

O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica

The malaria challenge: the Brazilian case and what can be expected from progress in genomics

Luiz Hildebrando Pereira da Silva ¹
Vera Engracia Gama de Oliveira

Abstract *Malaria endemic areas in Brazil are restricted to the Amazon Region, with an average of 500 thousand new cases every year. The situation can be defined as unstable hipoendemic with, however, foci of high endemicity. Demographic and socio economic factors are main determinants in the malaria challenge for the Public Health System. In the present paper, biological and social factors responsible for the unstable endemic situation are discussed. The need for a permanent surveillance and intervention of Public Health Services are stressed to avoid the occurrence of local epidemics and spreading of endemic areas. In the paper, are also summarised recent lines of research developed in the post genomic era in the studies of parasite, vector and human molecular genetics that would favour the development, in the future, of new tools and procedures for malaria control*

Key words *Malaria, Genomics, Plasmodium, Anopheles*

Resumo *A área endêmica de malária no Brasil se estende atualmente à totalidade da região amazônica, com cerca de 500 mil casos anuais, em geral com situações de baixa e média endemicidade mas ainda apresentando focos de alto risco. Fatores demográficos e socioeconômicos são dominantes nos desafios que enfrentam os Serviços de Saúde Pública no controle da malária. No presente artigo são discutidos fatores determinantes da instabilidade da situação endêmica bem como a necessidade de ações permanentes de vigilância e de intervenção dos Serviços de Saúde para que se evitem surtos epidêmicos e alastramento das áreas endêmicas. No artigo, em seguida, apresenta-se uma síntese de progressos recentes nos estudos da era genômica e pós-genômica sobre o parasita, o vetor e o hospedeiro humano que podem favorecer, no futuro, o desenvolvimento e a melhoria dos métodos de controle da malária.*

Palavras-chave *Malária, Genomics, Plasmodium, Anopheles*

¹ Centro de Pesquisa em Medicina Tropical. Rodovia BR 364, Km 4,5 78970-900 Porto Velho RO. hildebrando@cepem.com.br

Introdução

A malária no Brasil, no período anterior a 1940, cobria grande parte do território nacional e se constituía em verdadeiro desafio à colonização não apenas da Amazônia mas de várias áreas litorâneas do sudeste e de áreas da bacia dos rios Paraná-Prata, São Francisco e Doce, no Planalto Central. Sem se dispor de registro confiável de incidência, avaliava-se que o número de casos anuais de malária oscilava em torno de 4 a 5 milhões (Pessoa, 1946). Na primeira metade do século 20, a malária provocou dois episódios dramáticos de grandes dimensões: o primeiro, durante a construção da Ferrovia Madeira-Mamoré, no início do século, quando se calcula que tenha provocado mais de 10 mil mortes entre trabalhadores, nas várias etapas da sua abertura e implantação. O segundo, no Nordeste brasileiro, na década de 1930, após a chegada nas costas brasileiras, por meio das lanchas rápidas entre Dakar e Natal, do mosquito africano *Anopheles gambiae*, excelente vetor adaptado às regiões semi-áridas do Sahel africano. A penetração do *A. gambiae* no Nordeste brasileiro provocou uma terrível epidemia nas áreas rurais, com cerca de 14 mil mortes nos anos 1938-1939 (Deane, 1988). Registre-se o fato de que a campanha contra o *A. gambiae*, comandada pelo entomologista americano Fred Soper, da Fundação Rockefeller, conseguiu, em apenas 14 meses, a façanha de erradicar esse anofelino da região nordestina. Isso numa época anterior ao DDT, em que os meios de combate ao mosquito eram restritos aos inseticidas à base de piretro e os larvicidas químicos à base de arsenicais como o verde Paris (Soper & Wilson, 1943).

O Serviço Nacional de Malária (criado em 1941) implantou no país, a partir dos anos 1950, a estratégia de “erradicação” como parte de campanha internacional, sob a égide da Organização Mundial da Saúde. Essa estratégia baseava-se no uso de inseticidas de ação residual (o DDT em particular) e das novas drogas antimaláricas sintéticas, em particular as quatro aminoquinoleínas (cloroquina). A campanha teve grande sucesso, permitindo erradicar a malária de quase toda a área litorânea do país (com exceção de uma faixa na área da serra do Mar de Paraná-Santa Catarina), e das regiões tributárias das grandes bacias hidrográficas do país fora da Amazônia (Deane, 1992).

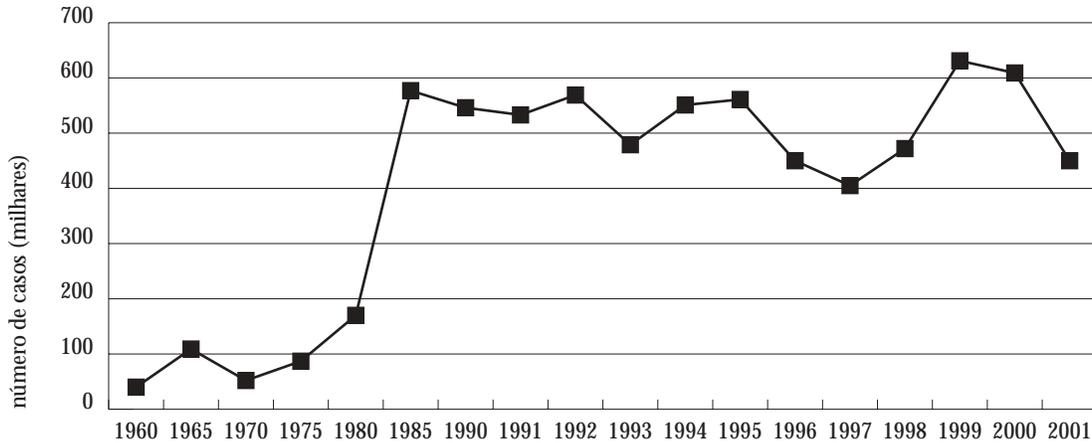
No início da década de 1960, o número de casos de malária caíra a apenas cerca de 40.000

por ano (Figura 1), concentrados na região amazônica, onde a extensão das áreas, as dificuldades de acesso, a dispersão e a natureza das habitações não permitiam o uso apropriado de inseticidas (Marques e Gutierrez, 1993). Entretanto, com o desenvolvimento dos projetos de colonização da Amazônia pelo governo militar, a partir dos meados da década de 1960, verificou-se um enorme processo migratório para a região, que recebeu, entre 1970 e 1980, mais de 1 milhão de imigrantes, do sul, sudeste e nordeste do país (Marques, 1987). Os imigrantes, em áreas rurais, implantaram assentamentos agrícolas e desenvolveram intensa atividade de garimpo a céu aberto, ocasionando vastas ações de desflorestamento, perturbação dos cursos naturais de rios, igarapés e lagos, criando, assim, condições favoráveis à proliferação dos anofelinos. Some-se a isso as precárias condições de habitação e a total inexperiência em malária, pois provinham de áreas do país onde a malária nunca existira, ou fora erradicada havia mais de 20 anos. Esses fatores, associados ainda à insuficiência de estruturas médico-sanitárias, levaram ao desencadeamento do terceiro drama de malária do século no país. Dessa vez, entretanto, o drama atingiu proporções continentais, em toda a Amazônia e, devido à movimentação dos migrantes aos locais de origem, provocou o reaparecimento de focos de malária em regiões onde ela tinha sido erradicada nas campanhas de 1950-1960 (Deane, 1992).

O número anual de casos novos de malária no país saltou assim de 39.729 em 1960 para mais de 100 mil em 1965 e 170 mil em 1980, continuando a crescer na década de 1980 para atingir um platô em torno dos 500 mil em 1990. A partir dessa data vem flutuando em torno dos 500 mil casos anuais (Figura 1). Essa estabilização reflete um certo equilíbrio obtido com as medidas de controle desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, em particular a multiplicação de postos de atendimento, restrições impostas ao desenvolvimento de garimpos a céu aberto e maior controle nas condições de implantação de assentamentos agrícolas. A mortalidade por malária, que era relativamente elevada na década dos 1980 (nível de 1.500 anuais), caiu para cerca de 150 na década de 1990 e mantém-se neste nível (Funasa, 2000). O equilíbrio, entretanto, é extremamente frágil, como demonstra a oscilação das cifras observadas na curva de incidência anual da figura 1, fruto de variações climáticas, movimentos demográficos e sociais e deslocamentos populacionais

Figura 1

Evolução do número de casos de malária no Brasil de 1960 a 2001.



