEdit foram removidas as lacunas inseridas para permitir o alinhamento e consequente detecção dos SNPs.

Assim, verificamos que o perfil selvagem - sequência idêntica a cepa Sal-I, (NRILKNRDEKRSTKNILWQQI) - foi encontrado em apenas 5% (11) das amostras analisadas: 1 das 79 da MAF do ano de 2011 (1%) e 10 das 137 (7%) da AL sendo 4 do Amazonas (1 de 2011, 2 de 2013 e 1 de 2017), 3 do Pará (2011), 2 do Amapá (2014 e 2015) e 1 de Rondônia (2012). Todas as amostras não brasileiras apresentaram algum tipo de mutação. Esses dados sugerem que parasitas do tipo selvagem representam a grande minoria das populações de *P.vivax* circulando no Brasil e que tais populações não foram encontradas em amostras da África, América Central e de outros países da América do Sul fronteiriços ao Brasil.

A análise do produto amplificado da DBP-II em comparação com a cepa de referência Sal I revelou 27 polimorfismos, 1 sinônimo no códon 378, (que permaneceu arginina – R) e 26

não sinônimos, distribuídos em 21 códons, sendo 17 polimorfismos com troca em um único nucleotídeo (SNP), 2 polimorfismos com troca nos códons 371 e 385 e 3 polimorfismos com troca nos códons 386 e 419 (Tabela 3). Embora esses códons apresentem mutação em mais de 1 nucleotídeo, o acúmulo de sítios polimórficos não foi detectado simultaneamente nas amostras analisadas nos códons 371 (posições 1.111 e 1.113) e 419 (posições 1.255, 1.256 e 1.257), caracterizando a mutação por substituição como SNP. Já nos códons 385 e 386, os polimorfismos nos nucleotídeos podem aparecer sozinhos ou combinados. A diferença no perfil de mutações nesses códons modificou em função da região de infecção das amostras, as posições 1.113 no códon 371 e 1.255 e 1.256 no códon 419, bem como o acúmulo de mutação nas posições 1.153 e 1.154 no códon 385 e das posições 1.157 e 1.158 no códon 386 foram mutações específicas da MAF demonstrado nas Figuras 8 e 9. A combinação dos polimorfismos específicos nos 4 códons foi detectada em 11% (9) amostras da MAF. A detecção de qualquer um desses sítios polimórficos específicos parece indicar que a infecção é autóctone da região de MAF.

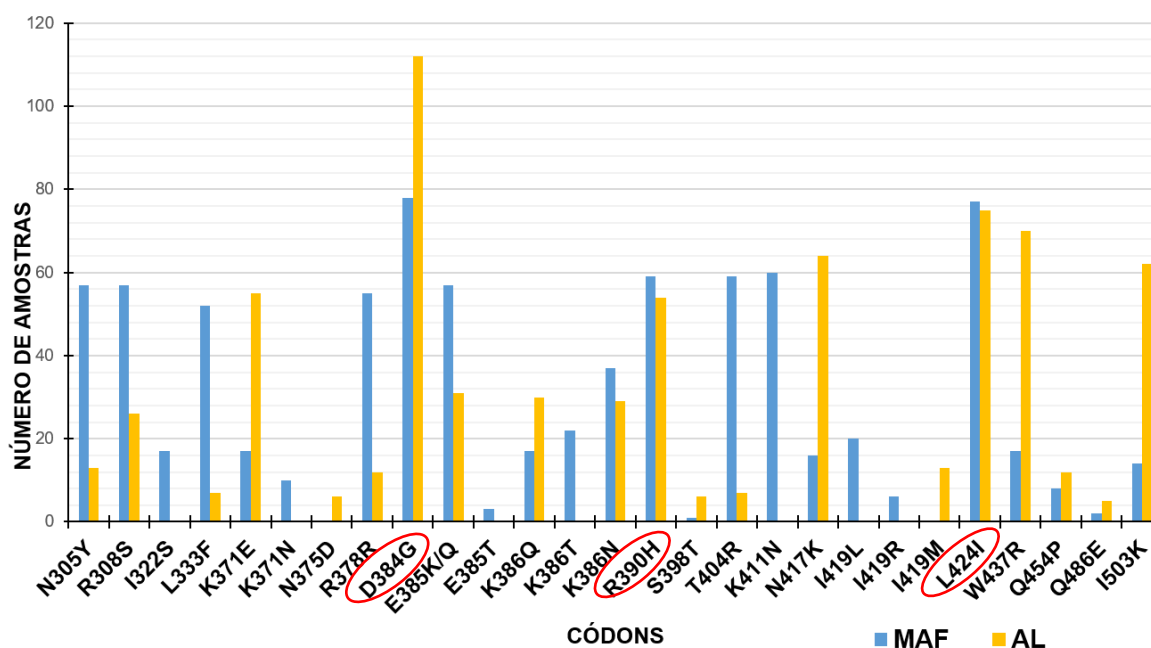
Tabela 3: Aminoácidos selvagens e mutados, de acordo com a localização no gene da DBP

