

DANILA BLANCO DE CARVALHO

Estudo da associação entre o sistema histo-sangüíneo ABO e a malária não grave por *Plasmodium falciparum* na Amazônia brasileira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

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

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Carvalho, Danila Blanco.

Estudo da associação entre o sistema histo-sangüíneo ABO e a malária não grave por *Plasmodium falciparum* na Amazônia brasileira / Danila Blanco Carvalho . – São José do Rio Preto: [s.n.], 2008.

77 f. ; 17 il. ; 30 cm.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Co-orientador: Luiz Carlos de Mattos

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Malária - Amazônia. 3. *Plasmodium falciparum*
4. Sistema sangüíneo ABO. I. Machado, Ricardo Luiz Dantas. II. Mattos, Luiz Carlos de. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

DANILA BLANCO DE CARVALHO

Estudo da associação entre o sistema histo-sangüíneo ABO e a malária não grave por

***Plasmodium falciparum* na Amazônia brasileira**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini
Professor Doutor
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Irineu Luiz Maia
Professor Doutor
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 16 de maio de 2008

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho

Primeiramente, a minha mãe **Maria Eugênia**, meu pai **Jerônimo** e meus irmãos **Lucas e Túlio**: os “quatro pontos” que formam o plano do meu alicerce.

Ao **Rafael**, pelo amor, paciência, companheirismo e carinho.

A todos os **indivíduos** que contribuíram para essa pesquisa e esperam por uma melhor qualidade de vida.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar, e correr o risco de viver seus sonhos”.

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que dia a dia acompanha e ilumina meus passos, me dando força e percepção para continuar em frente.

A minha mãe Maria Eugênia pelo exemplo de sabedoria, equilíbrio e força.

Ao meu pai Jerônimo pela generosidade e por tanto me ensinar enxergar o próximo e aceitar as diferenças.

Ao meu “irmãozão” Lucas pelo exemplo de inteligência e cultura, além da enorme fidelidade.

Ao Túlio, meu “irmãozinho”, pelo eterno companheirismo, pelo seu exemplo de alegria diante da vida... e pela bolsa do Camaleão.

Não esquecendo, jamais, a pessoa mais linda da família, minha avó Dona Maria, pelo exemplo de vida, de honestidade, e amor.

Ao Rafinha pelo apoio todo o tempo sempre com muito amor, carinho, força e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo uma pessoa que prima pela qualidade, sempre esta disposta a ensinar. Professor, obrigada por acreditar em mim e me dar essa oportunidade, mesmo antes de me conhecer.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Carlos que sempre esteve disposto a me receber, esclarecer minhas dúvidas, a discutir ciência e pesquisar.

Agradeço a todas as pessoas que entraram na minha vida junto com esse trabalho. A começar pelos novos velhos amigos Rodrigo e Heloísa, que desde a primeira palavra tivemos a certeza de que sempre fomos amigos (e isso não tem como explicar).

AGRADECIMENTOS

A Coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP, Profa. Dra. Paula Rahal e Profa. Dra. Eleni Gomes, pelo apoio.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação do IBILCE/UNESP pelo auxílio e atenção dispensados.

A FAMERP por disponibilizar suas dependências para a realização do trabalho prático da dissertação.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

Agradeço ao laboratório CIM/FAMERP, que pelo seu ambiente amigável me trouxe mais do que os estudos, trouxe pessoas que me ajudaram na composição desta dissertação na qual serei sempre grata:

O Prof. Dr. Carlos Cavasini sempre nos alegrando com seu jeito divertido e também sempre disposto a ajudar e ensinar.

A Luciana e Valéria que sempre me “socorreram” e que rompemos as fronteiras do laboratório e nos tornamos realmente amigas.

A Prof.a Dra. Andréa Rossit pelos auxílios em genética.

As minhas amigas de nome Ana Carolina: Carol Musa, farmacêutica e companheira em muitos almoços e a Carol Joazeiro toda meiga e prestativa com um futuro brilhante.

A Wanessa e a tão esperada Luíza, sempre nos fazendo rir e disposta a enfrentar a correria de cabeça erguida.

A Luciane, agradecimento especial por agüentar meu “stress” no final da redação deste trabalho, e por deixar suas coisas de lado e me ajudar na correção final.

Ao Gustavo, agora mestrando, por todo apoio e paciência com minhas referências.

AGRADECIMENTOS

Ao aluno de PIBIC/NPq/FAMERP Alexandre que foi fundamental na realização deste trabalho.

Difícil mencionar aqui todas as pessoas que foram importantes para que eu pudesse concluir essa etapa, os amigos que fazem parte de toda a minha História, não poderiam faltar neste momento.

A Priscileila minha “irmã araraquense” sempre companheira, sincera, amiga, mãe... e junto com a tia Suely, me ajudam a entender os segredos da vida.

A Camila, que está longe mas presente em todos os momentos e me protegendo de tudo.

A Marcela, sempre presente. Junto com toda família Jodas, pessoas que completam a minha família.

A Renata amiga sonhadora, sempre disposta a ajudar a todos, obrigada. Toda a família Tomé Alves e o Rafael, Piá, que sempre me receberam sorridentes e me deram força para vencer essa etapa.

Ao casal que agüentou todos os meus desabafos e sempre me ajudaram a continuar Binha e Serginho obrigado por estarem ao meu lado em todos os momentos e também entenderem a minha ausência.

Hoje sei que com meu mestrado muito aprendi, mas esse aprendizado não foi só científico mas também pessoal, isso devo as pessoas maravilhosas com que trabalhei e convivi nesse período.

Enfim, termino um curso que não é apenas um mestrado, mais sim um sonho realizado!

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Este é tempo de partido,
tempo de homens partidos.

Em vão percorremos volumes,
viajamos e nos colorimos.
A hora pressentida esmigalha-se em pó na rua.
Os homens pedem carne. Fogo. Sapatos.
As leis não bastam. Os lírios não nascem
da lei. Meu nome é tumulto, e escreve-se na pedra.

Visito os fatos, não te encontro.
Onde te ocultas, precária síntese,
penhor de meu sono, luz
dormindo acesa na varanda?
Miúdas certezas de empréstimo, nenhum beijo
sobe ao ombro para contar-me
a cidade dos homens completos.

Calo-me, espero, decifro.
As coisas talvez melhorem.
São tão fortes as coisas!

Mas eu não sou as coisas e me revolto.
Tenho palavras em mim buscando canal,
são roucas e duras,
irritadas, enérgicas,
comprimidas há tanto tempo,
perderam o sentido, apenas querem explodir”.

Nosso Tempo
Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas	
	Lista de figuras	
	Lista de quadros	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1.	Introdução	1
1.1.	Aspectos da malária	2
1.1.1.	Processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos de plasmódios humanos	6
1.1.2.	Características clínicas da malária	10
1.1.2.1.	Malária não Grave por <i>Plasmodium falciparum</i>	10
1.1.2.2.	Malária Grave por <i>Plasmodium falciparum</i>	11
1.2.	Aspectos da composição étnica brasileira	12
1.3.	Sistema de grupos sangüíneos	13
1.3.1.	O sistema sangüíneo ABO	13
1.3.2.	Sistema sangüíneo ABO e doenças infecto-parasitárias	20
1.3.2.1.	Sistema histo-sangüíneo ABO e malária	22
1.4.	Justificativa	25
1.4.1.	Hipótese	26
2.	Objetivos	28
2.1.	Geral	29
2.2.	Específicos	29

3.	Materiais e métodos	30
3.1.	Áreas de estudo	31
3.2.	Amostras	32
3.2.1.	Caracterização fenotípica do sistema histo-sangüíneo ABO	33
3.2.2.	Caracterização de exposição a doença e infectividade dos doadores de sangue pelo <i>Plasmodium falciparum</i>	33
3.3.	Aspectos Éticos	34
3.4.	Análise laboratorial	34
3.4.1	Extração de DNA	34
3.4.2.	Genotipagem do sistema histo-sangüíneo ABO	35
3.4.3.	Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP)	37
3.4.4.	Visualização dos padrões de bandas obtidos após PCR-RFLP	39
3.5.	Análise estatística	39
4.	Resultados	41
4.1.	Perfis de bandas encontradas com o RFLP dos polimorfismos do sistema histo-sangüíneo ABO.	42
4.2.	Distribuição genotípica e alélica do sistema histo-sangüíneo ABO	42
4.3.	Histórico de malária e a freqüência do sistema sangüíneo ABO	46
5.	Discussão	49
6.	Conclusão	60
7.	Referências bibliográficas:	62