1960-1990 – variação quinquenal.

1990-2001 – variação anual.

Fonte: Funasa, 2001 e Funasa, comunicação aos autores.

imprevistos. Ainda recentemente, no ano de 1999, observou-se um súbito aumento no número de casos, que passou de cerca de 470 mil em 1998 a 630 mil em 1999. As medidas de reação do Ministério da Saúde, responsável pela implantação do Plano de Incremento de Ações de Controle da Malária (Funasa, 2000), deram bons resultados, registrando-se ligeiro recuo no número de casos no ano 2000 (em torno de 600 mil) e uma nítida tendência à queda no ano de 2001. Esses resultados demonstram, de um lado, a capacidade dos serviços de saúde do país em impor medidas de controle eficazes, permitindo obter reduções nas taxas de incidência. Por outro lado, eles revelam a instabilidade e a fragilidade dessas mesmas medidas de controle que exigem vigilância permanente e investimentos constantes. Sem o atendimento dessa exigência, é iminente o risco de reversões de situações e de surgimento de novos surtos epidêmicos.

A situação de malária do país, no início do século 21, define-se portanto como uma situação de “malária residual”, estendendo-se praticamente a toda região amazônica, com predominância da malária *vivax*, que atinge 70% ou mais dos casos, com níveis de endemicidade baixa ou média, mas com alguns focos de incidência elevada (alto risco). A situação se caracteriza ainda por alta instabilidade e permanente

ameaça: a desenvolver surtos epidêmicos, alastrar-se a regiões vizinhas, provocar metástases focais em outras regiões do país e a estar sujeita a largas oscilações em função de variáveis climáticas, demográficas ou socioeconômicas. Esse é o desafio atual da malária no Brasil.

É interessante assinalar que os progressos nos conhecimentos científicos na área da biomedicina, que foram importantes no século 20 e espetaculares nas últimas décadas, tiveram pouco impacto nos métodos de controle da malária. Eles continuam a se basear essencialmente nos métodos do fim do século 19, a saber, controle de vetores por inseticidas e larvicidas e tratamento de doentes, portadores de parasitas.

Em relação às grandes patologias que afetam o homem desde a antiguidade, a malária oferece portanto um quadro paradoxal: na época atual, quando se começa a obter sucessos no tratamento do câncer e se abrem perspectivas de terapia gênica, a malária continua a afetar dramaticamente grande parte da humanidade no hemisfério sul; seu controle é ainda baseado em métodos do século 19; e sua incidência pouco recuou, parecendo, ao contrário, aumentar em volume e gravidade. É legítimo, portanto, interrogar-se se os progressos da era genômica poderão repercutir no desenvolvimento de novos métodos de controle. Haverá novas soluções para eliminar a malária residual em situa-

ções como a do Brasil? Haverá novas soluções para controlar ou ao menos reduzir a situação brutal da malária africana com os seus 2 milhões de mortes anuais de crianças?

No presente trabalho, procuramos dar uma visão sintética de novos conhecimentos que a era genômica vem permitindo desenvolver sobre a “genética da malária”. Pretendemos assinalar as linhas de pesquisas que vêm se desenvolvendo com maior intensidade e com perspectivas mais promissoras. Até o momento, esses estudos não se traduziram por aplicações importantes. Entretanto, há o sentimento que se generaliza entre os pesquisadores de que os 20 anos de esforços empenhados até hoje comecem a dar frutos e a amadurecer soluções.

A “genética da malária”

A malária é provocada por protozoários parasitas da ordem *Apicomplexa* e gênero *Plasmodium* que fazem parte do grupo dos coccídeos, com ciclos complexos de multiplicação sexuada e assexuada. As quatro espécies de plasmódios que infectam o homem, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (este último ausente do Brasil), são transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles*. Os parasitas da malária têm alto nível de especificidade de hospedeiros, resultante de um longo processo de adaptação no curso da evolução. Assim, os parasitas da malária humana são específicos do homem. Embora possam infectar outros primatas em laboratório, não são normalmente encontrados em condições naturais. Faz exceção *P. malariae*, que é encontrado em primatas da região neotropical sob a forma do denominado *P. brasilianum*. Por outro lado, os plasmódios não infectam qualquer anofelino. Entre as centenas de espécies do gênero, poucas dezenas são vetores eficazes e, nas diversas áreas geográficas, as espécies presentes de anofelinos têm diferentes capacidades vetoriais pelas diferentes espécies de *Plasmodium* presentes. A “genética da malária” implica portanto uma interação entre “três genéticas”: genética do hospedeiro humano, a genética do parasita e a genética do vetor. Em cada caso, analisam-se os fatores que definem as especificidades das interações.

Fatores genéticos humanos relacionados com a susceptibilidade à malária

A alta prevalência, em determinadas re-

giões do globo terrestre, de alelos deletérios de proteínas eritrocitárias, estimulou estudos sobre a manutenção desses alelos por vantagens seletivas. Um esboço da influência das doenças infecciosas na constituição do genoma humano foi feito por A. E. Garrod em 1931, que no seu livro *The inborn factors in disease* sugere que as doenças infecciosas podem ter exercido grande força seletiva no modelamento da individualidade bioquímica. Outra contribuição importante foi dada por Haldane (1948), que, sugerindo vantagem do heterozigoto de talassemias em determinados grupos populacionais, abriu um campo de investigação de susceptibilidade genética à infecção. Muitos dos trabalhos surgidos nos últimos anos sobre malária têm importantes implicações, tanto para a compreensão da patogênese como para controle da doença. O polimorfismo do gene da cadeia β da Globina de Hemoglobina, mantido por mecanismos de polimorfismo balanceado, foi o primeiro a ser correlacionado com resistência a formas graves de malária falcipara (Allison, 1954). Trabalhos de Hill *et al.* (1991), em crianças do oeste africano, sugeriram que haplótipos do sistema de antígenos leucocitários HLA da classe I (HLA-Bw53) e um da classe II (DRB1*1302-DQB1*0501), comuns nesta região da África, mas raros em outros grupos populacionais, estavam independentemente associados com proteção contra a malária cerebral e anemia severa, respectivamente. De um modo geral, as associações das classes I e II do sistema HLA atuam através da seleção diferencial de epítopes peptídeos particulares de um patógeno para apresentação aos linfócitos T. Segundo Hill *et al.*, 1992, as associações HLA-B53 com malária eram um exemplo de como essa associação se processava, através da identificação de linfócitos T citotóxicos reconhecendo HLA-B53 e um epítotope particular do parasita. Entretanto, estudos de terreno de outras equipes de pesquisadores (Dieye *et al.*, 1997 – comunicação pessoal de P Druilhe aos autores) contrariam as hipóteses de Hill. Outra associação relacionada à malária envolve o gene codificador do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Estudos de McGuire (ver McGuire *et al.*, 1999, para revisão) em crianças gambienses demonstraram que as que são homozigotas para a mutação puntual na posição -308 da região promotora do TNF apresentaram risco significativamente aumentado de óbito por malária cerebral e que a anemia severa devido à malária estava associada à mutação na posição -238. O

fato de a malária cerebral estar associada ao alelo TNF-308 A e de a anemia severa ao alelo TNF-238 A levou o grupo de McGuire a sugerir que a manifestação clínica da malária é influenciada por determinantes genéticos complexos localizados próximos ao gene TNF. Foram identificados diversos alelos do sistema HLA em desequilíbrio de ligação com o alelo TNF-238, mas nenhum deles foi responsável pela associação com suscetibilidade à anemia severa. O impasse, segundo os autores, necessita de estudos em populações geneticamente distintas, além de estudos em grupos familiares, para definição precisa dos elementos genéticos envolvidos. A resistência inata ao *Plasmodium falciparum* é dada por características genéticas que afetam vários estágios do ciclo intraeritrocitário do plasmódio. As mutações eritrocitárias principais que conferem proteção contra a malária caracterizam-se por aumento de radicais livres de Oxigênio (como nas anemias falciformes, causada pelo alelo HbS em homozigose) ou pelo decréscimo na habilidade em lidar com danos oxidantes, como nas deficiências da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Nagel, 1990). Discutiremos brevemente estes dois polimorfismos genéticos na malária falcipara e o sistema sanguíneo Duffy, cujo polimorfismo está associado a resistência à malária *vivax*.