Localização		AA SELVAGEM		AA MUTADO	
Nucleotídeo	Códon				
A913T	N305Y	AAT	Asparagina	TAT	Tirosina
G924T	R308S	AGG	Arginina	AGT	Serina
T966G	I322S	ATT	Isoleucina	AGT	Serina
C997T	L333F	CTT	Leucina	TTT	Fenilalanina
A1111G	K371E	AAA	Lisina	GAA	Ác. Glutâmico
A1113T	K371N	AAA	Lisina	AAT	Asparagina
A1123G	N375D	AAT	Asparagina	GAT	Ác. Aspártico
C1134T	R378R	CGC	Arginina	CGT	Arginina
A1151G	D384G	GAT	Ác. Aspártico	GGT	Glicina
G1153A/C	E385K/Q	GAA	Ác. Glutâmico	AAA/CAA	Lisina/Glutamina
G1153A/A1154C	E385T	GAA	Ác. Glutâmico	ACA	Treonina
A1156C	K386Q	AAG	Lisina	CAG	Glutamina
A1157C/G1158T	K386T	AAG	Lisina	ACT	Treonina
G1158T	K386N	AAG	Lisina	AAT	Asparagina
G1169A	R390H	CGT	Arginina	CAT	Histidina
T1192A	S398T	TCT	Serina	ACT	Treonina
C1211G	T404R	ACA	Treonina	AGA	Arginina
A1233C	K411N	AAA	Lisina	AAC	Asparagina
T1251A	N417K	AAT	Asparagina	AAA	Lisina
A1255C	I419L	ATA	Isoleucina	CTA	Leucina
T1256G	I419R	ATA	Isoleucina	AGA	Arginina
A1257G	I419M	ATA	Isoleucina	ATG	Metionina
T1270A	L424I	TTA	Leucina	ATA	Isoleucina
T1309C	W437R	TGG	Triptofano	CGG	Arginina
A1361C	Q454P	CAA	Glutamina	CCA	Prolina
C1456G	Q486E	CAA	Glutamina	GAA	Ác. Glutâmico
T1508A	I503K	ATA	Isoleucina	AAA	Lisina

AA: aminoácido; Selvagem: Considerando cepa Sal I como referência; A, T, C e G: Nucleotídeos; códons destacados em laranja: mutações em mais de uma posição no códon. Códons: 371 e 385 apresentaram mutação em 2 posições e os códons: 386 e 419 apresentaram mutação nas 3 posições; códons destacados em verde: associação de mutações no códon.

A frequência dos SNPs nas amostras brasileiras foi bastante variável, apenas 3 mutações foram constatadas em mais de 50% das amostras testadas. Dessa maneira, o SNP predominante foi o D384G que ocorreu em 191 (88%) dessas amostras, sendo 78 (99%) da MAF e 113 (82%) da AL e em, praticamente, todas as amostras não brasileiras (11 de 12), com exceção da única amostra da Colômbia. Seguiu-se a mutação L424I que foi encontrada em 152 (70%) dos isolados brasileiros - 77 (98%) da MAF e 75 (55%) da AL -, além de em 8 das 12 (67%) amostras não brasileiras oriundas da África, Haiti, Colômbia e Peru. A mutação no códon R390H foi a terceira mais frequente, tendo sido detectada em 113 (52%) das amostras do País - 59 (75%) na MAF e 54 (39%) na AL e em 5 (42%) amostras dos países da América do Sul (Suriname, Guiana Francesa, Peru e Venezuela); interessante-mente essa mutação não foi encontrada em nenhuma das 5 amostras da África (Figura 8).

Figura 8: Frequência das mutações na MAF e na AL



Em destaque os códons mais frequentes nas amostras brasileiras

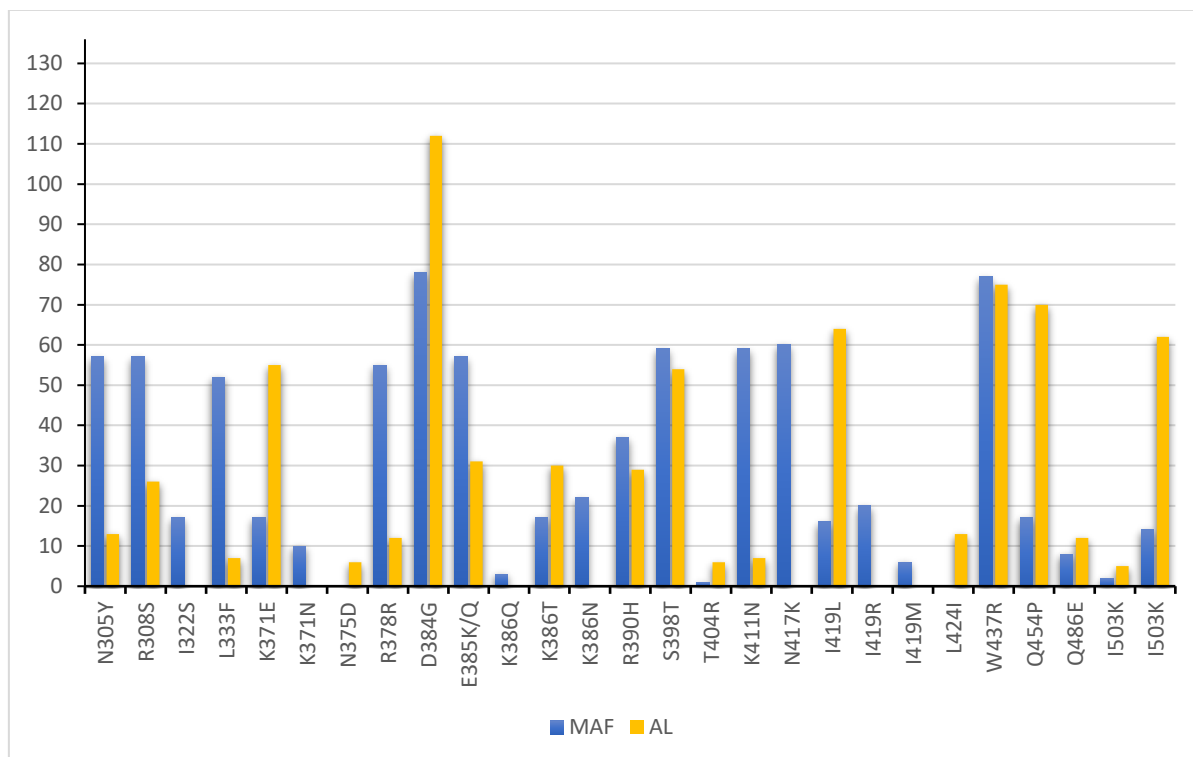
Os SNPs predominantes no nosso trabalho eram todos não sinônimos - D384**G**, R390**H** e L424**I** – e foram também os mais frequentes em estudos análogos desenvolvidos na Tailândia, Papua Nova Guiné e Colômbia (GOSI P. *et al.*, 2008; AUBURN *et al.*, 2016), mostrando que tal diversidade ocorre na Ásia, Oceania e América do Sul.