8.	Anexos	72
-----------	---------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM:	Centro de Investigação de Microrganismos
CSP:	Proteína Circunsporozoítica
DARC:	Receptor de Antígeno Duffy para Quimiocinas
EBL:	Proteína ligante de eritrócito
FAMERP:	Faculdade de Medicina de Rio Preto
Hb:	Hemoglobina
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBILCE:	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
MSP:	Proteína de Superfície do Merozoíto
Pb:	pares de base
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
PfEBP:	Proteína ligante de eritrócito do <i>P. falciparum</i>
PvDBP:	Proteína Ligante Duffy do <i>P. vivax</i> .
PvRBP:	Proteína ligante de reticulócito do <i>P. vivax</i>
RFLP:	do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo no Tamanho do Fragmento de Restrição
sABO:	Sistema histo-sangüíneo ABO
SIVEP:	Secretaria de Vigilância em Saúde
SP:	Substância Precursora
UNESP:	Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição anual dos registros de casos de malária na Amazônia Legal nos anos de 1999 – 2006.	3
Figura 2	Distribuição mensal dos registros de casos de malária na Amazônia Legal nos anos de 1999 -2006.	4
Figura 3	Ciclo biológico do <i>Plasmodium spp.</i>	7
Figura 4	Etapas da entrada do merozoíto na hemácia.	9
Figura 5	Representação esquemática da síntese dos antígenos eritrocitários do sABO.	16
Figura 6	Comparação entre os nucleotídeos dos alelos <i>ABO*A</i> , <i>ABO*B</i> e <i>ABO*O</i> do gene <i>ABO</i> .	18
Figura 7	Comparação parcial entre as seqüências alélicas de <i>ABO*A01</i> , <i>ABO*A02</i> , <i>ABO*O01</i> , <i>ABO*O1v</i> e <i>ABO*O02</i> do gene <i>ABO</i> .	19
Figura 8	Representação esquemática dos pares de <i>primers</i> que amplificam os segmentos que concentram as diferenças de nucleotídeos entre os principais alelos do <i>gene ABO</i> .	36
Figura 9	Representação esquemática dos locais de reconhecimento das enzimas de restrição que diferenciam os alelos <i>A</i> , <i>B</i> , <i>O1</i> , <i>O1v</i> e <i>O2</i> do <i>gene ABO</i> .	38
Figura 10	Fragmentos encontrados na digestão do 1º PCR com a enzima <i>Kpn I</i> em gel de agarose 2%.	43
Figura 11	Fragmentos encontrados na digestão do 2º PCR com a enzima <i>Nar I</i> em gel de poliacrilamida 12,5%.	44
Figura 12	Fragmentos encontrados na digestão do 3º PCR com a enzima <i>Alu I</i> em gel de poliacrilamida 12,5%.	45

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Distribuição percentual dos fenótipos do sistema histo- 21
sangüíneo ABO distribuídos por localidade e etnia.
- Quadro 2** Relação entre grupos histo-sangüíneo ABO e doenças 23
infectoparasitárias.
- Quadro 3** Prevalência do Grupo O, do Grupo A e dos Grupos não-O 27
em regiões endêmicas no passado ou atuais.

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Comparação entre os resultados das frequências genotípicas e alélicas do sistema histo-sangüíneo ABO em pacientes infectados pelo *Plasmodium falciparum* e doadores de sangue não-maláricos na Amazônia Brasileira **47**
- Tabela 2** Associação entre grupo sangüíneo ABO determinado e o histórico de malária dos indivíduos infectados pelo *P. falciparum* **48**
-

RESUMO

RESUMO

O sistema sangüíneo ABO (sABO) é o mais importante sistema na compatibilidade de grupos sangüíneos. Muitas pesquisas têm mostrado associações deste sistema com várias doenças infecciosas, inclusive a malária. Este estudo avaliou a associação entre os genótipos do sistema histo-sangüíneo ABO e a malária não grave causada pelo *Plasmodium falciparum*. A genotipagem dos grupos sangüíneos do sistema ABO foi feita de acordo com o protocolo de PCR/ RFLP, em amostras de indivíduos maláricos e não maláricos de áreas da Amazônia brasileira. O genótipo homozigoto *ABO*001001* foi prevalente tanto nos maláricos quanto nos doadores de sangue. O genótipo *ABO*AB* representou cerca de 3% da população infectada e 5% da não infectada. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes na comparação das freqüências alélicas e genótípicas do sABO entre pacientes e grupo controle, mesmo quando foram analisados apenas indivíduos com infecções puras de *P. falciparum*. A freqüência do sABO na Amazônia brasileira pode estar relacionada com a baixa freqüência de malária grave pelo *P. falciparum*. Portanto, os genótipos encontrados no sistema ABO dos indivíduos maláricos e não maláricos pode promover relevantes informações, para o entendimento da epidemiologia da malária grave por *P. falciparum* na Amazônia brasileira.

Palavras chaves: Malária; sistema sangüíneo ABO; *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

ABSTRACT

The ABO blood system (sABO) is the most important system on the blood groups compatibility. Several studies have shown its associations with various infectious diseases, including malaria. This study evaluated the association between the ABO histo-blood genotypes and non-severe malaria caused by *Plasmodium falciparum*. PCR/RFLP protocol had be used for both ABO blood group system genotyping in malaria suffering individuals and blood donors, from malaria areas of the Brazilian Amazon. The homozygous genotype *ABO*O01O01* was prevalent in both malaria and the blood donors. The genotype *ABO*AB* represented about 3% of the infected population and 5% of non-infected. No statistically significant differences were observed in sABO genotypic and allelic frequencies of patients and the control group, even when individuals were analyzed only with pure infection of *P. falciparum*. The frequency of sABO in the Brazilian Amazon may be related to the low frequency of non-severe malaria *P. falciparum*. Therefore, the genotypes found in the ABO blood system in malaric and non-malaric individuals can promote relevant information for the understanding of the severe malaria by *P. falciparum* epidemiology in the Brazilian Amazon.

Keywords: Malaria; ABO blood group system; *Plasmodium falciparum*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da Malária

Malária é uma infecção de manifestação principalmente aguda, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Caracteriza-se clinicamente por ciclos de calafrios, febre alta, sudorese excessiva incapacita e mata mais pessoas que qualquer outra doença parasitária no mundo (Henry, 1999). Possui, portanto, distribuição global, ocorrendo em mais de noventa países ou territórios. A grande maioria dos casos localiza-se na região da África Subsaariana, enquanto aproximadamente 10% deles na Ásia e nas Américas. Dois terços da malária das Américas ocorrem na Bacia Amazônica devido, principalmente, a processos de mineração, desmatamento e colonização inadequada da floresta. No Brasil, atinge os sete Estados da região Norte e parte dos Estados do Maranhão e do Mato Grosso (Henry, 1999; Sherman, 1998).

Em 2005, na Amazônia brasileira, mais de 600 mil casos foram notificados (Figura 1 e 2). Nos dois primeiros meses de 2006, mais de 82 mil pessoas foram acometidas pela doença, tendo ocorrido quase 2 mil internações, sendo os Estados do Amazonas, do Pará e de Rondônia os mais atingidos. O Estado do Acre, que antes não era incluído nesse grupo, tem apresentado um número crescente de casos e registrou uma incidência de quase 20 mil casos no primeiro bimestre de 2006 (SIVEP, 2006).

Quatro espécies de *Plasmodium* são os agentes etiológicos da malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. A infecção por *P. falciparum* ocorre principalmente em áreas tropicais e, atualmente, essa espécie é responsável por 20% dos casos de



Figura 1: Distribuição anual dos registros de casos de malária na Amazônia Legal nos anos de 1999 - 2006 (SIVEP, 2006).