Hemoglobina S – A habilidade para resistência ao *P. falciparum* é um traço adaptativo importante das populações humanas que vivem em áreas endêmicas. Proteínas de membranas eritrocitárias atuam como mediadoras de adesão pelos eritrócitos infectados às células endoteliais. Supõe-se que o desenvolvimento e sobrevivência de gametócitos intraeritrocitários depende fortemente da habilidade de as células infectadas seqüestram na microvascularização de vários órgãos. A adesão e seqüestração de eritrócitos infectados pode levar a formas graves de malária, como a malária cerebral. Destro-Bisol *et al.* (1999a) propuseram que a interação entre Hb oxidada e proteínas de membrana eritrocitárias é um mecanismo celular importante para que a variante S do loco da cadeia β da Hb produza resistência ao *P. falciparum*, sendo a destruição acelerada de eritrócitos parasitados um dos mecanismos pelos quais portadores de HbS conseguem proteção contra *P. falciparum* (Telen, 2000, para revisão). O padrão irreversível de interação hemoglobina-membrana poderia desencadear mecanismos que: 1) reduzem a invasão dos eritróci-

tos pelo *P. falciparum*; 2) dificultam a sobrevivência do parasita e seu desenvolvimento na célula; e 3) aceleram a fagocitose das células infectadas. O surgimento do alelo S da Hemoglobina deu-se pela mutação no sexto codon do gene β , em que GAG é trocado por GTG, levando à produção do aminoácido Valina no lugar do ácido Glutâmico. Em heterozigose (genótipo HBB*A/*S) haveria proteção contra as formas graves da malária falcipara (ver Ashley-Koch *et al.*, 2000, para revisão). Luzzatto *et al.*, 1970 demonstraram *in vitro* que o produto do alelo GPX1*2, do sistema Glutatião peroxidase eritrocitário (GPX1; EC 1.11.1.9), que catalisa a oxidação do Glutatião reduzido (GSH) por peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e outros peróxidos, interfere com a habilidade de as células HBB*A/*S limitarem a invasão e crescimento do parasita *P. falciparum*. A alta atividade peroxidásica do produto do alelo GPX1*2 poderia interferir nas modificações da membrana do eritrócito, que causam o efeito antimalárico do genótipo HBB*A/*S, provocando um efeito epistático, pelo decréscimo da proteção deste genótipo contra a malária falcipara. Destro-Bisol *et al.* (1999b) propuseram a hipótese de que em nível clínico espera-se encontrar um aumento significativo de portadores do alelo GPX1*2 entre os indivíduos HBB*A/*S que desenvolvem malária severa. Modiano *et al.* (1996a, b) não encontraram correlação entre o traço falcêmico e vantagem seletiva ao estudarem três grupos étnicos do oeste africano. Entretanto, no mesmo contexto epidemiológico, alguns indivíduos caracterizaram-se por apresentar reatividade imunológica diferenciada, evidenciando diferenças interétnicas na suscetibilidade ao *P. falciparum*, que envolviam provavelmente regulação genética na resposta imune humoral (menor parasitemia, maior resposta a todos antígenos testados). Posteriormente, Modiano *et al.* (2001) concluíram que a menor suscetibilidade do grupo Fulani, nômades em via de assentamento, e de provável origem caucasiana (os outros dois grupos étnicos eram de camponeses, assentados, e de origem negróide), devia-se realmente a fatores genéticos de resistência desconhecidos, provavelmente envolvidos na regulação da resposta imune humoral. Num estudo sobre mecanismos genéticos responsáveis pela resistência à malária efetuado numa região endêmica de Rondônia (Portuchuelo, vilarejo ribeirinho), Feitosa *et al.* (2001) sugerem a existência de um gene principal, codominante, e que devido à frequência e ao modo

de herança, parece ser independente dos polimorfismos de Hb, Fy ou G6PD. Em outro estudo, realizado em Burkina Faso, com 4.348 indivíduos (Mossi), Modiano *et al.* (2001) verificaram que HbC está associada com uma redução de 29% no risco para a manifestação clínica da malária nos indivíduos heterozigotos HbAC ($P=0,0008$) e de 93% nos homozigotos HbCC ($P=0,0011$). Os autores sugerem que, a longo prazo e na ausência de controle para malária, HbC poderia substituir HbS na área central da África ocidental.

Desidrogenase de Glicose-6-fosfato (G6PD)

– Para seu desenvolvimento, o parasita aumenta consideravelmente sua necessidade metabólica, num período limitado de tempo, gerando um estresse adicional à célula hospedeira, levando-a à destruição. A membrana eritrocitária sofre modificações decorrentes desses processos oxidantes, levando a uma fagocitose acentuada dos eritrócitos em indivíduos thalassêmicos, com traço falcêmico e com deficiência em G6PD (Cappadoro *et al.*, 1992). O gene da G6PD é ligado ao cromossomo X e apresenta numerosas mutações, que causam deficiência enzimática nos eritrócitos. Algumas dessas mutações existem em frequência polimórfica e parecem apresentar vantagem seletiva, por conferirem resistência à malária falcipara. As mutações distribuem-se segundo populações e as mais comuns são G6PDA- (202A376G), comum na África, e G6PD_{Mediterrânea} (563T), encontrada no sul da Europa, no Oriente médio e Índia. Alelos com baixa atividade enzimática (A- e A_{med}) levam à redução no risco de infecção por *P. falciparum*. Luzzatto & Notaro (2001), em estudos sobre a história evolucionária da G6PD evidenciam a importância das análises moleculares, que mostram a conexão entre malária e deficiência em G6PD e propiciam vislumbrar um exemplo de coevolução do parasita e seu hospedeiro. Como argumento de que a deficiência em G6PD é selecionada positivamente pela malária, citam o fato de que existem mais de 130 variantes conhecidas de G6PD, e pelo menos 34 dessas são polimórficas. Todas as variantes polimórficas são encontradas em populações que vivem (ou viveram) em áreas endêmicas de malária. Salientam que ainda não foi possível explicar duas questões importantes na relação deficiência em G6PD/vantagem seletiva: 1) Como a deficiência em G6PD protege contra o *P. falciparum* e 2) Por que apenas as mulheres heterozigotas são protegidas (havendo um impasse sobre se os homens hemizigotos

são também protegidos)?

Em 1976, Miller *et al.* apresentaram evidências de que o fenótipo nulo de Duffy confere resistência à malária *vivax*, sendo os antígenos Duffy receptores para o segundo estágio de invasão dos eritrócitos pelo *P. vivax* (merozoítas, a forma sanguínea de invasão).

O sistema Duffy – Foi o primeiro grupo sanguíneo a ser determinado a um loco autosômico específico, o cromossomo 1 (Donahue, 1968). Uma forte ligação com alfa-espectrin sugeriu a localização de Duffy (Fy) na banda q21 (McAlpine *et al.*, 1989). A glicoproteína Duffy (Duffy GPP; gpFy) foi identificada primeiramente nos eritrócitos através de aloanticorpos encontrados no soro de um hemofílico politransfundido (Cutbush *et al.*, 1950), que reconheceu o antígeno Fy^a. O antígeno Fy^b foi descrito um ano depois (Ikin *et al.*, 1951). A glicoproteína Duffy é composta por 338 aminoácidos, com peso molecular teórico de 35kD, sendo um receptor de membrana heptahelical (Hadley & Peiper, 1997, para revisão).