Os demais polimorfismos encontrados em todas as amostras investigadas, independente da procedência, compreenderam: N305Y (32%), R308S (38%), I322S (8%), L333F (27%), K371E/N (38%), N375D (3%), R378R (31%), E385K/Q/T (42%), K386Q/T/N (62,5%), S398T (3%), T404R (30%), K411N (28%), N417K (37%), I419L/R/M (18%), W437R (40%), Q454P (9%), Q486E (3%) e I503K (35%). Verificamos ainda que 1 códon foi dimórfico (K371E/N) e 3 códons trimórficos (E385K/Q/T, K386Q/T/N, I419L/R/M).

Essas substituições não-sinônimas que identificamos nos códons K371E, E385K, K386N, N417K, L424I, W347R e I503K também são comuns entre isolados globais de *P. vivax*, inclusive na Ásia, onde a transmissão da malária é substancialmente mais intensa (GOSI, P. *et al.*, 2008; CHOOTONG, *et al.*, 2014; HOQUE *et al.*, 2018). Contudo, 5 SNPs nunca descritos anteriormente - I322S, K371E/N, E385K/Q/T, K411N e I419L/R -, foram exclusivamente detectados na MAF (Figura 9). Portanto, esses códons poderiam funcionar como uma assinatura gênica para a identificação de malária da MAF; para confirmar esse dado é necessário aumentar o n amostral das amostras da AL.

Por outro lado, os SNPs nas posições 1123 (N375D) e 1257 (I419M), ambos já anteriormente descritos na Amazônia Legal, (DE SOUZA *et al.*, 2014), também ocorreram no nosso estudo exclusivamente na região (Figura 9), sugerindo a possibilidade de utilização desses polimorfismos como assinaturas gênicas de malária adquirida na Amazônia brasileira.

Figura 9: Distribuição das mutações nas localidades da MAF e da AL



A história demográfica pode explicar, pelo menos em parte, as diferenças observadas entre as populações de *P. vivax* da MAF e da AL no Brasil. Após tentativas de erradicação da malária nas Américas, na década de 1960, a extinção do *P. vivax* na região Extra-Amazônica e as expansões clonais subsequentes teriam resultado em populações pequenas e fragmentadas, principalmente endogâmicas nessas regiões, o que explica a estrutura genômica diferente entre as regiões endêmicas e não endêmicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, a alta diversidade de linhagens atuais de *P. vivax* circulantes nas Américas sugere diferentes formas de colonização sustentado pela presença de uma mistura de linhagens de parasitos originárias de regiões geograficamente diversas. Com efeito, a DBP-II pode ter polimorfismos específicos das diferentes regiões brasileiras (MAF e AL) influenciado por distintas colonizações, uma vez que a proteína é crucial na seleção das células para invasão dos parasitos e sua propagação.

Com relação a mutação no códon N417K, com a troca do aminoácido asparagina (N) para lisina (K), mudanças neste alelo já foram descritas como capazes de alterar a antigenicidade da DBP. Além do que, este polimorfismo também parece exercer um papel importante na invasão dos merozoítos nos eritrócitos, especialmente quando em consonância

com as mutações nos códons 437 e 503. Estudos de modelagem tridimensional da proteína homóloga a DBP em *P. knowlesi* mostraram que este resíduo 417 está localizado imediatamente adjacente ao motivo responsável pelo reconhecimento do receptor DARC nos reticulócitos, sugerindo que a sua mutação pode alterar tal reconhecimento (MCHENRY *et al.*, 2011). Em nosso estudo, esta mutação foi encontrada em 37% (80) das amostras brasileiras, 16 da MAF e 64 da AL, além de em 5 amostras da África, 1 do Haiti e 1 da Colômbia. Esse polimorfismo está mais frequentemente associado com outras 2 mutações, as nos códons W437R e I503K, em isolados de diversas regiões do mundo, como Tailândia (CHOOTONG, *et al.*, 2014), Papua Nova Guiné (MCHENRY *et al.*, 2011), Sudão (HOQUE *et al.*, 2018) e México (GONZÁLEZ-CERÓN *et al.*, 2015), entre outros. Em isolados brasileiros, estudos conduzidos por SOUSA *et al.* (2010 e 2014), mostraram que o códon N417K também possuem uma forte associação com outros alelos mutantes nas posições 417, 424 e 437, sugerindo um efeito funcional sinérgico desses aminoácidos, possivelmente constituindo um epítipo descontínuo ou conformacional no fragmento DBP-II, que é composto por posições peptídicas dispersas na sequência linear da proteína, mas com proximidade espacial quando essa é enovelada (SOUSA *et al.*, 2006).