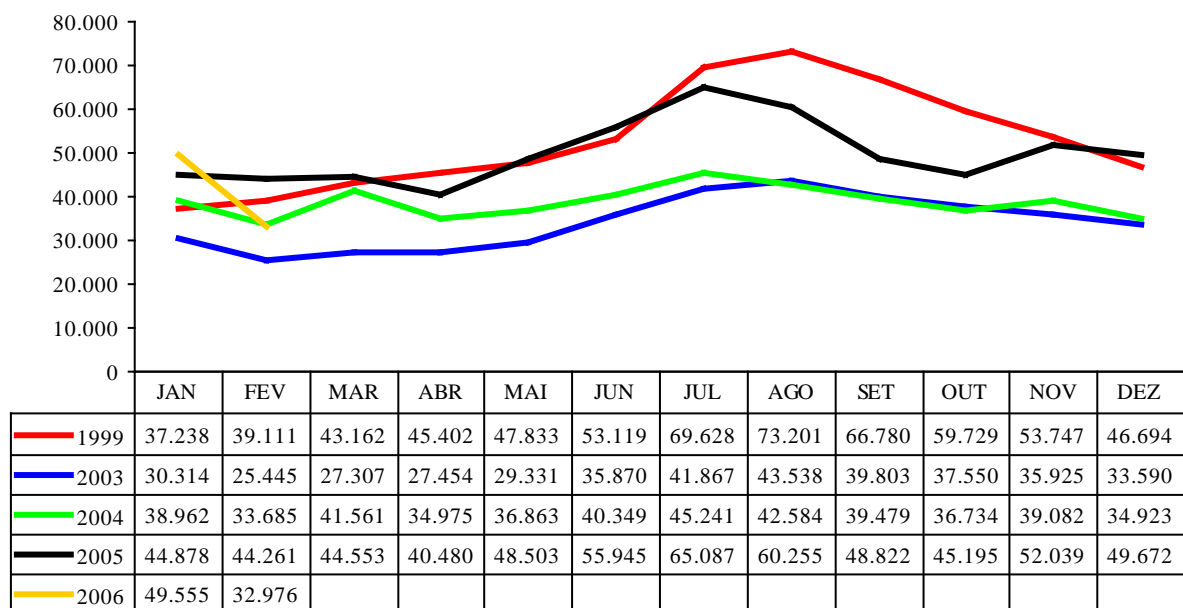


Figura 2: Distribuição mensal dos registros de casos de malária na Amazônia Legal nos anos de 1999 -2006 (SIVEP, 2006).

malária da Região Amazônica (Sherman, 1998; Secretaria De Vigilância Em Saúde, 2006; Cserti & Dzik, 2007). Este parasito induz, durante seu desenvolvimento esquizogônico sangüíneo, modificações na superfície da hemácia parasitada, denominada de *Knobs*. Essas deformações provocam uma citoaderência endotelial, bem como um fenômeno chamado de “rosetas”, ou seja, aderência entre eritrócitos parasitados e não parasitados. Esses fenômenos podem ocorrer nos capilares profundos de diversos órgãos, tais como coração, pulmão, rins, fígado entre outros, e é conhecido como malária grave. Quando ocorre no novelo capilar do cérebro, tem-se a forma mais grave da doença, a malária cerebral (Neves, 2002; Cserti & Dzik, 2007). Por outro lado, as outras três espécies de *Plasmodium* provocam formas mais brandas da doença: o *P. vivax* está presente tanto em zonas tropicais quanto em zonas temperadas; o *P. malariae* é encontrado em algumas áreas da África, pouco observado na América do Sul e na Ásia e o *P. falciparum* enquanto o *P. ovale* é o menos freqüente dos plasmódios e situa-se apenas na África e 0,2% na Ásia (Henry, 1999).

O mosquito fêmea do gênero *Anopheles* é o vetor do *Plasmodium* e, por meio da picada do inseto, o parasito é transmitido ao homem (Sherman, 1998). É nesse inseto que ocorre a fase sexuada do ciclo de vida do protozoário conhecida por esporogonia. No hospedeiro vertebrado, o parasito desenvolve seu ciclo assexuado, conhecido por esquizogonia. (Henry, 1999; Sherman, 1998).

O vetor, ao realizar o repasto sangüíneo, ingere os gametócitos presentes na corrente sangüínea. Esses gametócitos maturam-se em macrogametócitos e microgametócitos (feminino e masculino, respectivamente). Após a fusão entre os dois gametócitos, que ocorre no trato gastrintestinal do mosquito, forma-se um novo estágio parasitário, o oocineto. Este migra pela parede do intestino do vetor

e amadurece atingindo a forma de oocisto. Neste estágio parasitário inicia-se o processo de multiplicação esporogônica resultando em milhares de esporozoítos em seu interior. Quando maduro, o oocisto se rompe e libera os esporozoítos que vão para os tecidos das glândulas salivares do mosquito, de onde partem para a injeção na corrente sangüínea do homem no momento da picada (Henry, 1999; Sherman, 1998).

Os esporozoítos, na corrente sangüínea do hospedeiro vertebrado, alcançam os hepatócitos onde se proliferam e formam os esquizontes hepáticos. Quando se rompem, liberam merozoítas que infectarão os eritrócitos do sangue periférico. Nos eritrócitos, os parasitos se desenvolvem em trofozoítas (forma de crescimento) e por esquizogonia vão formar os esquizontes eritrocitários (forma multiplicativa) que liberam merozoítas. Por sua vez, podem reiniciar o ciclo infectivo, atacando novos eritrócitos, ou ainda sofrer diferenciação em gametócitos, permitindo a contaminação de novos vetores invertebrados. Durante esta fase eritrocítica é que ocorrem as principais manifestações clínicas da doença (Henry, 1999; Sherman, 1998) (Figura 3).

1.1.1 Processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos de plasmódios humanos

O processo de invasão é complexo e depende tanto de organelas dos merozoítos (micronemas e roptrias), que excretam proteínas específicas envolvidas nas várias etapas desse evento, quanto de moléculas expressas pela célula hospedeira (Dvorak et al., 1975; Bannister et al., 1975; Aikawa et al., 1978; Miller et al., 1979; Chitmis & Blackman, 2000, Wickramarachchi et al., 2008).

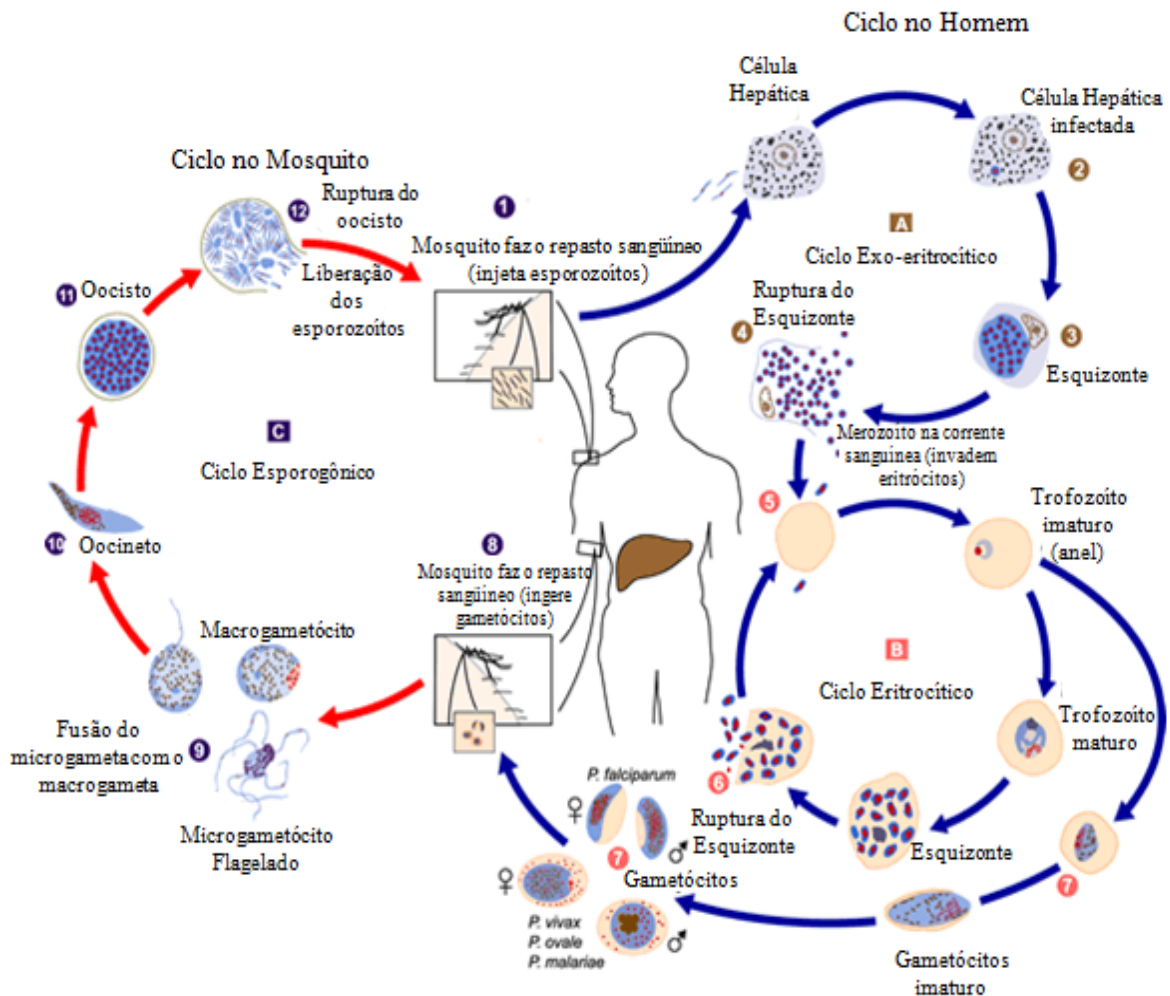


Figura3: Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. Adaptado de: <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-proto.htm>