Polimorfismo do sistema Duffy e malária – O grupo sanguíneo Duffy é caracterizado por três alelos principais: FY*^A e FY*^B, que diferem em um único nucleotídeo (G131A), havendo troca do aminoácido Gly por Asp no resíduo 44, no N-terminal do domínio extracelular da glicoproteína (Mallison *et al.*, 1995). Os genótipos decorrentes desses alelos codominantes são: FY*^A/FY*^A, FY*^A/FY*^B e FY*^B/FY*^B, respectivamente. A frequência do alelo FY*^A é proporcional à frequência do alelo FY*^B na Europa, chegando a quase 100% na Ásia. O terceiro alelo, FY*^O, corresponde ao fenótipo sorológico Fy(a- b-), isto é, à ausência do antígeno (fenótipo nulo). A maioria dos africanos ocidentais e cerca de 68% dos negros americanos não expressam os antígenos Fy^a ou Fy^b em seus eritrócitos (Mourant *et al.*, 1976). Tournamille *et al.* (1995) encontraram uma mutação no gene Duffy de indivíduos Fy (a-b-) negro que não estava na região codificadora do gene, mas na região promotora *upstream* ao códon metionina de tradução/iniciação. A sequência TTATCT está presente nos alelos A e B, e é uma sequência consenso para ligação com fatores GATA de transcrição. Esta sequência é mutada para TTACCT no fator GATA-1 específico para o eritrócito. Consequentemente, há a inibição do gene no tecido hematopoiético, mas não nos outros tecidos. Parasol *et al.* (1998) descobriram que em alguns casos indivíduos Fy (b-) apresentam o tipo selvagem FY*^B GATA

mas são portadores de uma mutação $271 C \Rightarrow T$, e outra mutação $304 G \Rightarrow A$. Ambas mutações foram identificadas entre os negros brasileiros. A mutação $304 G \Rightarrow A$, que codifica para Ala \Rightarrow Thr, no resíduo 120 de aminoácidos, é uma mutação polimórfica (Neote *et al.*, 1994). De acordo com a estrutura tridimensional do produto do gene Duffy, proposta por Hadley & Peiper (1997), que envolve sete segmentos transmembranares, o aminoácido 102 estaria no segundo segmento transmembranar, e a substituição Ala \Rightarrow Thr poderia levar apenas a uma modesta mudança na propriedade dos receptores. A mutação $271 C \Rightarrow T$, por outro lado, converte o resíduo 91, possivelmente situado no primeiro *loop* citoplasmático, de Arg \Rightarrow Cys, o que representa uma mudança considerável na natureza química da região. Isto pode afetar o comportamento do receptor Duffy e seus sítios antigênicos extracelulares. Houve discrepância entre os fenótipos (nulo) e genótipo (FY*B), sugerindo uma associação com o gene silencioso FY*B nas células eritrocitárias. O fenótipo nulo inicialmente estava associado apenas ao alelo FY*B. Zimmerman *et al.* (1999) descreveram a mesma transição ($46 T \Rightarrow C$) no GATA box associada ao alelo FY*A, mutação que leva a fenótipo nulo (FY*A^{nulo}), numa população de Papua, Nova Guiné, sugerindo que a emergência do alelo FY*A^{nulo} nesta população está envolvida com seleção do polimorfismo eritrocitário: ao contrário da fixação do alelo FY*B^{nulo}, na ausência de *P. vivax* na África ocidental, a aparente recente emergência do FY*A^{nulo} naquela população da Nova Guiné cria a oportunidade de se estudar o significado desta mutação para a suscetibilidade à infecção à malária e à morbidade clínica. Está bem demonstrado que Duffy-negativo explica claramente resistência a merozoítas de *P. vivax*, mas pouco se conhece a respeito dos fatores que contribuíram para a fixação do alelo B-nulo em populações africanas etnicamente diversas. Livingstone (1984) discutiu o aparente paradoxo sobre a existência de alta frequência do alelo FY*B^{nulo} (às vezes atingindo 100%, em algumas populações) em áreas em que não existe malária *vivax*. Foram propostas algumas hipóteses e a mais provável é a adaptação do *P. vivax* a climas temperados e à alta frequência preexistente do alelo nulo, impedindo que a malária *vivax* se tornasse endêmica na África ocidental. Hamblin & Di Rienzo (2000) centraram seus estudos numa população subsaariana da África, em que o alelo nulo está virtualmente fixado, analisando

a variação existente ao redor da mutação na região promotora GATA. Para suas análises, assumiram que a própria mutação FY*0 foi o alvo da seleção, e não um gene vizinho a ele. O valor F(ST) de Wright para o alelo FY*0 é o mais alto de qualquer polimorfismo humano (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994), o que é uma evidência de seleção no loco FY. Para caracterizar a ação (assinatura) de seleção direcional neste loco, Hamblin & Di Rienzo escanearam a variação de sequência de DNA, tanto na região 1,9kb centrada no sítio da mutação FY*O, como nas regiões de 1kb a 5-6 kb distantes do sítio, em 17 italianos (34 cromossomos) e 24 indivíduos (48 cromossomos) de cinco regiões subsaarianas da África. Ainda que a variabilidade encontrada na população africana apresentasse ao redor de 50% mais diversidade genética do que a encontrada em europeus, a região Duffy foi 2-3 vezes mais variável nos italianos que nos africanos. Como um todo, a população africana desviou-se significativamente do esperado por ação neutra na fixação do gene. Mas os autores não puderam identificar se esse fato foi devido à recombinação, mutação recorrente, estrutura da população, e/ou acúmulo de mutação, e deriva. Mesmo não sendo possível distinguir entre essas hipóteses alternativas, concluiu-se que, provavelmente, os dois maiores haplótipos ocorridos em 3 das 5 populações africanas, e que continham o alelo nulo, originaram-se antes da operação da seleção na mutação FY*nulo. Alguns brancos expressam quantidades reduzidas ou fracas de Fy^b (Hadley & Peiper, 1997, para revisão), cujas bases genéticas ainda são incertas.

DARC – Eritrócitos que apresentam o fenótipo Duffy nulo não são capazes de se ligar a Interleucina-8 (IL-8). Evidências experimentais, como: 1 – ligação mínima ou nula de IL-8 a eritrócitos Duffy negativo; 2 – um anticorpo monoclonal ao antígeno do grupo sanguíneo Duffy bloqueando a ligação de IL-8 e outras quimiocinas a eritrócitos Duffy positivo, levaram Horuk *et al.* (1993) a identificar a gpFy como um receptor de quimiocina, passando o loco a se chamar Antígeno Duffy para Receptor de Quimiocina (DARC, em inglês). Invasão celular pelo parasita consiste de múltiplos passos, que incluem reconhecimento, reorientação para deixar o fim apical do parasita em contato com o eritrócito, uma junção parasita/hospedeiro e a entrada no vacúolo criado pelo parasita. Há muitos receptores envolvidos nestes estágios. GP Duffy é um receptor promíscuo,

uma vez que se liga não só ao *P. vivax*, mas também a várias quimiocinas tanto do grupo C-C (RANTES, MCP-1) como C-X-C (IL-8, MGSA/gro) (Neote *et al.*, 1994). Isto é uma indicação de que existem outras funções para a glicoproteína Duffy, que não meramente evitar a invasão pelo *P. vivax*. O papel fisiológico preciso deste receptor, tanto em condições normais como patológicas, ainda é incerto. A proteína Duffy não se encontra exclusivamente nos eritrócitos, sendo também encontrada nos rins, baço e fígado fetal (Chaudhuri *et al.*, 1995). Em *P. vivax*, o ligante merozoíta que interage com DARC foi identificado como a Duffy binding protein (DBP), por Wertheimer & Barnwell (1989). É uma proteína de 140kD codificada por uma cópia simples de gene. Análises experimentais demonstraram que DBP, um peptídeo de 34 aminoácidos, apresenta um domínio extracelular rico em cisteína (região II), que é a região do parasita que se liga ao antígeno do grupo sanguíneo Duffy no eritrócito humano (Chitnis & Miller, 1994). Análises moleculares indicaram que as proteínas de ligação dos parasitas *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. falciparum* possuem regiões de homologia (Adams *et al.*, 1992). Os merozoítas de *P. vivax* invadem preferencialmente os reticulócitos, através de receptores que não foram ainda caracterizados (ver Wertheimer & Barnwell, 1989, para revisão).