Considerando esses achados, nós investigamos essas interações entre os polimorfismos com o códon N417K e a análise dos resultados mostrou que: a combinação dos 3 alelos (N417K, W437R e I503K) estava presente em 50% (40) das amostras, sendo 7 da MAF e 33 da AL, seguida pela detecção da combinação N417K, L424I e W437R em 44% (35) das amostras, sendo 9 amostras da MAF e 26 da AL; somente 1 amostra do Acre apresentou mutação em 2 das 3 posições investigadas (N417K e W437R). Curiosamente, ao analisar a presença da dupla mutação entre N417K e I503K e da mutação individual N417K, essa frequência caiu drasticamente para 1% (1) e 3% (3), respectivamente, nas amostras da AL.

A dispersão por diferentes regiões geográficas das combinações entre os códons 417, 424, 437 e 503, pode ser um efeito sinérgico da seleção natural positiva do parasito, bem como as demais mutações não-sinônimas (NS) encontradas no presente estudo e que são descritas em várias regiões do mundo. Essas mutações NS resultam na substituição de aminoácidos e podem alterar o epítipo de reconhecimento imune pelo anticorpo. Portanto, a geração de polimorfismos NS estáveis na região ligante da molécula pode promover a evasão do parasito a resposta imune do hospedeiro (SOUSA *et al.*, 2010).

Consequentemente, a natureza polimórfica do DBP-II representa um grande desafio para a eficácia de uma vacina contra diversos haplótipos de *P. vivax*. A compreensão da natureza dos polimorfismos gênicos na DBP em áreas geográficas distintas, assim como o seu

caráter antigênico são importantes para o desenvolvimento de uma vacina amplamente protetora contra a malária vivax (CHOOTONG *et al.*, 2014).

Considerando agora os haplótipos, foram observados 100 diferentes tipos, 96 desses em amostras brasileiras - 37 da MAF (10 exclusivos) e 63 da AL (12 exclusivos) - e 10 em amostras não brasileiras (4 exclusivos). A maior associação entre mutações ocorreu em 15 códons e gerou 3 diferentes haplótipos em 14% (11) amostras da MAF. Nomeamos os haplótipos que apareceram em mais de 1 amostra de Br01 a Br33 (Tabela 4). A variação de associação de mutações em um mesmo hapótipo foi de 2 (Br06) a 9 (Br07, Br14 e Br50) nos casos não brasileiros, os locais de menor índice foram Suriname (1) e Venezuela (1), enquanto que o de maior índice foi na África (3). Nas regiões brasileiras a associação de mutações variou de 1 (Br22) a 15 (Br24), essa maior associação de mutações foi localizada exclusivamente na região da MAF, em 2 amostras; na AL foram localizados menos sítios polimórficos em um mesmo haplótipo, porém um maior número das amostras da AL (96) apresentaram mutações gerando 12 haplótipos distintos e exclusivos na AL. Os haplótipos Br01 e Br02 apareceram em 16 amostras cada, seguidos pelo Br03 em 15, Br04 em 11, Br05 em 10, Br06 em 9, Br07 em 8, Br08 e Br09 em 6, Br10 e Br11 em 5, Br12 a Br17 em 4, Br18 a Br23 em 3, Br24 a Br33 em 2, enquanto os demais, Br34 a Br100, apareceram em apenas 1 amostra (Figura 10).