O contato inicial é aleatório e se dá em qualquer parte da superfície tanto do merozoíto quanto da hemácia. Em seguida, esta forma parasitária se reorienta ativamente, justapondo seu pólo apical em contato com a membrana da hemácia. Para isso utiliza moléculas de adesinas, polimerização/despolimerização de actina e componentes de um complexo de miosina (Fowler et al., 2004). Essas duas primeiras etapas, a de contato e a reorientação, são aparentemente de baixa afinidade e reversíveis, já que permitem ao parasito distinguir um eritrócito competente para a invasão de outros tipos celulares (Cowman & Crabb, 2006). Contudo, a entrada do merozoíto na hemácia ocorre pela ação de proteases, fosfolipases e lipídeos que promovem, no ponto de contato, uma fosforilação que resulta em desarranjo dos componentes estruturais da membrana eritrocitária. Nesse momento, novamente o complexo motor de actina-miosina age para a formação do vacúolo parasitóforo (Fowler et al., 2004), (Figura 4).

As espécies de plasmódio diferem, também, quanto à interação dos merozoítos com as hemácias. Para o *P. vivax*, a formação da junção e a subsequente invasão do merozoíto são mediadas pela interação protéica na superfície da membrana entre uma família de proteínas ligantes conhecidas como Proteína Ligante de Reticulócito do *P. vivax* (PvRBP1 e 2), que se ligam a receptores de reticulócitos para ativar o processo de invasão eritrocitária (Galinsk et al., 1992). Outras proteínas ligantes expressa no merozoíto deste protozoário é a Proteína Ligante de *Duffy* do *P. vivax* (PvDBP) (Fang et al., 1991), essencial para a invasão dos reticulócitos que, por sua vez, expressam em sua superfície um Receptor de Antígeno Duffy para Quimiocinas (DARC) que é receptor da molécula ligante PvDBP (Chaudhuri et al., 1993).

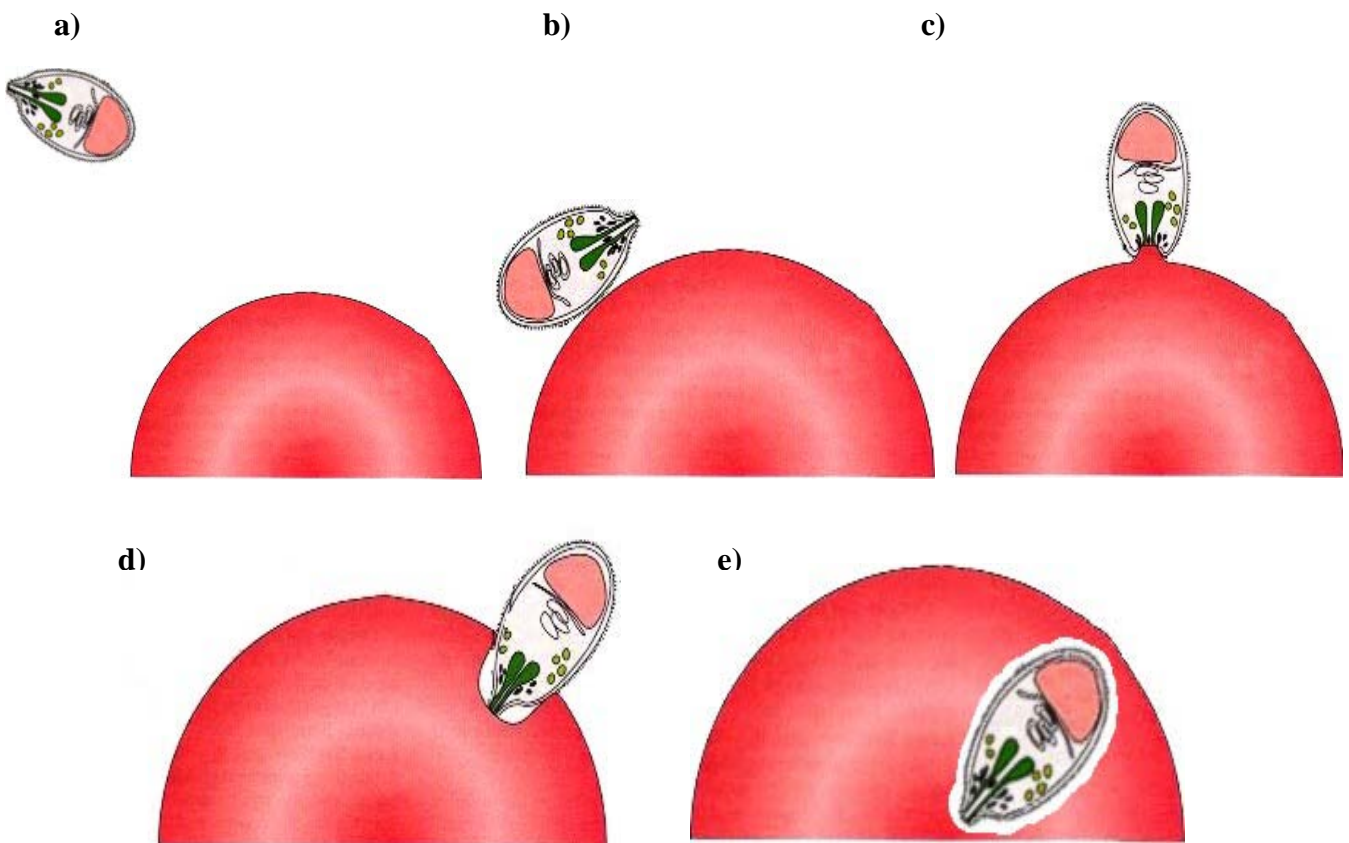


Figura 4: Etapas do processo de adesão e invasão do merozoíto na hemácia. **a)** contato inicial aleatório; **b)** contato em qualquer parte da hemácia ou do merozoíto; **c)** reorientação do merozoíto: pólo apical do parasito em contato direto com a hemácia; **d)** entrada do parasito na célula por meio da ação enzimática; **e)** formação do vacúolo parasitóforo. Adaptado de Chitmis & Blackman (2000).

Já os merozoítos de *P. falciparum* invadem hemácias por meio de múltiplas interações entre proteínas ligantes e receptores. Na sua superfície, diversas moléculas são capazes de exercer o papel de ligantes a receptores eritrocitários (Chitmis & Blackman, 2000). Uma família de proteínas ligantes chamada Proteína Ligante de eritrócito (EBL), composta por EBA-175, BAEBL (EBA-140), JESEBL (EBA-181), EBL-1 e PEBL (EBA-165) é expressa na superfície da membrana dos merozoítos (Pandey et al., 2002). As EBL se ligam às glicoproteínas específicas dos eritrócitos, no início do processo de invasão. O *P.falciparum* pode utilizar diversos receptores presentes na superfície dos eritrócitos para invadi-los, tais como a glicoforina A e a glicoforina B do sistema sangüíneo MNS, (Duraisingh et al., 2003), a glicoforina C o grupo sangüíneo Gerbich (Maier et al., 2003), assim como outros receptores determinados pelo sABO (Cserti & Dzik, 2007).