Genética molecular funcional de *Plasmodium*

Os estudos de genética molecular de plasmódios datam do início da década de 1980, quando a equipe da New York University Medical School conseguiu, pela primeira vez, clonar e expressar seqüências gênicas correspondendo à proteína Circum-Sporozoíta (CSP), identificada como tendo capacidade vacinal em malária (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989). A partir dos anos 1980, numerosos laboratórios desenvolveram pesquisas de clonagem molecular de genes codificando diferentes antígenos. Em 1995 foram desenvolvidas técnicas de transformação estável de parasitas de malária de roedores (van Dijk *et al.*, 1995), estendidas em seguida a *Plasmodium falciparum* (Crabb & Cowman, 1996; Wu *et al.*, 1996). Usam-se plasmídeos "navete" contendo promotores bacterianos e do parasita, com seqüências gênicas de plasmódio e marcadores que permitem identificar os parasitas transfectados por eletroporação. Servem como marcadores selecionáveis o

gene de dihidrofolato redutase com mutação de resistência ao antifólico WR99210 (Fidock & Wellem, 1997) ou o gene da puromicina-N-acetil transferase que confere resistência à puromicina (de Koning *et al.*, 2001). Com tais vetores, tem-se obtido a transformação estável de parasitas para estudos funcionais por inativação (*knock out*) de genes, por substituição de parte ou totalidade de genes parasitários (recombinação homóloga) e por testes de complementação. A partir de 1995, por iniciativa da fundação Wellcome, foi desenvolvido um programa de clonagem do genoma completo dos 14 cromossomos de *Plasmodium falciparum* envolvendo vários laboratórios europeus e americanos. Seqüências completas dos cromossomos 2 e 3 (Gardner *et al.*, 1998; Bowman *et al.*, 1999) foram já publicadas e espera-se para o fim do corrente ano a publicação da seqüência completa do genoma de *P. falciparum*. Pode-se já consultar databank no sítio web de David Roos (<http://www.plasmodb.org>) no que se refere ao total de EST (expressed sequence tags) identificados. Passaremos assim, em relação a *P. falciparum* a uma fase que pode ser qualificada de pós-genômica, em que os pesquisadores se dedicarão a identificar funções dos diferentes genes já seqüenciados. *Plasmodium vivax*, que pela sua área de incidência interessa principalmente à América do Sul e áreas do Pacífico, provoca infecção menos grave, raramente mortal e tem merecido menores investimentos de pesquisa (del Portillo *et al.*, 2001). Pesquisas sobre genômica funcional têm-se concentrado particularmente em *P. falciparum* e nas seguintes áreas: 1) análises funcionais de genes codificando antígenos candidatos a vacinas; 2) análises de genes responsáveis pela resistência a drogas; 3) estudos de genes relacionados com a patogênica de plasmódios e mecanismos de escape às reações imunes.

Análise funcional de genes codificando antígenos candidatos a vacinas

Não é objetivo do presente trabalho rever a abundante literatura sobre vacinas antimaláricas que podem ser encontradas em excelentes revisões recentes (Engers & Godal, 1998; Holder *et al.*, 1999; Doolan & Hoffmann, 2001). Iremos aqui apenas selecionar alguns exemplos de estudos funcionais sobre as proteínas antigênicas. Assim, a equipe da New York University, usando parasitas de roedor, obteve a inativação do gene codificando a proteína CSP (*cir-*

cum sporozoita) e a do gene codificando a proteína TRAP (trombospondin related antigen protein), ambas identificadas como proteínas da membrana dos esporozoítas e propostas como bases de vacinas. A inativação do gene da CSP não perturbou o desenvolvimento do ciclo sexuado até a formação do oocisto no tubo digestivo do anofelino, mas demonstrou que o gene é essencial para a morfogenese de esporozoítas. A inativação do gene *trap*, ao contrário, não afetou a morfogênese do esporozoíta, mas alterou profundamente sua motilidade, e os esporozoítas mutantes mostraram-se incapazes de penetrar a glândula salivar do anofelino (Nussenzweig *et al.*, 1997; 2001).

Os mecanismos de adesão e penetração dos merozoítas nos glóbulos vermelhos vêm sendo estudados em uma série de trabalhos. Entre as diversas proteínas que foram relacionadas com esses processos e propostas como candidatos vacinais estão as proteínas MSP (Merozoíta surface protein 1, 2 e 3) em *P. falciparum* (revisão em Holder *et al.*, 2000) e a MSP-1 em *P. vivax* (Perera *et al.*, 1998). Experiências de transfeção com objetivo de inativar o gene MSP 1 de *P. falciparum* indicam que este gene é essencial, assim como outra proteína relacionada com a invasão, o antígeno AMA (apical membrane antigen). Experiências da equipe australiana mostraram a possibilidade de substituir o gene *ama* de *P. falciparum* pelo correspondente de *P. chabaudi*, resultando em parasitas com capacidade complementada a 30% para a invasão de glóbulos humanos e eficiente capacidade de invasão de glóbulos vermelhos de camundongo (Triglia *et al.*, 2000).

Igualmente essenciais parecem ser as funções de proteases intervindo na fase de penetração dos merozoítas. Duas proteases identificadas por Blackman e colaboradores são responsáveis pelo processamento do precursor pro AMA de 83 kDa nas organelas secretoras do merozoíta em duas etapas aos produtos finais solúveis de 44 e 48 kDa (Howell *et al.*, 2001). Outra protease, de tipo subtilisina, descrito em *P. falciparum*, parece ser essencial, pois a inativação do gene correspondente de *P. berghei* tem efeito letal para o parasita. Essa protease é associada ao processamento final do antígeno MSP-1 (Barale *et al.*, 1999) originando o segmento C-terminal de 19kDa ancorado ao merozoíta. O segmento 19 kDa da proteína MSP-1 é considerado candidato vacinal.

Outra proteína vacinal interessante que vem sendo estudada é o antígeno EBA-175

(erythrocyte binding protein), que participa de contato inicial do merozoíta com o eritrócito, ligando-se ao ácido siálico da glicoforina A. A inativação do gene *eba-175* conduziu a resultados inesperados: quando as regiões mediana ou C-terminal citoplasmática da proteína são truncadas, a invasão de glóbulos vermelhos pelos merozoítas mutantes não é afetada. Entretanto, o truncamento da região N terminal, exposta na superfície, abole a capacidade de invadir eritrócitos mas, paradoxalmente, desenvolve uma nova capacidade, a de invadir glóbulos vermelhos tratados por neuraminidase que elimina os radicais siálico da glicoforina. O mutante apresenta uma comutação (*switch*) para uma nova via de invasão de glóbulos vermelhos independente de ácido siálico (Reed *et al.*, 2000). Estudos recentes da equipe de Cowman (Thompson *et al.*, 2001) identificaram um gene codificando uma proteína – EBA-140 – homóloga de EBA-175 e ligando-se igualmente a receptor contendo ácido siálico. Esses resultados, e outros de inativação de genes da família *msp*, indicam um enorme potencial do parasita para expressar vias alternativas de penetração do merozoíta, o que lhe garante grande vantagem para sobreviver à pressão dos fatores imunitários e à heterogeneidade de receptores do hospedeiro. A multiplicidade de vias alternativas não é restrita às funções do merozoíta. Também se apresenta em funções relacionadas com o ciclo sexuado no mosquito. Assim parece suceder com as proteínas P25 e P28 do oocineto, ambas descritas como candidatas à vacina “de bloqueio de transmissão”. Experiências promovendo a inativação de um ou de ambos os genes codificando esses antígenos mostraram que a penetração do oocineto na parede do tubo digestivo do mosquito e sua transformação em oocisto é apenas parcialmente inibida quando um dos genes é inativado, sendo inibida de modo significativo apenas quando ambos os genes são inativados (Tomas *et al.*, 2001).

Genômica funcional da resistência de *Plasmodium falciparum* a drogas

A tremenda capacidade de adaptação dos parasitas da malária, graças à plasticidade de seu genoma, evidencia-se na rapidez com que se desenvolveu, em particular em *P. falciparum*, resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir dos anos 1940, quando as 4 e 8 aminoquinoleínas foram introduzidas, assim como as sulfonamidas, os

antifólicos do tipo pirimetamina e o proguanil. Os estudos moleculares permitiram esclarecer rapidamente a natureza das mutações, provocando a resistência a antifólicos e sulfonamidas, e afetando os genes da dihidrofolato redutase (DHFR) e da dihidro pterato sintase (DHPS) (Cowman *et al.*, 1988). Estudos detalhados nesse sentido foram desenvolvidos em várias áreas da Amazônia brasileira (Vasconcelos *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2001), confirmando os resultados de Cowman *et al.* (1988).