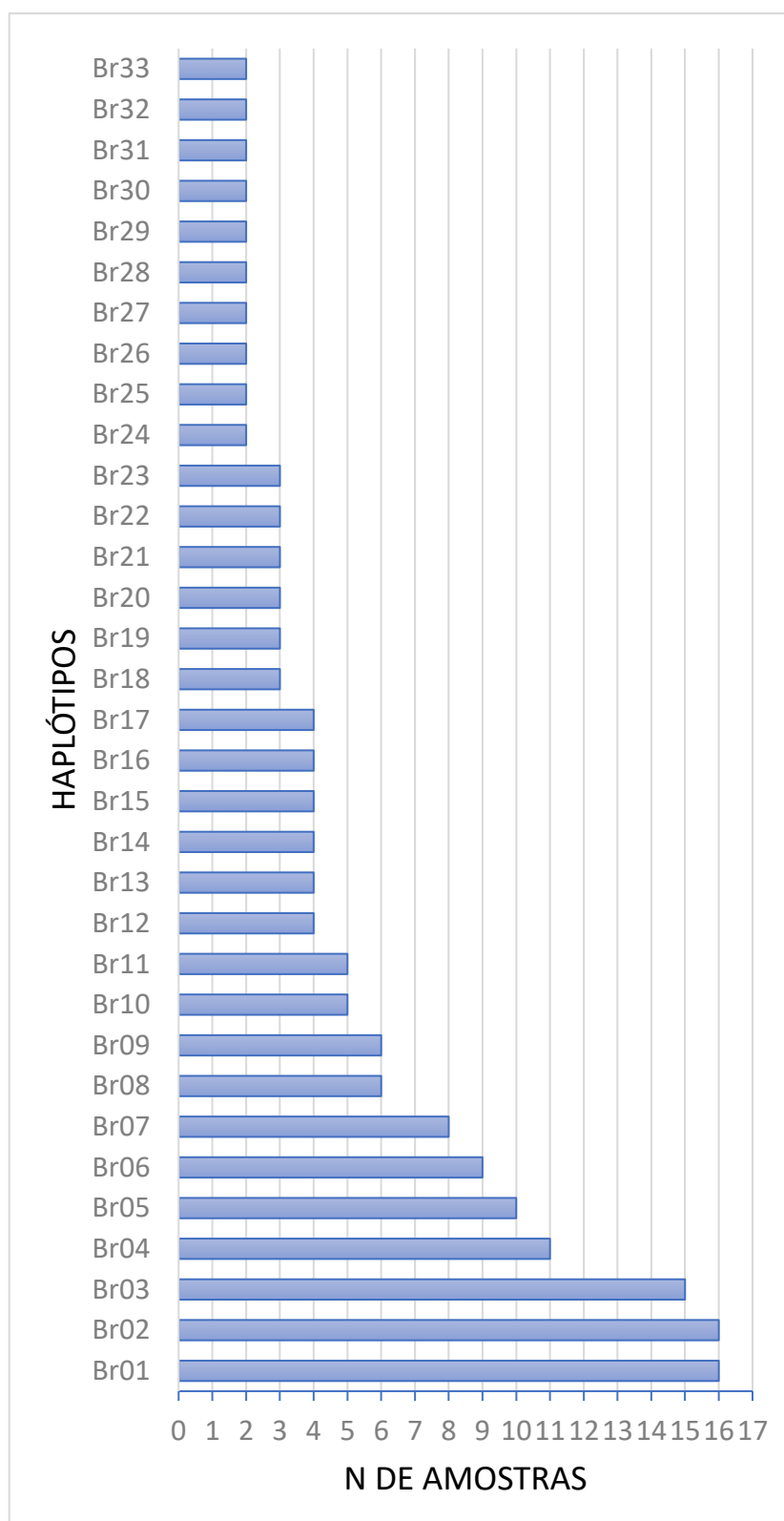
A distribuição temporal dos haplótipos variou ao longo do tempo (Figura 11). A média do número de haplótipos foi de 21 ao ano, variando de 14 (2012, 2013 e 2014) a 37 (2011). O ano de 2018 não foi computado na estimativa porque só houve coleta no primeiro trimestre.

Tabela 4: Haplótipos presentes em 2 ou mais amostras de acordo com os perfis do gene DBP

Cód.	Haplótipo	N de mutações	N de amostras	Localidade
Sal1	NRILKNRDEKRSTKNILWQQI	0	11	1 MAF/10 AL
Br01	YSIFKNRGKTHSRNNIWWQI	10	16	MAF
Br02	NRILKNRGEKHSTKNILWQQK	3	16	AL
Br03	NRILENRGEQRSTKKIIRQQI	6	14	1 ÁFRICA /1HAITI 8 MAF / 4 AL
Br04	NRILKNRDEKRSTKNILWQQI	0	11	10 AL/ 1 MAF
Br05	NRILENRGEQRSTKKIIRQQK	7	10	1 África 7 AL / 2 MAF
Br06	NRILKNRGEKHSTKNILWQQI	2	9	7 AL/1 Suriname 1 Venezuela
Br07	NSILENRGKNRSTKKIIRQQK	9	8	7 AL/ 1 África
Br08	YSIFKNRGKNHSRNNLIWQQI	11	6	MAF
Br09	NRILKNRGEKHSTKNILWQEI	3	6	5 AL/ 1 MAF
Br10	NRILKNRDEKRSTKKIIRQQK	3	5	AL
Br11	NRILENRGEKRSTKKMIRQQI	5	5	AL
Br12	YSSFKNRGQNH SRNNLIWQQI	12	4	MAF
Br13	YRILENRGEQRSTKKIIRQQK	8	4	3 MAF / 1 AL
Br14	YRILENRGEQRSTKKIIRPQK	9	4	3 AL/ 1 África
Br17	NRILENRGEKHSTKNILWQQI	3	4	AL
Br15	NSILKNRGKNHTRKNIIWQQI	7	3	AL
Br16	NRILENRGEQRSTKKIIRPQK	8	3	1 MAF / 2 AL
Br18	YSSFNNRGQNH SRNNLIWQQI	14	3	MAF
Br19	YSILKNRGTNHSRNNIWWQI	9	3	MAF
Br21	NSILENRGKNRSTKKIIRQQI	8	3	AL
Br22	NRILKNRGEKRSTKNILWQQI	1 (D384G)	3	AL
Br23	NRILENRGEQRSTKNIIIRQQK	6	3	1 MAF / 2 AL
Br20	YRILENRGEKRSTKKMIRQQK	8	2	AL
Br24	YSSFNNRGQNH SRNNRIWQQK	15	2	MAF
Br25	YSSFNNRGQNH SRNNRIWQQI	13	2	MAF
Br26	YSIFKNRGQNH SRNNIWWQK	11	2	MAF
Br27	YSIFKNRGKTHSRNNIWPQI	11	2	MAF
Br28	YSIFKNRGKNHSRNNIWWQI	10	2	MAF
Br29	NSILKNRGKNHTRKNIIWQQK	9	2	AL
Br30	NSILKNRGKNHSTKNILWQQI	5	2	1 AL/1 Guiana Francesa
Br31	NSILENRGKNRSTKKIIRPQK	10	2	AL
Br32	NRILKNRGEKRSTKNILRQQK	3	2	AL
Br33	NRIFKDRGKNHSTKKIIRQQI	9	2	AL