O *P. falciparum* é capaz de utilizar vias alternativas, mudando o processo de invasão eritrocitária, o que resulta em inúmeras vantagens. A primeira delas é a invasão de eritrócitos em qualquer fase de maturação, diferentemente do *P. vivax*. Outra é a capacidade de evasão do sistema imunológico, uma vez que, para diferentes vias de invasão, diferentes moléculas ligantes do parasito são requisitadas (Dolan et al., 1990).

1.1.2. Características clínicas da malária

1.1.2.1. Malária não Grave por *Plasmodium falciparum*

O período de incubação entre a picada do mosquito e o início dos sintomas dura cerca de oito dias. O paciente apresenta, em seguida, intensa debilidade física, náuseas e vômitos. Após esta fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, e na malária falciparum os ciclos acontecem em 48 horas. Ao exame

físico, o indivíduo apresenta-se pálido e com baço palpável. A anemia é freqüente nesses pacientes e também mais acentuada se comparada a outras espécies de plasmódio. Durante a fase aguda, também é comum o aparecimento de herpes labial (Kirchgatter & Del Portillo, 2005). Em áreas endêmicas é comum o aparecimento de um quadro crônico no qual é observado esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e plaquetopenia. Estes aspectos são comuns entre as espécies do parasito que infectam o homem (Menendez, et al., 2000).

1.1.2. Malária Grave por *Plasmodium falciparum*

A malária grave é definida como uma infecção com manifestações e complicações potencialmente fatal ao Homem (Kirchgatter & Del Portillo, 2005). Essas complicações são conseqüências da obstrução de capilares sanguíneos pelas formações em rosetas provocadas pelo *P. falciparum* (Cserti & Dzik, 2007). A hipoglicemia, o aparecimento de convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbio de consciência indicadores de pior diagnóstico e podem pertencer as formas graves da doença (Kirchgatter & Del Portillo, 2005).

A disfunção cerebral é, em muitas partes do mundo, a mais comum manifestação de malária grave por *P. falciparum* e a principal causa de morte em adultos com a forma grave da doença. A obstrução dos capilares cerebrais provoca convulsão generalizada e coma podendo levar o paciente a óbito. Os principais sintomas são forte cefaléia, hipertermia, vômitos e sonolências (Kirchgatter & Del Portillo, 2005).

O edema pulmonar é também uma complicação fatal e apresenta edema intersticial com células endoteliais intumescidas e poucos monócitos no lúmen capilar. As formas mais graves caracterizam-se por intensa transudação alveolar,

com grave redução da pressão arterial de oxigênio (Neves, 2002; Kirchgatter & Del Portillo, 2005).

Outra complicação importante da malária é a falência renal e é definida com um aumento de creatinina plasmática, de uréia no sangue e da redução do volume urinário. Metade dos paciente com falência renal apresenta também edema pulmonar (Kirchgatter & Del Portillo, 2005). Os pacientes com a forma grave apresentam anemia, neutropenia, hipoglicemia, icterícia e hemoglobinúria (Neves, 2002; Kirchgatter & Del Portillo, 2005).

1.2. Aspectos da Composição Étnica Brasileira

Território originalmente indígena, o Brasil sofreu, ao longo de sua História, influência tanto cultural quanto étnica de vários povos. Começando pela colonização portuguesa, passando pelo tráfico negreiro, pelos italianos e espanhóis nas lavouras de café e comerciantes asiáticos, o Brasil se tornou um país altamente miscigenado. (Callegari-Jacques et al., 2003). Considerando que esses povos não se distribuíram homoganeamente pelo território, variando o número de indivíduos que compuseram o estoque genético de cada grupamento étnico parental em cada região, as diferenças regionais ficam mais evidentes. Por exemplo, a região Norte é que exibe a maior contribuição ameríndia, enquanto que o Sul apresenta a maior proporção de caucasóides do país (Carvalho-Silva et al., 2001). O padrão regional de miscigenação foi consideravelmente alterado pelas correntes de migração interna (Novaretti et al., 2000; Guerreiro et al., 1988).

Assim, considerando-se que os genes determinantes dos diferentes grupos sanguíneos exibem diferenças étnicas, torna-se imprescindível o estudo de

polimorfismos genéticos em populações de diferentes regiões brasileiras, a fim de caracterizá-las (Novaretti et al., 2000; Guerreiro et al., 1988).

1.3 Sistema de Grupos Sangüíneos

O significado biológico dos polimorfismos de grupos sangüíneos é pouco esclarecido. No entanto, sabe-se que muitos destes têm a função de carregar moléculas antigênicas (proteínas e carboidratos) com importante papel fisiológico, tais como receptores para várias citocinas e outros ligantes (Daniels, 1997). Além disso, esses também podem ser alvos de processos fisiopatológicos, infecções e receptores para microorganismos. Vários estudos propõem ampliar os conhecimentos sobre a correlação entre parasito/hospedeiro, entre elas aquelas nas quais os sistemas sangüíneos influem na interação entre o plasmódio e o eritrócito. Um dos notáveis casos em que as hemácias são importantes alvos para infecção é a malária (Zelinski et al., 1995).

Dos 29 grupos sangüíneos humanos conhecidos, mais de 20 já tiveram seus genes clonados e as bases moleculares de importantes polimorfismos destes sistemas são agora conhecidas. A maioria dos polimorfismos do sistema sangüíneo é causada por mutações pontuais, resultando na substituição de aminoácidos. Porém, há outros tipos de alterações que incluem deleção gênica, deleção de uma única base ou troca de material genético entre genes homólogos (Daniels, 1997).

1.3.1 O sistema histo-sangüíneo ABO

O sistema histo-sangüíneo ABO (sABO) é um dos mais importantes identificados até hoje. A herança é geneticamente determinada pelos alelos *ABO**

A, ABO^*B e ABO^*O , sendo que ABO^*A e ABO^*B são co-dominantes entre si e dominantes em relação ao ABO^*O . O sABO dos indivíduos é determinado pela presença de um (homozigoto) ou dois (heterozigoto) dos três alelos: ABO^*A , ABO^*B e ABO^*O cujo gene está localizado no cromossomo 9 (9q34.1 e q34.2) (Yamamoto, 2000).

Devido à descrição dos sub-grupos A_1 e A_2 do grupo A, foram acrescentados a esse modelo genético os alelos ABO^*A01 e ABO^*A02 , sendo o ABO^*A01 o alelo selvagem, dominante sobre o ABO^*A02 (Schoroeder & Rayner, 1993; Mattos et al., 2001). O grupo sanguíneo A é determinado pelos genótipos $ABO^*A01 A01$, $ABO^*A01 O$, $ABO^*A01 A02$, $ABO^*A02 A02$ e ABO^*A02O que geram os fenótipos (antígenos nas hemácias) A_1 e A_2 . O grupo B é determinado pelos genótipos ABO^*BB e ABO^*BO , gerando o fenótipo B. O grupo AB é determinado pelos genótipos ABO^*A01B e ABO^*A02B , sendo os seus fenótipos A_1B e A_2B (A + B). Finalmente, o grupo O tem o alelo ABO^*O01 , o selvagem, e também o $ABO^* O1v$ e o ABO^*O02 ; determinando os genótipos $ABO^*O01O01$, $ABO^*O01O1v$, $ABO^*O01O02$, $ABO^*O1vO1v$, $ABO^* O1vO02$ e $ABO^*O02O02$ que determinam fenótipo O (Schoroeder & Rayner, 1993; Mattos et al., 2001; Barjas-Castro et al., 2003).

Os produtos do gene *ABO* não são os antígenos A e B, mas sim glicosiltransferases que modificam a membrana celular e conduzem para síntese dos antígenos A e B. Uma substância precursora (SP) existe como um segmento da cadeia de oligossacarídeos associados aos glicoesfingolípídeos e glicoproteínas da membrana. A conversão desta SP em substância H, precursora imediata dos antígenos A e B, depende dos alelos *H* e *h*, os quais são herdados independentemente do gene *ABO*. O alelo *H* é comum e o *h* é raro. O *H*

determina a presença da enzima transferase H que converte a SP em substância H. A presença de um alelo *ABO**A ou *ABO**B determina a atividade da transferase A ou B correspondente, a qual, em seguida, converte a substância H em antígeno A ou B. A transferase A adiciona uma N-acetilgalactosamina à galactose terminal do tipo I ou II da substância H, e a transferase B participa da adição de uma molécula de galactose para a mesma posição, resultando na diferença estrutural entre essas moléculas, o que determina, assim, a maior diferença entre as hemácias dos grupos A e B (Schoroeder & Rayner, 1993) (Figura 5).