A resistência à cloroquina de *Plasmodium falciparum*, inicialmente observada nos anos 1960 na América do Sul e na Ásia do sudeste, estende-se hoje por todas as regiões endêmicas de *Plasmodium falciparum* nos três continentes e foi assinalada em relação a *Plasmodium vivax* em algumas regiões da Ásia (Wellems & Plowe, 2001).

A identificação de funções genéticas relacionadas com a resistência à cloroquina avançaram nos últimos anos em duas direções: as primeiras correlações estabelecidas indicaram a presença de mutações nos genes *mdr* (multi-drug-resistance). Os genes *mdr* de *P. falciparum* – *pfmdr1* e *pfmdr2* foram identificados por homologia com os genes *mdr* em células tumorais multirresistentes a drogas por mecanismos de efluxo acelerado. Resultados preliminares identificaram a glicoproteína Pgh-1, codificada por *pfmdr1* como moduladora de absorção-secreção da cloroquina em culturas de parasita *in vitro* (Cowman *et al.*, 1991). Alguns estudos de terreno indicaram uma correlação entre certos polimorfismos de *pfmdr1* e resistência à cloroquina (Foote *et al.*, 1990; Nagesha *et al.*, 2001), mas vários outros não mostraram tal correlação. Dúvidas persistem, portanto, sobre o papel de mutações de *mdr* na resistência de *P. falciparum* à cloroquina.

Outra série de estudos conduzidos pela equipe de Wellems, do National Institute of Health, desenvolveu-se em direção diferente: em uma elegante experiência, a equipe realizou um cruzamento, de duas cepas clonais de *P. falciparum*, uma resistente e outra sensível à cloroquina. Fragmentos RFLP codificando 85 proteínas do parasita foram usados como marcadores. Os mosquitos alimentados com as duas cepas infectaram um chimpanzé e deste foram isolados 16 linhagens clonais de *P. falciparum*, 8 cloroquina sensíveis e 8 resistentes. A análise da distribuição dos marcadores revelou que o fenótipo sensível/resistente é regulado por um único locus de 400 kb no cromossoma 7 (Wel-

lems *et al.*, 1991). A utilização de outros marcadores permitiu em seguida reduzir o segmento do locus a 40 kb que, seqüenciado, identificou o gene *Pfcr1* como sendo associado à resistência à cloroquina (Fidock *et al.*, 2000). Um extenso trabalho de seqüenciamento de genes *Pfcr1* de isolados de parasitas naturais de quatro continentes permitiu identificar 10 mutações pontuais associadas ao fenótipo resistente. Entretanto, apenas a mutação no codon 76, com substituição de Lisina (AAA/AAG) por treonina (ACX) mostrou correlação constante com o fenótipo resistente. Além disso só se observou a mutação K76T em isolados com outros dos 9 códons afetados por mutações (Wellems & Plowe, 2001). Estudos na região amazônica confirmam inteiramente a correlação entre a mutação K76T e a resistência à cloroquina (Vieira *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos realizados sobre os genes homólogos a *pfcr1* em isolados de *Plasmodium vivax* resistentes à cloroquina não mostraram nenhuma associação entre resistência à cloroquina *in vivo* e mutações no gene de *P. vivax* (Nomura *et al.*, 2001). Isso indicaria mecanismos diferentes de resistência.

Estudos de genética funcional da virulência de *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum é a espécie mais virulenta de malária, responsável por formas graves, levando com frequência a óbito. Na África, essas formas graves manifestam-se principalmente sob três formas: malária cerebral em crianças, anemia grave em crianças e adultos jovens, e malária da gestante. Pesquisas realizadas em dois laboratórios americanos (NIH e Affymax) e um inglês (Molecular Medicine, Oxford) levaram em 1995 à descoberta dos genes responsáveis pela variação antigênica e pela seqüestração de *Plasmodium falciparum* – os genes *var* – (revisões em Newbold *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2001; Craig & Scherf, 2001). Os genes *var* constituem uma família poligênica de 40 a 50 elementos, distribuídos nos 14 cromossomos do parasita, que codificam as proteínas PfEMP-1 (erythrocyte membrane protein n.1), expostas na superfície do glóbulo vermelho parasitado e responsáveis pela seqüestração de formas evolutivas dos parasitas por adesão e retenção dos mesmos nos capilares pós-venosos. Quando a seqüestração ocorre intensamente em órgãos nobres como o cérebro, o pulmão, o rim ou a placenta, desenvolvem-se patologias graves, sendo particularmente grave

a seqüestração no cérebro, causando malária cerebral. Dois fenômenos de interação dos glóbulos parasitados com estruturas celulares do hospedeiro humano foram identificados na seqüestração: a citoaderência e a formação de rosetas. Ambos os fenômenos dependem da proteína PfEMP-1 e a análise dos genes *var* mostrou a estrutura peculiar dessas proteínas. São proteínas de alto peso molecular (200 a 300 kDa) integradas à membrana do glóbulo parasitado. São extremamente polimórficas, mas guardam certas características comuns, apresentando vários motivos homólogos a proteínas denominadas “Duffy binding proteins” de *P. vivax* e denominados motivos “Duffy binding like” – DBL.

A citoaderência dos glóbulos vermelhos infectados com formas maduras do parasita (trofozoítas e esquizontes) faz-se por interação de motivos DBL da proteína PfEMP-1 com receptores endoteliais, que nada mais são do que adesinas e integrinas, responsáveis por captação de glóbulos brancos nos processos de diapedese da corrente sanguínea para os tecidos. Os receptores bem identificados são ICAM-1 (inter cellular adhesion molecule-1), VCAM (vascular cell adhesion molecule), CD36, CD31 entre outros. Os parasitas adaptaram-se portanto a reconhecer receptores preexistentes para realizar a citoaderência, que representa, para eles, um meio de evitar a passagem pelo baço, onde alterações da membrana celular dos eritrócitos provocaria sua captura e destruição por células fagocitárias. Pesquisas de vários grupos permitiram identificar a região da molécula PfEMP-1 responsável pela especificidade de adesão a um ou outro receptor. Assim, a citoaderência responsável pela seqüestração no cérebro foi identificada como dependendo dos receptores ICAM-1 e dos motivos DBL-b associados ao interdomínio próximo (Smith *et al.*, 2000). A forma grave de malária de gestante é resultante da citoaderência de certas PfEMP-1 contendo motivo particular de DBL-g que reconhece como receptor radicais CSA (condroitin sulfato A) de certas glicoproteínas abundantes na placenta (Buffet *et al.*, 1999). Portanto, a virulência particular de certas infecções de malária falcípara se explicaria, atualmente, pela associação de fatores do hospedeiro humano e do parasita: a expressão induzida de receptores regulados por certas citocinas de um lado e a expressão de certos genes *var* do parasita de outro (Craig & Scherf, 2001). O outro fenômeno que participa da seqüestração é a formação

de rosetas, pela qual glóbulos vermelhos não-parasitados aderem aos glóbulos vermelhos parasitados formando grumos celulares capazes de perturbar a circulação capilar. Certas proteínas PfEMP1, através do motivo DBL-a, reconhecem receptores na superfície dos eritrócitos são que podem ser o fator grupo sanguíneo A, o receptor do complemento (CR1) e CD36 (Chen *et al.*, 1998). Segundo Udomsangpetch *et al.* (1993), a maior suscetibilidade à infecção por *P. falciparum*, em indivíduos portadores do grupo sanguíneo A, do sistema ABO, deve-se a uma taxa de rosetas mais alta que estes indivíduos apresentam.

Registre-se finalmente que foram descritas recentemente famílias poligênicas em *Plasmodium vivax* codificando antígenos variantes com centenas de membros (del Portillo *et al.*, 2001). O significado e funções destes antígenos estão sendo estudados.