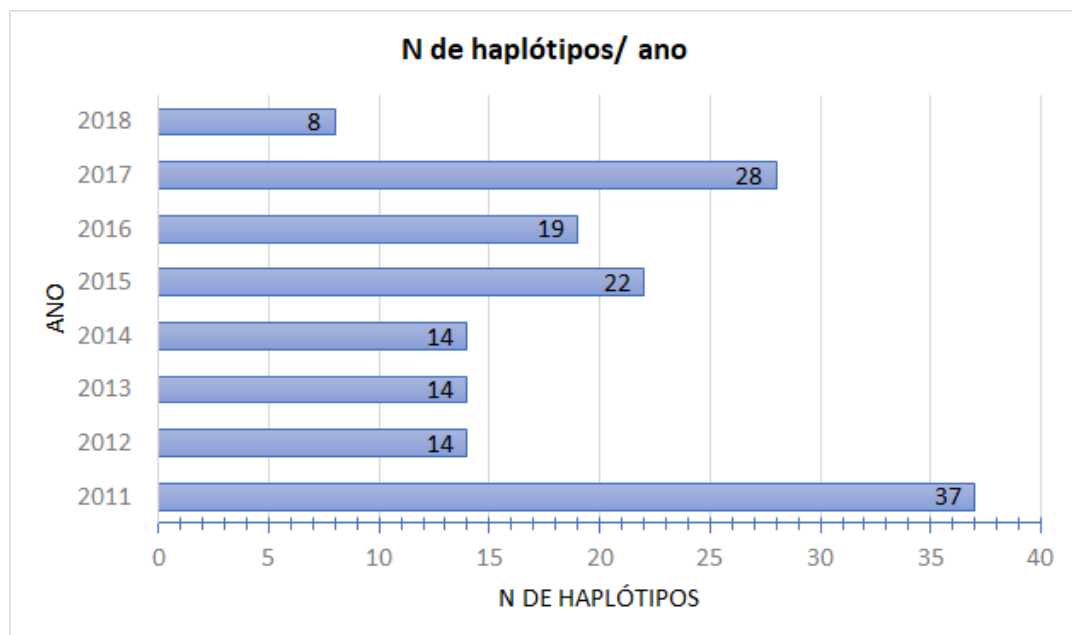
Aminoácidos destacados em vermelho: mutações localizadas nos haplótipos de acordo com a cepa referência Sal I.

Figura 10: Frequência dos haplótipos de acordo com o número de amostras



Haplótipos que apareceram em 2 ou mais amostras independente da localidade.

Figura 11: Número de haplótipos da DBP por ano



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras da AL apresentaram maior diversidade que as da MAF, como esperado, por conta da maior transmissão, resultando em maior probabilidade de mutação e reprodução sexuada no mosquito. As diferenças de determinados polimorfismos permitiram sugerir a possibilidade de assinaturas gênicas diferentes para a MAF e a AL.

A detecção dos 5 códons - N417K, I419L, L424I, W437K e I503K - que sozinhos ou combinados podem alterar significativamente os epítomos da DBP e, conseqüentemente, a resposta imune contra DBP-II denota a pertinência de se incluir tais variantes alélicas na composição de uma vacina que tenha como alvo a proteína DBP para aumentar a sua eficácia em regiões brasileiras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, EDNA FERREIRA. **Malária: Aspectos históricos e utilização da artemisinina em seu tratamento.** São João del-Rei. Trabalho de Conclusão de Curso (Química)-Universidade Federal de São João del-Rei, 2015. Disponível em: <<https://www.ufsj.edu.br/portal2/repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Edna-Ferreira-Amaral-20152.pdf>>. Acesso em 21 jan. 2019.
- ARÉVALO-HERRERA, M. CHITNIS, C.; HERRERA, S. **Current status of *Plasmodium vivax* vaccine.** Human Vaccines, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 124–132, 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.6.1.9931>>. Acesso em 23 março de 2019.
- AUBURN S. *et al.* **A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of pir genes.** Wellcome Open Research 2016, :4 (doi:110.12688/wellcomeopenres.9876.1) Acesso em 15 março de 2019.
- BATTLE K. E. *et al.* **Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse.** Malaria Journal 2014, 13:144. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-144>>. Acesso em 18 de novembro de 2018.
- BERMÚDEZ, M. *et al.* ***Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: the spoke in the wheel.** Malaria Journal, [s.l.], v. 17, n. 1. 20 ago. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-018-2456-5>. Acesso em 10 mar. 2019.
- BRASIL, P. *et al.* ***Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonosis with outbreak potential in the Rio de Janeiro Brazilian Atlantic forest.** [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/122127>>. Acesso em: 1 março 2019.
- CERÁVOLO, ISABELA PENNA. **Caracterização Imunológica e Molecular da Duffy Binding Protein do *Plasmodium vivax* em Áreas de Transmissão de Malária da Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira.** 115 f. Tese (Doutorado Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias) -Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2007.
- CHEN E. *et al.* **Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Design.** PLoS Negl Trop Dis 9(3): e0003644. 2015. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pntd.0003644>. Acesso em 16 de setembro de 2018.
- CHITNIS C.E., MILLER L.H. **Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion.** J. Exp. Med. 1994;180(2):497–506. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2191600/pdf/je1802497.pdf>>. Acesso em 18 de agosto de 2018.
- COX-SINGH J. *et al.* ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** Clin Infect Dis 46: 165-171. 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1086/524888>>. Acesso em: 21 de setembro de 2018.