Considerando apenas os alelos selvagens, *ABO**A e *ABO**B, estes diferem entre si pela substituição de sete bases isoladas localizadas nas posições 297, 526, 657, 703, 796, 803, e 930 (Figura 6). No entanto, as diferenças entre as transferases A e B são apenas pelas substituições 526, 703, 796 e 803 que resultam na troca dos aminoácidos nas posições 176, 235, 266 e 268 dessas proteínas. As substituições nas posições 703, 796 e 803 são muito significativas na determinação da especificidade da transferase. Os alelos *ABO**A e *ABO**B, que expressam níveis elevados de antígenos, podem ter mutações adicionais, resultando em enzimas com diferentes habilidades, porém desprezíveis (Daniels, 1995; Yanamoto & Hakomori, 1990).

A seqüência de bases no alelo *ABO**O parece ser similar a do *ABO**A, exceto pela deleção de uma única base na posição 261 da região codificadora do N-terminal da proteína, produzindo uma transferase sem atividade (Figura 6). Assim, dos três alelos do gene *ABO*, apenas dois codificam produtos funcionais (Daniels, 1995; Mattos et al., 2001).

Quanto aos polimorfismos do sABO, sabe-se que o alelo *ABO**A02 difere do *ABO**A01 em duas posições nucleotídicas: 467 e 1059. A primeira consiste

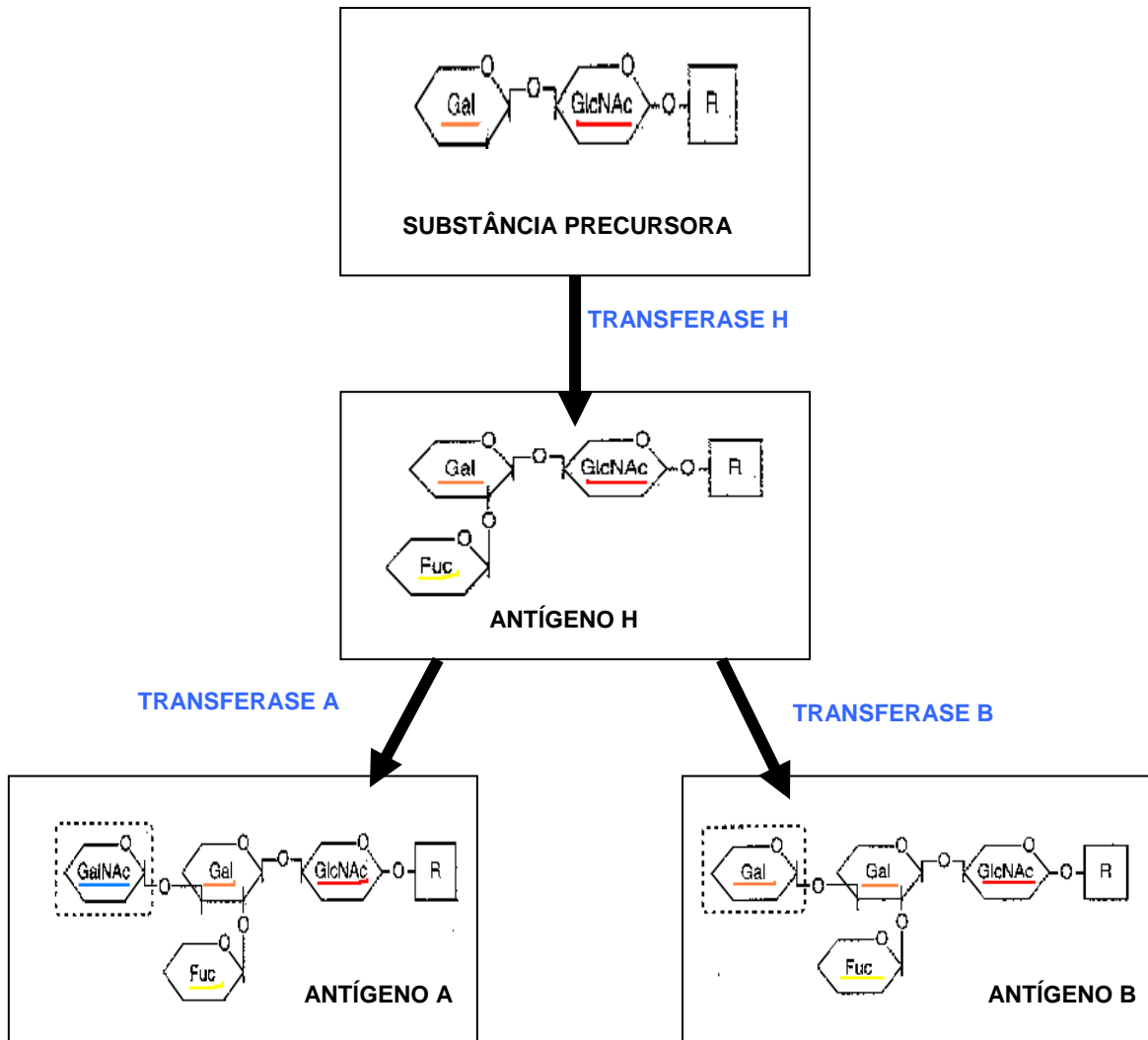


Figura 5: Representação esquemática da síntese dos antígenos eritrocitários do sABO. Modificado de Mattos (2001).

na troca de uma citosina por uma timina, o que resulta na substituição do aminoácido prolina da proteína selvagem por uma leucina na transferase A_2 . Na posição 1059 ocorre deleção de uma citosina que aumenta 21 resíduos de aminoácidos na região carboxi-terminal da transferase A_2 (Yamamoto et al., 1992) (Figura 7).

O alelo ABO^*O02 difere do ABO^*O01 porque possui a guanina na posição 261, como no ABO^*A01 e, ainda, assemelha-se ao alelo ABO^*B no nucleotídeo 526 e ao ABO^*A nas posições 703, 796 e 803 (Yamamoto et al., 1993). E, finalmente, o alelo ABO^*O1v também possui a deleção na posição 261, mas difere do ABO^*O01 em nove nucleotídeos e do ABO^*O02 em quatro. (Mattos et al., 2001) (Figura 7). Os antígenos A, B e H estão localizados na superfície externa da membrana dos eritrócitos. As hemácias do grupo A possuem entre 800 mil a 1 milhão e 200 mil locais antigênicos; as do grupo B, entre 600 a 800 mil e as do grupo AB, de 400 a 600 antígenos A e B. Além disso, todos os tipos sanguíneos expressam as substâncias H, mas a quantidade expressa na superfície da célula varia com os fenótipos ABO, tais como: $O > A_2 > A_2B > B > A_1B > A_1$. Cada célula do grupo O tem aproximadamente 1,7 milhão de antígenos H (Schoroeder & Rayner, 1993).

O antígeno A tem especificidades individuais. Dos indivíduos do grupo A, 80% são A_1 , enquanto que o restante é A_2 e as inúmeras variantes existentes, mas em baixas frequências. Os antígenos A_2 juntamente com outras variantes, reagem muito fracamente com anti-A em relação ao A_1 e, diferentemente de A_1 , eles não reagem com lecitina anti- A_1 preparada da planta *Dolichos biflorus*. Nos indivíduos do grupo A_2B , a expressão A_2 é enfraquecida pela presença do antígeno B. As diferenças bioquímicas entre os antígenos A_1 e A_2 permanecem