Estudos de genômica funcional de vetores anofelinos

Os anofelinos são vetores obrigatórios da malária humana e no interior deles se processa o ciclo sexuado dos plasmódios: amadurecimento dos gametas, fusão e formação do zigoto e do oocineto que atravessa a parede do intestino médio e se transforma em oocisto, onde se formam os esporozoítas, que, após ruptura do oocisto, se dirigem para as glândulas salivares, onde penetram ativamente. A especificidade de relações parasita-mosquito é demonstrada pela existência de anofelinos sensíveis e refratários a infecção por plasmódios. Mesmo em laboratório foram obtidos mutantes refratários de *Anopheles gambiae*, enquanto o tipo selvagem da espécie é o melhor vetor conhecido de malária (Brey *et al.*, 1995). Cada uma das etapas do ciclo evolutivo depende de interações específicas entre estruturas moleculares do parasita e do hospedeiro mosquito. Em particular, o oocineto deve atravessar a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio, enquanto os esporozoítas devem atravessar o epitélio das glândulas salivares. Resulta dessas interações a maior ou menor capacidade vetorial de cada anofelino por cada espécie de *Plasmodium*. Assim os esporozoítas de *P. knowlesi* invadem as glândulas salivares de *Anopheles dirus*, mas não as de *A. freeborni*. Em estudo comparativo de Klein e colaboradores (1991) com seis vetores de *P. falciparum* na Amazônia brasileira, verificou-se que, em relação à competência

vetorial, *A. darlingi* e *A. mediopunctatus* se equivalem e foram superiores em ordem decrescente a *deanorum*, *triannulatus* e *oswaldoi*. Em *A. albicansis*, observou-se a formação de oocistos mas os esporozoítas foram incapazes de invadir as glândulas salivares (Klein *et al.*, 1991). Em estudos recentes, comparando a capacidade vetorial de *A. albimanus* e *A. pseudopunctipennis* pelo *P. vivax*, observou-se que o primeiro é refratário a *P. vivax* de fenotipo VK247 e sensível a *P. vivax* VK210 enquanto o segundo mostra refratoriedade inversa (Gonzales Ceron *et al.*, 2001). Em anofelinos refratários da espécie *A. gambiae*, foi estudada em laboratório a trajetória dos oocinetos formados após ingestão de sangue com gametócitos e observou-se que eles são destruídos e encapsulados por estruturas ricas em melanina. Fenol oxidases de tipo tirosina foram identificados em vários insetos e nos anofelinos refratários como implicados na mielinização e, em estudos recentes, mostrou-se que a regulação do gene da profenoloxidase 1 é regulado pelo hormônio ecdisona (Ahmed *et al.*, 1999). A fenoloxidase se conta portanto entre os fatores imunes do mosquito cuja natureza vem recentemente sendo estudada por grande número de pesquisadores. O objetivo a termo desses estudos é a de produzir mutantes refratários das espécies vetoras de malária, capazes, num segundo tempo, de substituir as populações naturais através do fluxo genético entre populações. Assim, desenvolve-se atualmente um programa internacional de seqüenciamento do genoma de *Anopheles gambiae*. Por outro lado, desenvolvem-se pesquisas para identificar os atores do sistema imune do mosquito relacionados com a refratoriedade. Vários peptídeos com atividade antibacteriana e antiplasmodial têm sido identificados (Vizioli *et al.*, 2001). Um estudo sistemático através de um projeto piloto para identificação de genes é desenvolvido atualmente pela

equipe de Kafatos no Laboratório Europeu de Biologia Molecular (Dimopoulos *et al.*, 2000). Nesse projeto acumulam-se seqüências gênicas expressas no tubo digestivo de mosquito e constroem-se bancos de DNA. Os EST (expressed sequence tags) são analisados em mosquitos controles e mosquitos infectados com bactérias e parasitas da malária para definir seqüências relacionadas com fatores imunitários. Foram assim identificadas até o momento 19 seqüências relacionadas com respostas imunes e elas se encontram em fase de análise. Parecem codificar peptídeos, em geral. Em outra série de estudos, uma biblioteca de *phage display* foi utilizada para identificar receptores do oocineto no intestino médio e de esporozoítas nas glândulas salivares. Identificou-se assim um peptídeo de 12 ácidos aminados que interage com a superfície do epitélio do intestino médio e com o lobo distal das glândulas salivares e que, ao mesmo tempo, inibe a invasão das glândulas salivares por esporozoítas (Ghosh *et al.*, 2001). A interação do peptídeo parece pois definir sítios de interação do parasita e pode ser útil na modificação genética da capacidade vetorial.

Uma via inteiramente diferente vem sendo seguida pelo grupo da Universidade da Califórnia em Irvine. O projeto consiste na produção de mosquitos transgênicos secretando no aparelho digestivo fatores introduzidos por engenharia genética que inibam o desenvolvimento do parasita. Experiências engenhosas foram realizadas no modelo *Aedes - Plasmodium gambiae* com introdução, sob controle, de promotor de mosquito, do gene codificando para cadeias variáveis de anticorpo monoclonal anti-proteína CSP (ciscumsporozoita) de *P. gambiae*. Os resultados dessas experiências são promissoras pois o nível de inibição da colonização da glândula salivar do mosquito transgênico, por esporozoítas, foi considerável (James *et al.*, 1999; Capurro *et al.*, 2000).