COX-SINGH J, *et al.* **Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report.** 2010. Malar J 9: 10. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818646/>>. Acesso em: 21 de setembro de 2019.

CROWMAN, A. F., BERRY, D., BAUM, J. **The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell.** 2012. Journal of cell Biology 198: 961-971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444787/>>. Acesso em: 22 de setembro de 2018.

COWMAN A.F., Crabb B.S. (2006). **Invasion of red blood cells by malaria parasites.** Cell Vol 124, Issue 4, Págs 755-766 24 Feb 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>>. Acesso em 21 de setembro de 2018.

D'AMATO, Claudio; TORRES, João PM; MALM, Olaf. **DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão.** Quim. Nova, São Paulo, v. 25, n. 6a, p. 995-1002, novembro de 2002. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000600017>>. Acesso em 25 de novembro de 2018.

ESPINOZA, J. **Malaria Resurgence in the Americas: An Underestimated Threat.** Pathogens. v.8, n.11, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-0817/8/11/11>>. Acesso em: 23 jan de 2019.

FRANCA, TANOS C.C. *et al.* **Malária: aspectos históricos e quimioterapia.** Quim. Nova, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500060>>. Acesso em 21 de janeiro de 2019.

GARCIA LS. **Malaria.** Clin Lab Med 30: 93–129. Soares, I. S.; Rodrigues, M. M.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998, 31, 317. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272271209001188?via%3Dihub>>. Acesso em 22 de agosto de 2018.

GONZÁLEZ-CERÓN L. *et al.* **Diversity and evolutionary genetics of the three major *Plasmodium vivax* merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico.** Parasit and Vectors 8: 651. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4687067/>>. Acesso em 21 de setembro de 2018.

GOSI, P. *et al.* **Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates.** Malaria Journal, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 112, 2008. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-7-112>>. Acesso em: 25 maio de 2019.

GREENWOOD, B.; TARGETT, G. **Do we still need a malaria vaccine?** Parasite Immunology, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 582–586, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2009.01140.x>>. Acesso em: 26 maio. 2019.

GUPTA, SONAL *et al.* **Targeting a Reticulocyte Binding Protein and Duffy Binding Protein to Inhibit Reticulocyte Invasion by *Plasmodium vivax*.** Scientific reports. vol. 8,1

10511. 12 julho 2018. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28757-4>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

HANS, DHIRAJ *et al.* **Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion.** Molecular Microbiology, [s.l.], v. 55, n. 5, p.1423-1434, 21 jan. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2005.04484.x>>. Acesso em 10 mar. 2019.

HANSEN, D. **Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?** PLoS Pathogens, 6(4). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2861684/>>. Acesso em 15 de fev. de 2019

HOQUE MR. *et al.* **Diversity pattern of Duffy binding protein sequence among Duffy-negatives and Duffy-positives in Sudan.** Malar J 17: 297. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6098642/>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

HOSTETLER JB. *et al.* **Independent Origin and Global Distribution of Distinct *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Gene Duplications.** 2016. PLoS Negl Trop Dis 10(10). Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005091>>. Acesso em 10 de março 2019.

J.K. BAIRD. **Evidence & implications of mortality associated with acute *P. vivax* malaria** Clin Microbiol Rev, 26 (2013), pp. 36-57. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/cmr/26/1/36.full.pdf>>. Acesso em 15 de fev. de 2019.

JU *et al.*: **Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates.** Malaria Journal. 2012. 11:60. doi:10.1186/1475-2875-11-60

LACERDA M. V. *et al.* **Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature.** 11:12. 2012. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-12>>. Acesso em 18 de outubro de 2018.

LONGLEY R.J. *et al.* **Naturally acquired antibody responses to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions.** PLoS Negl Trop Dis 11(9). 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005888>>. Acesso em 21 de outubro de 2018.

M.A. ALEXANDRE *et al.* **Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon.** Emerg Infect Dis. 16 (2010), pp. 1611-1614. doi:10.3201/eid1610.100685.

MANZALI DE SÁ, IVONE. **A resistência à cloroquina e a busca de antimalaricais entre as décadas de 1960 e 1980.** História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v.18, n.2, abr.-jun. 2011, p.407-430.

MARTINS-CAMPOS, KEILLEN M. *et al.* **Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon.** *Malaria journal* vol. 11 351. 23 out. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-351>>. Acesso em 18 de novembro de 2018.

MCHENRY, A. M. *et al.* **Determination of the Molecular Basis for a Limited Dimorphism, N417K, in the *Plasmodium vivax* Duffy-Binding Protein.** *PLoS ONE*, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e20192, 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020192>>. Acesso em: 16 maio de 2019.

MMV - MEDICINES FOR MALARIA VENTURE. 2017. **Parasite Lifecycle.** Disponível em: <<https://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>> Acesso em: 21 Set de 2018.

MUELLER I. *et al.* **Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite.** *Lancet Infect Dis* 9: 555-566. 2009. Disponível em: <[http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)>. Acesso em 10 de agosto de 2018.

MUELLER I, SHAKRI AR, CHITNIS CE. **Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria.** *Vaccine*. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013365?via%3Dihub>>. Acesso em 25 de setembro de 2018.

MUTIS, MCS. *et al.* **Malária.** In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; c2005. p. 833-58.