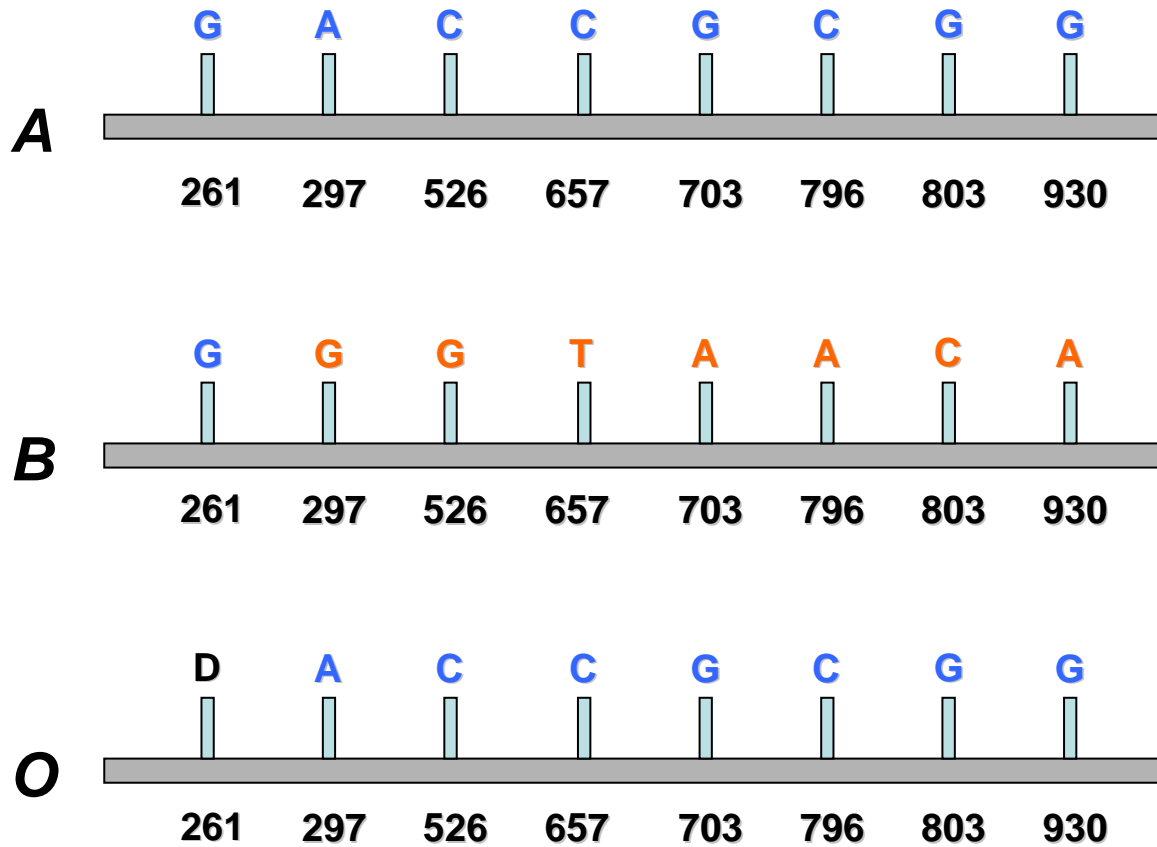


Figura 6: Comparação entre os nucleotídeos dos alelos ABO^*A , ABO^*B e ABO^*O do gene ABO . **D:** Deleção de base nessa posição, em **azul:** Base conservada do alelo selvagem; em **alaranjado:** Base diferente do alelo selvagem. Modificado de Mattos (2001).

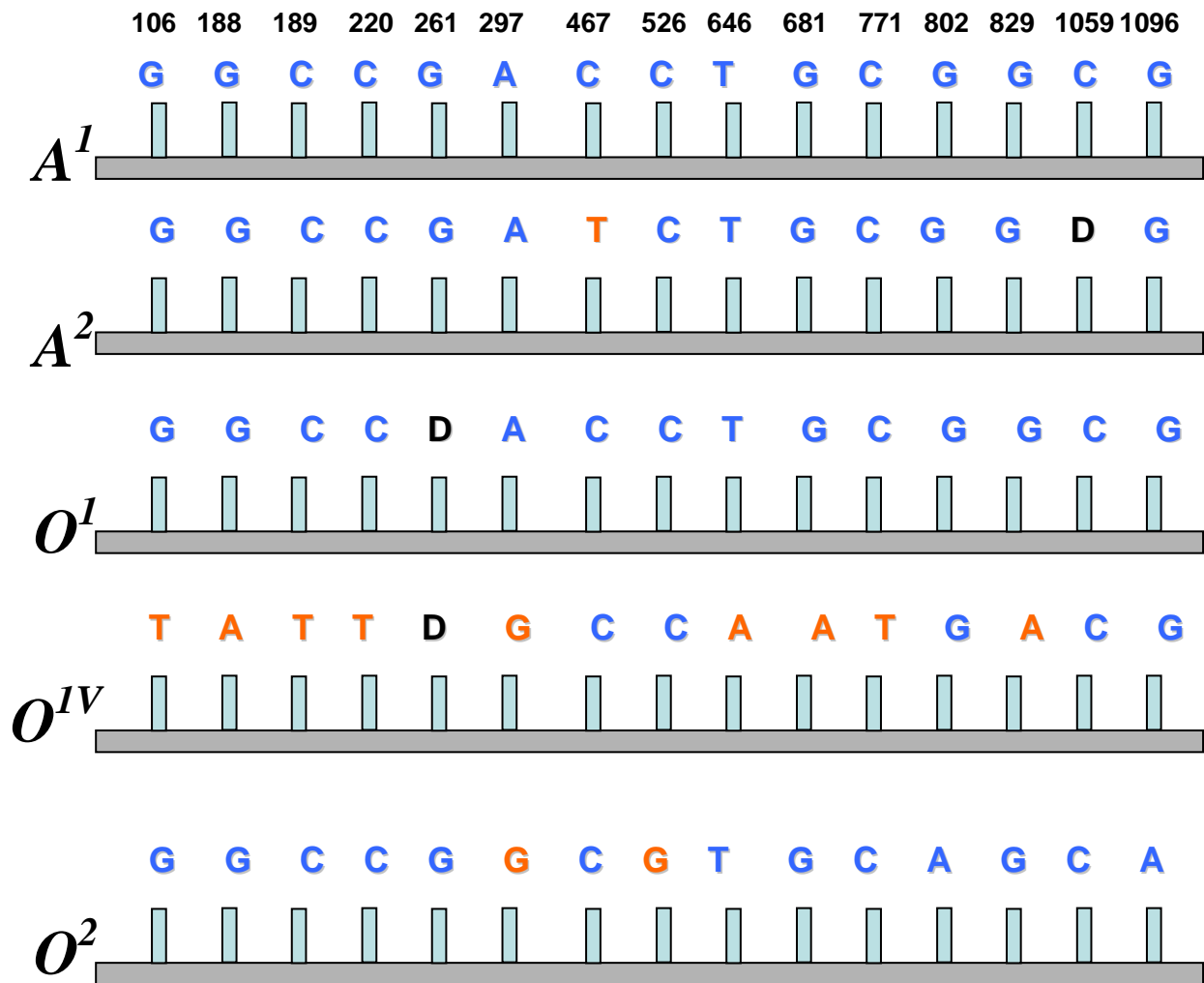


Figura 7: Comparação parcial entre as seqüências alélicas de ABO^*A01 , ABO^*A02 , ABO^*O01 , ABO^*O1v e ABO^*O02 do gene ABO . **D:** Deleção de base nessa posição; em **azul:** Base conservada do alelo selvagem; em **alaranjado:** Base diferente do alelo selvagem. Modificado de Mattos (2001).

incertas. Indivíduos com alelos A_1 e A_2 possuem N-acetilgalctosaminil transferases com diferentes propriedades cinéticas, o número e distribuição dos determinantes do grupo A em suas hemácias também diferem. Além disso, pode haver diferenças qualitativas entre os antígenos A_1 e A_2 , relacionadas ao tipo II de SP envolvida (Schoroeder & Rayner, 1993). Os antígenos do sABO são expressos também em outros tecidos além do sangue, e diferem quantitativamente de um tecido para outro (Perry et al., 2007).

A distribuição deste sistema sangüíneo apresenta grande variabilidade nas diversas populações no mundo, como mostra o Quadro 1.