Referências bibliográficas

- Adams JH *et al.* 1992. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89:7.085-7.089.
- Ahmed A *et al.* 1999. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoxidasase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (26):14.795-14.800.
- Allison AC 1954. Protection afforded by sickle-cell trait against subtartian malarial infection. *Biochemical Genetics*:153-163.
- Ashley-Koch A, Yang Q & Olney RS 2000. Sick cell hemoglobin (Hb S) allele and sickle cell disease: a huge review. *Amer. J. Epidem.* 51 (9):839-845.
- Barale JC *et al.* 1999. *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(11):6.445-6.450.
- Bowman S *et al.* 1999. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 400:532-538
- Brey PT *et al.* 1995. Tyrosinase-type prophenoloxidase distribution in the alimentary canal of strains of *Anopheles gambiae* refractory and susceptible to *Plasmodium* infection. *Exp. Parasitol.* 80(4):654-664.
- Buffet PA *et al.*, 1999. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placenta infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5.198-5.202.
- Cappadoro M *et al.* 1992. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6Pd)- deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* 92(7):2.527-2.534.
- Capurro ML *et al.* 2000. Virus expressed recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum* infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62:427-433
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P & Piazza A 1994. *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V & Pogo AO 1995. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simias: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 85(3).
- Chen Q *et al.* 1998. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the parasite *P. falciparum*. *J. Exp. Med.* 187:15-23.
- Chitnis CE & Miller LH 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* protein involved in erythrocyte invasion. *J. Exp. Med.* Aug. 1; 180 (2):497-506.
- Cowman AF, Karcz S, Galatis D & Culvenorm JG 1991. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J. Cell Biol.* 113:1.033-1.045.
- Cowman AF *et al.* 1988. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(23):9.109-9.113.
- Crabb BS & Cowman AF 1996. Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(14):7.289-7.294.
- Craig A & Scherf A 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115:129-143.
- Cutbush M, Mollison PL & Parkin DM 1950. A new human blood group. *Nature* 165:188.
- de Koning-Ward TF, Waters AP & Crabb BS 2001. Puromycin-N-acetyltransferase as a selectable marker for *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117(2):155-160.
- de Oliveira CI, Wunderlich G, Levitus G *et al.* 1999. Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Vaccine* 17(23-24):2.959-2.968.
- Deane LM 1992. Os grandes marcos na história do controle da malária no Brasil. *Rev. Soc. Brasil Med. Trop.* 25(supl II): 12-22.
- Deane LM 1988. Malaria studies and control in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 223-230.
- del Portillo HA *et al.* 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 410: 839-842.
- Destro-Bisol G, D'Álloja E, Spedini G, Scatena R, Giardina B & Pascali V 1999a. Brief communication: resistance to *Falciparum* malaria in a-Thalassemia, oxidative stress, and hemoglobin oxidation. *Am. J. Phys. Anthropol.* 109: 269-273.
- Destro-Bisol G, Vienna A, Battaggia C, Paoli G & Spedini G 1999b. Testing a biochemical model of human genetic resistance to *Falciparum* malaria by the analysis of variation at protein and microsatellite loci. *Hum. Biol.* 71(3):315-332.
- Dimopoulos G *et al.* 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune competent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(12): 6.619-6.624.
- Donahue RP, Bias WB, Renwick JH & McKusick VA 1968. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61:949-955.
- Doolan DL & Hoffmann SL 2001. DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the multi-stage malaria DNA vaccine operation. *Int. J. Parasitol.* 31(8):753-762.
- Engers HD & Godal T 1998. Malaria vaccine development. *Parasitol. Today* 14:56-60.
- Feitosa MF *et al.* 2001. A major genetic mechanism involved in resistance to malaria in Western Amazonia. *Genetic Epidemiology*, submetido.
- Fidock DA *et al.* 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell.* 6(4):861-871.
- Fidock D & Wellems T 1997. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites sensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- (USA) 94(20):10.931-10.9366.
- Footo SJ *et al.* 1990. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 345:202-203.
- Funasa 2000. Fundação Nacional de Saúde. Plano de intensificação das ações de controle de malária nos estados da Amazônia Legal, 73p (mimeo).
- Gardner MJ, Tettlin H, Carucci GJ *et al.* 1998 Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 282:1.126-1.132.
- Garrod AE 1931. *The inborn factors in disease. An essay.* Oxford University Press, Oxford, UK.
- Ghosh AK, Ribolla PE & Jacobs-Lorna M 2001. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(23):13.278-13.281.
- Gonzales Ceron L *et al.* 2001. *Plasmodium vivax* ookynet destruction and oocyst development arrest are responsible for Anopheles albimanus resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites. *Exp. Parasitol.* 98(3):152-161.
- Hadley TJ & Peiper SC 1997. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 89(9):3.077-3.091.
- Haldane JBS 1948. The rate of mutations of human genes. Proceedings of the Eighth International Congress of Genetics and Heredity. *Hereditas Suppl.* 35.
- Hamblin MT & Di Rienzo A 2000. Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1.669-1.679.
- Hill AVS *et al.* 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352:595-600.
- Hill AVS *et al.* 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360:434-439.
- Holder AA *et al.* 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia* 41(1-3):409-414
- Horuk R *et al.* 1993. A receptor for a malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 261(5.125):1.182-1.184.
- Howell AS *et al.*, 2001. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J. Bio. Chem.* 276(33):31.311-31.320.
- Ikin EW, Mourant AE, Pettenkoffer JH & Blumenthal G 1951. Discovery of the expected haemagglutinin anti-Fy^b. *Nature* 168:1.077.
- James AA *et al.* 1999. Controlling malaria transmission with genetically-engineered *Plasmodium*-resistant mosquitoes: milestones in a model system. *Parassitologia* 41(1-3):461-471.
- Klein TA, Lima JBP & Tada MS 1991. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(6):598-603.
- Livingstone FB 1984. The Duffy blood groups, *vivax* malaria and malaria selection in human populations: a review. *Hum. Bio.* 56(3):413-425.
- Luzzatto L & Notaro R 2001. Protecting against bad air. *Science* 293:442-443.
- Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M & Anstee DJ 1995. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fy^a/Fy^b antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy (a-b-) phenotype. *Br. J. Haematol.* 90:823-829.
- Marques AC 1987. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol. Today* 3:166-170.
- Marques AC e Gutierrez HC 1993. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. In *Trajetória de um sanitário*, OPAS/OMS, Representação do Brasil editores, Brasília, pp. 38-67.
- McAlpine PJ *et al.* 1989. Mapping the genes for erythrocytic alpha-spectrin 1 (SPTA1) and coagulation factor V (F5). *Cytog. Cell. Genet.* 51:1.042.
- McGuire W *et al.* 1999. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *Journal Infect. Dis.* 179: 287-290.
- Menard R, Sultan AA, Corte C, Altzuler R, van Dijk MR, Janse CJ, Waters AP, Nussenzweig RS & Nussenzweig V 1997. Circumsporozoite protein is required for development of malaria parasite in mosquitoes. *Nature* 385(6614):436-440.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF & McGinniss MH 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy blood group genotype, FyFy. *N. Engl. J. Med.* 295:302-304.
- Modiano D *et al.* 1996a. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in West African sympatric ethnic group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13.206-13.211.
- Modiano D *et al.* 1996b. Different response to *Plasmodium falciparum* in West African sympatric ethnic groups: possible implications for malaria control strategies. *Parassitologia* 41 (1-3):193-197.
- Modiano D *et al.* 2001. The lower susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria of Fulani of Burkina Faso (West Africa) is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:149-152.
- Modiano D *et al.* 2001. Hemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 414:305-308.
- Motta MM, Thathy V, Nussenweig RS & Nussenzweig V 2001. Gene targeting in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113(2): 271-278.
- Mourant AE, Kopec AC & Domaniewska-Sobczak K 1976. The distribution of human groups and other polymorphisms (2^a ed.). Oxford University Press, Londres.
- Nagel RL 1990. Innate resistance to malaria: The intraerythrocytic cycle. *Blood Cells* 16: 321-339.
- Nagesha HS *et al.*, 2001. Mutations in the pfmdr1, dhfr and dhps genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in-vivo drug resistance in West Papua, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95(1): 43-49.
- Neote K, Mak JY, Kolakoski LF & Schall T 1994. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 84 (1): 44-52.
- Newbold C, Craif A, Kyes A *et al.* 1999. *Plasmodium falciparum*: pathogenesis, polymorphism and the infected red cell surface. *Transf. Clinique et biologique* 6: 57-60
- Nogueira PA, Wunderlich G & Pereira da Silva LH 2001. Variant antigens of *Plasmodium falciparum* encoded by the var multigenic family are multifunctional

- macromolecules. *Res. Microbiol.* 152: 141-147.
- Nomura T *et al.* 2001. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J. Infect. Dis.* 183(11): 1.653-1.661.
- Nussenzweig V & Nussenzweig RS 1989. Rationale for the development of a engineered sporozoite malaria vaccine. *Advances Immunol.* 45: 283-334.
- Parasol N, Reid M, Rios M, Castillo L, Harari I & Kosower NS 1998. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood* 92(7):2.237-2.243.
- Perera KL *et al.* 1998. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. *Infect. Immun.* 66(4): 1.500-1.506.
- Pessoa S 1946. *Parasitologia médica.* (1ª ed.). Editora Guanabara, São Paulo.
- Peterson DS, Miller LH & Wellems TE 1995. Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those of erythrocyte-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(15): 7.100-7.104.
- Reed MB *et al.* 2000. Targeted disruption of a erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(13): 7.509-7.514.
- Smith JD *et al.* 2000. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1.766-1.771.
- Soper EL & Wilson DB 1943. *Anopheles gambiae in Brazil, 1930-1940.* Rockefeller Foundation, Nova York, 261p.
- Sultan AA *et al.* 1996. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium sporozoites.* *Cell* 90: 511-522.
- Telen MJ 2000. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Seminars Hematol.* 37 (2):130-132.
- Thompson JK, Triglia T, Reed MB & Cowman AF 2001. A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Mol. Microbiol.* 41(1): 47-58.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G *et al.* 2001. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J.* 20(15): 3.975-3.983.
- Tournamille C, Colin Y, Cartron JP & Le Van Kim C 1995. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nature Genetics* 10, june:224-228.
- Triglia T *et al.* 2000. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol. Microbiol.* 38(4):706-718.
- Udomsangpetch R, Todd J, Carlson J & Greenwood BM 1993. The effect of hemoglobin genotype and ABO blood groups on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(2):149-153.
- Van Dijk MR, Waters AP & Janse CJ 1995. Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science* 268:1.358-1.362.
- Vasconcelos KF *et al.*, 2000. Mutation in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon Region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95(5):721-728.
- Vieira PP *et al.* 2001. Analysis of the PfCRT k76T mutation on *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon Region of Brazil. *J. Inf. Dis.* 183:1.832-1.833.
- Vizioli J *et al.* 2001. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(22):12.630-12.635.
- Wellems TE & Plowe CV 2001. Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.* 184(6): 770-776.
- Wellems TE, Walker-Jonah A & Panton LJ 1991. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(8):3.382-3.386.
- Wertheimer SP & Barnwell JW 1989. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite-like protein. *Exp. Parasitol.* 69:340-350.
- Wu Y, Kirkman LA & Wellems TE 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(3):1.130-1.134
- Zimmerman PA *et al.* 1999. Emergence of FY*A^{null} in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 96(24):13.973-13.977.