

Resumo de Tese

Tipagem molecular do sistema sangüíneo Duffy em indivíduos expostos à malária na Amazônia brasileira**Molecular genotyping of Duffy blood group among individuals exposed to malaria in Brazilian Amazon**

Carlos E. Cavasini

Orientador:

Marcelo U. Ferreira

Resumo

O sistema sangüíneo Duffy é constituído pelos alelos *FY1*, *FY1^{null}*, *FY2*, *FY2^{ES}* e *FY2^{WK}* que produzem os fenótipos FY:1,-2, FY:-1,2, FY:1,2, FY:-1,2^{WK} e FY:-1,-2. A ausência da proteína Duffy nos eritrócitos, que corresponde ao fenótipo FY:-1,-2 ou Duffy negativo, é predominante nos africanos, que possuem o alelo *FY2^{ES}*. Este alelo apresenta uma mutação na região promotora do gene, abolindo a expressão da proteína apenas nas hemácias. O *FY2* é fracamente expresso nos eritrócitos FY:-1,2^{WK}. Indivíduos Duffy negativos são resistentes à malária por *P. vivax*; sugerindo-se que *FY* foi alvo de seleção natural pelo parasita. Informações sobre polimorfismo eritrocitário são escassas no Brasil.

Compara-se neste trabalho a distribuição de genótipos do sistema sangüíneo Duffy em 68 pacientes com infecção por *Plasmodium vivax* e em 59 controles com malária não-vivax de Rondônia, Brasil. Amostras de sangue foram colhidas dos pacientes que procuravam tratamento para malária. A extração do DNA de leucócitos humanos foi realizada com o método de fenol-clorofórmio. A confirmação e identificação das espécies de *Plasmodium* foram feitas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se *primers* espécie-específicos em duas reações

seqüenciais. A tipagem molecular do sistema sangüíneo Duffy foi realizada através de PCR com uma combinação de *primers* alelos-específicos para quatro reações diferentes. Para a diferenciação entre os alelos *FY2* e *FY^{WK}*, usou-se um protocolo de amplificação com *primers* *Fy3* e *Fy4*, seguido de digestão com enzima de restrição *AclI*.

Alguns produtos de PCR foram clonados e os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados. Para a comparação entre proporções utilizou-se o teste de χ^2 , com nível de significância de 5%. A amplificação específica do DNA de *Plasmodium* dos 97 pacientes examinados, resultou em 63% de *P. falciparum*, 59% de *P. vivax* e 9% de *P. malariae*. A freqüência dos alelos *FY1*, *FY2* e *FY^{ES}* foi, respectivamente, de 0,404, 0,426 e 0,169 nos pacientes com malária vivax e, nos pacientes com malária não-vivax, foi de 0,398, 0,398 e 0,203. Nenhum paciente infectado com *P. vivax*, mas 12% dos controles não-vivax, eram homocigotos para o alelo *FY^{ES}*, que abole a expressão do antígeno Duffy em hemácias. No entanto, não se observou evidência de proteção significativa contra *P. vivax* entre indivíduos heterocigotos para *FY*. Todos os alelos *FY2* seqüenciados eram do tipo selvagem. O alelo *FY^{WK}*, que tem sido recentemente associado com a expressão eritrocitária muito fraca do antígeno Duffy, não foi encontrado entre pacientes locais com infecção por *P. vivax*.

Abstract

Duffy blood group (FY) polymorphisms are important in endemic areas of the malaria parasite *Plasmodium vivax*, due to its role as an erythrocyte receptor for this species but not for the other human malaria parasites. The absence of FY on the red blood cells of individuals from many African ethnic groups and their descendants causes no obvious ill effect, and confers natural resistance against *P. vivax* infection. Here we compared the Duffy blood group genotype distribution, as determined by polymerase chain reaction (PCR) with allele-specific primers, in 68 *Plasmodium vivax*-infected patients and 59 non-*vivax* malaria carriers from Rondônia, Brazil. Venous blood was collected, after informed consent, from 127 patients with microscopically confirmed malaria diagnosis.

Human DNA was isolated using standard phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation protocols. On-site *Plasmodium* species identification was made by standard thick smear microscopy, and further confirmed by species-specific PCR in 97 (76%) patients or by reexamination of available blood smears in 30 (24%) patients. Amplification of the alleles coding for FY was performed with combinations of the forward oligonucleotide primers GATAFY2 (that targets the mutated GATA-1 promoter sequence) and FYAB2 (that targets the wild-type promoter sequence), and the forward primers FYAREV (that targets the FY1 allele) and FYBREV2 (that targets the FY2 allele). The following allele frequencies were

found: (a) *P. vivax*-infected patients, FY1 = 0.404, FY2 = 0.426 and FY^{ES} = 0.169, (b) patients infected with either *P. falciparum* and/or *P. malariae*, FY1 = 0.398, FY2 = 0.398 and FY^{ES} = 0.203. Homozygosity for the allele FY, which abolishes the Duffy antigen expression on erythrocytes, was observed in 12% non-*vivax* controls but in no *P. vivax* patient. However, no significant association was found between FY heterozygosity and protection against *P. vivax*. The FY^{WK} allele, which has recently been associated with very weak erythrocyte expression of Duffy antigen, was not found in local *P. vivax* patients. Since a few equivocal results were obtained with restriction fragment length polymorphism analysis, these findings were confirmed by sequencing a 661-bp region of the Duffy gene from six *P. vivax*-infected subjects presenting the FY2FY^{ES} genotype, as well as one patient with the FY2FY2 genotype and one with the FY1FY2 genotype. Four clones for patients were sequenced, in order to have both alleles represented. A single patient, presenting the genotype FY2FY2, was heterozygous for the G298A mutation in exon 2; no instances of C265T mutation, which characterizes the FY^{WK} allele, or any other mutation, were found.

Recebido: 06/06/01

Aceito: 30/07/01