NEAFSEY, D. E. *et al.* **The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*.** *Nature Genetics*, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 1046–1050, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863733>>. Acesso em: 26 maio. 2019.

NICOLETE, V. CRISTINA. **Polimorfismo no grupo sanguíneo duffy e anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a proteína de ligação em Duffy de *Plasmodium vivax* (pvdhp) na amazônia rural brasileira.** 2012. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2012. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-23042013-111159/publico/VanessaCristinaNicolete_Mestrado_Corr.pdf>. Acesso em: 25 março de 2019.

NÓBREGA DE SOUSA, T.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. **Worldwide Genetic Variability of the Duffy Binding Protein: Insights into *Plasmodium vivax* Vaccine Development.** *PLoS ONE*, [s. l.], v. 6, n. 8, p. e22944, 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022944>>. Acesso em: 21 março de 2019.

NOULIN, F. **1912-2012: A century of research on *Plasmodium vivax* in vitro culture.** 2013. *Trends in Parasitology*. doi:10.1016/j.pt.2013.03.012

NTUMNGIA, F. B. *et al.* **Novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium vivax* Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes.** *Mbio*, v.7, n. 4, p.e01261-16, 2016b. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/content/mbio/7/4/e01261-16.full.pdf>>. Acesso em 18 de agosto de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016. Malária. Disponível em:

<<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>. Acesso em 05 março de 2019

OXBOROUGH, RM. **Trends in US President's Malaria Initiative-funded indoor residual spray coverage and insecticide choice in sub-Saharan Africa (2008–2015): Urgent need for affordable, long-lasting insecticides.** Malar J 2016; 15: 146.

PAN AMERICA HEALTH ORGANIZATION. **Report on the Situation of Malaria in the Americas- 2017.** Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=statistics-data-maps-8109&alias=48335-situation-of-malaria-in-the-region-of-the-americas-2017&Itemid=270&lang=en>. Acesso em 29 de outubro de 2018.

PAROBEEK CM. *et al.* **Differing Patterns of Selection and Geospatial Genetic Diversity within Two Leading *Plasmodium vivax* Candidate Vaccine Antigens.** PLoS Negl Trop Dis 8(4): e2796. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002796>. Acesso em 18 março de 2019.

PINA-COSTA, ANIELLE DE *et al.* **Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. vol.109, n.5, pp.618-633. 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140228>>. Acesso em 18 de outubro de 2018.

PORTAL MINISTÉRIO DA SAÚDE 2019. Disponível em:

< <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45391-brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em-relacao-a-2018>>. Acesso em 28 de abril de 2019.

PRICE, RN. *et al.* **Vivax malaria: neglected and not benign.** Am J Trop Med Hyg. Vol. 77 pp.79–87. 2007. Disponível em:

<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/77/6_Suppl/0770079.pdf?expires=1557080098&id=id&accname=guest&checksum=82ADD31FD24E93F5103701952B05BCB4>. Acesso em: 28 abril de 2019.

SABBATANI S, FIORINO S, MANFREDI R. **The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern?** Braz J Infect Dis 14: 299-309. 2010.

Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000300019>. Acesso em 18 de outubro de 2018.

SINGH, B., *et al.* **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** Lancet. 363:1017-1024. 2004. Disponível em:

<[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)15836-4/fulltext#articleInformation](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)15836-4/fulltext#articleInformation)>. Acesso em 21 de agosto de 2018.

SOUGOUFARA S. *et al.* **Challenges for malaria vector control in sub-Saharan Africa: Resistance and behavioral adaptations in *Anopheles* populations.** Journal of vector borne diseases.54. 4-15. 2017. Disponível em: <

https://www.researchgate.net/publication/315827871_Challenges_for_malaria_vector_control_in_sub-

Saharan_Africa_Resistance_and_behavioral_adaptations_in_Anopheles_populations>. Acesso em 15 de setembro de 2018.

SOUSA, TAÍS NÓBREGA DE *et al.* **The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 109, n. 5, p. 608-617. Agosto de 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130592>> Acesso em 13 março de 2019.

STRUIK S. S.; RILEY E. M. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol. Rev.* 201: 268–290. 2004. Disponível em: <<http://doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00181.x>>. Acesso em 21 de novembro de 2018.

TA, THUY H *et al.* **First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*.** *Malaria journal* vol. 13 68. 24 Feb. 2014, doi:10.1186/1475-2875-13-68. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3937822/>>. Acesso em: 15 de agosto de 2018.

VAL F. *et al.* **Respiratory Complications of *Plasmodium vivax* Malaria: Systematic Review and Meta-Analysis.** Am J Trop Med Hyg. 97(3):733-743. doi: 10.4269/ajtmh.17-0131. Epub 19 Jul 2017. Review. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5590608/>>. Acesso em 21 de setembro de 2018.

VAUGHAN A. M.; ALY A. S.; KAPPE S. H. **Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding.** Cell Host Microbe 4: 209-218. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2610487/>>. Acesso em 9 de novembro de 2018.

VITOR-SILVA, SHEILA *et al.* **Declining malaria transmission in rural Amazon: changing epidemiology and challenges to achieve elimination.** *Malaria journal* vol. 15,1 266. 10 May. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12936-016-1326-2>>. Acesso em 3 de outubro de 2018.

WECKX, S. *et al.* **novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery.** Genome research, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 436–42, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741513>>. Acesso em: 20 março de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2018. **World Malaria Report 2018.** Geneva: World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>. Acesso em 28 de Outubro de 2018.