1.3.2 Sistema histo-sangüíneo ABO e Doenças Infecto-parasitárias

Nos últimos anos, o sABO e seus polimorfismos estão sendo associados a diversas doenças. O grupo O é o mais encontrado em pacientes com úlcera péptica causada pela infecção de *Helicobacter pylori* (Mattos et al., 2002), e já se sabe que o mesmo expressa mais receptores para essa bactéria. Este, em conjunto com o antígeno eritrocitário Lewis^b, também é um mediador na fixação desses microrganismos na mucosa gástrica; aumentando a suscetibilidade à úlcera gástrica (Kanbay et al., 2005). Por outro lado, o câncer gástrico causado pela infecção de *H. pylori* foi associado ao grupo A (Vogel, 1970). Posteriormente, Sharara e colaboradores (2006) encontraram significativa associação entre a expressão da citotoxina associada ao alelo A de indivíduos do grupo A com malignidades gástricas. O grupo O também é relacionado com a diarreia causada pelo *Vibrio cholerae*, ao contrário da diarreia causada por *Escherichia coli*, em que indivíduos do grupo A são mais afetados (Harris et al., 2005). Cabello e colaboradores (1995) observaram um maior risco de infecção por *Leishmania donovani chagasi*

Quadro 1: Distribuição percentual dos fenótipos do sistema histo-sangüíneo ABO distribuídos por localidade e etnia.

		sABO				Referência
		O	A	B	AB	
Localidade e Etnia						
Norte Americanos	Caucasóides	45%	40%	11%	04%	Novaretti et al., 2000
Maharashtra (Índia)	Sem separação por etnia	23%	24%	36%	17%	Pant et al., 1998
São Paulo (Brasil)	Caucasóides	46%	39%	11%	02%	Novaretti et al., 2000
	Miscigenados	53%	29%	13%	03%	
	Afro-descendentes	48%	32%	16%	03%	
Belém - PA (Brasil)	Caucasóides	52%	36%	10%	02%	Guerreiro et al., 1988
	Miscigenados	61%	28%	09%	02%	
	Afro-descendentes	67%	22%	07%	04%	

em indivíduos do grupo A. Ponce de León & Valverde (2003) sugerem que a maior suscetibilidade dos indivíduos A e B ao *Ascaris lumbricoides* é devido à capacidade deste parasito mimetizar os antígenos sanguíneos A e B (Quadro 2).

1.3.2.1 Sistema histo-sangüíneo ABO e Malária

Estudos em áreas endêmicas do mundo, principalmente na África e na Ásia, têm mostrado que existe uma relação entre a malária e o tipo sangüíneo do paciente.

Montoya et al. (1994), realizaram análise do sABO em populações de diferentes grupos étnicos da Colômbia, infectadas por *P. falciparum* e *P. vivax*. Encontraram predominância do grupo O em todas as populações, o que não significa maior risco de infecção para qualquer uma dessas espécies, exceto em indivíduos negróides, nos quais o risco relativo de infecção por *P. vivax* foi mais acentuado. Observaram também, em negróides, risco relativo nos indivíduos dos grupos A e B, portanto, não encontrando relação entre este sistema sangüíneo e a malária. Nas populações miscigenadas, observaram que pessoas do grupo sangüíneo B eram menos freqüentes no grupo de pacientes com malária, especialmente por *P. vivax*. No entanto, esses achados diferem dos estudos de Gupta & Chowdhuri (1977) que observaram em populações da Índia uma alta incidência de malária *vivax* em indivíduos do grupo sangüíneo B, enquanto que infecções por *P. vivax* foram menos freqüentes em indivíduos do grupo A. Mas é importante lembrar que nesta população havia prevalência do grupo B.

No Gâmbia, Barragan e colaboradores (2000) observaram mais formações de rosetas eritrocitárias nos indivíduos do grupo sangüíneo A, com malária por

Quadro 2: Relação entre grupos histo-sangüíneo ABO e doenças infectoparasitárias

Parasito	Doença	Grupo ABO	Referência Bibliográfica
<i>Helicobacter pylori</i>	Úlcera gástrica	Grupo O	Mattos et al., 2002
	Câncer gástrico	Grupo A	Vogel, 1970 e Sharara et al., 2006
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarréia	Grupo O	Harris et al., 2005
<i>Escherichia coli</i>	Diarréia	Grupo A	Harris et al., 2005
<i>Leishmania donovani chagasi</i>	Leishmaniose	Grupo A	Cabello et al., 1995
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascaridíase	Grupo A e B	Ponce de León & Valverde, 2003

P. falciparum que os dos demais grupos. Já foi evidenciado, também, que esse é o tipo sanguíneo mais relatado em pacientes com malária cerebral, principalmente pacientes do subgrupo A₁ (Chung et al., 2005). Além disso, no Zimbábue, esse grupo foi associado aos baixos níveis de hemoglobina em pacientes em coma por malária cerebral e ao maior número de episódios de malária (Udomsangpetch et al., 1989; Udomsangpetch et al. 1993). Por outro lado, estudos *in vitro* com cepas oriundas do Kênia, mostraram maior correlação para a formação de rosetas em pacientes do grupo A e AB, bem como em pacientes do grupo B infectados com cepas da Tailândia (Fischer et al., 1998).

No Brasil, Santos e colaboradores (1983) evidenciaram associação entre o antígeno B e o número de episódios de malária em pacientes de Manaus. Apesar dos resultados pontuarem na mesma direção, Beiguelman et al (2003) não foram capazes de confirmar esta observação, ao avaliar a frequência de indivíduos B e AB de uma população de área rural de Rondônia. Além disso, estudos fenotípicos em diferentes áreas da Amazônia brasileira (Cavasini et al., 2006) e na região central do Sudão (Bayoumi et al., 1986) também não demonstraram correlação entre o sistema sanguíneo ABO e a malária.

Entretanto, Loscertales e colaboradores (2006) estudaram gestantes primíparas infectadas por *P. falciparum*, em uma população africana, e determinaram que os recém-nascidos de mães do grupo O tinham maior peso e tamanho, bem como as placentas eram mais pesadas e com menor carga parasitária, quando se comparou com os de mães dos grupos não-O. Esta demonstração parece falar a favor da pressão biológica à qual o hospedeiro é submetido em seu ambiente. Recentemente, foi demonstrado que a distribuição dos grupos ABO foi estatisticamente diferente em síndrome de malária grave por

P. falciparum. Estes autores concluíram que indivíduos do grupo O tiveram menos malária grave, quando comparados aos não-O e, também, que pacientes do grupo A tiveram três vezes mais malária severa do que os do grupo O (Chung et al., 2005; Pathirana et al., 2005).

Em 2007, Cserti & Dzik observaram a influência de polimorfismos dos grupos sanguíneos A e B na formação de rosetas. O grupo sanguíneo A tem sido considerado como um fator de risco para o desenvolvimento de malária grave por *P. falciparum*, enquanto que indivíduos do grupo O parecem ter uma vantagem protetora contra a severidade da doença, como já havia sido proposto por Hill (1992). Estes autores também propõem a co-evolução do *P. falciparum* e os humanos e sustentam essa hipótese pela variação dos antígenos ABO nas diferentes populações com presença ou ausência de malária. Consideram que esse parasito selecione o grupo O nas áreas endêmicas, mas enfatizam, ainda, que outros mecanismos estão envolvidos nessa variabilidade entre as regiões do globo, incluindo as migrações populacionais, a fome, as guerras e até mesmo outras doenças, principalmente, as pediátricas letais. O Quadro 3 demonstra essa variabilidade associada às áreas malarígenas.

1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando a grande diversidade étnica da população brasileira, especificamente na região da Amazônia Legal e, conseqüentemente, os polimorfismos encontrados no sABO de pacientes maláricos, uma associação positiva entre eles pode promover relevantes informações em relação a gravidade da doença na Amazônia brasileira. As informações, relativas ao polimorfismo eritrocitário na população brasileira, resultantes da investigação em

doadores de sangue e comunidades indígenas, estão bem estabelecidas para os sistemas ABO, mas a investigação de sua possível relação com doenças tropicais é rara e carece de mais investigações, sobretudo, com a utilização de metodologias que possam elucidar os aspectos moleculares destes polimorfismos.

1.4.1. HIPÓTESE

O genótipos do sistema histo-sangüíneo ABO podem influenciar na proteção contra a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* em indivíduos da Amazônia brasileira.

Quadro 3: Prevalência do Grupo O, do Grupo A e dos Grupos não-O em regiões endêmicas e não endêmicas de malária. (Cserti & Dzik, 2007; modificada).

País/ Povos	Grupo O	Grupo A	Grupo não-O	Razão O :A	Área Malarígena (atual ou no passado)
Sudeste da Nigéria	87%	8%	13%	11,0	SIM
Sudão	62%	16%	38%	3,86	SIM
KiKuyu (Kenya)	60%	19%	40%	3,16	SIM
República Africana Central	44%	28%	56%	1,57	SIM
Congo	52%	24%	48%	2,17	SIM
Eritrea/Somália	60%	22%	40%	2,73	SIM
Ghana	47%	23%	53%	2,04	SIM
Namíbia	47%	10%	53%	4,70	SIM
América Central; Bacia Amazônica	90%	<10%	10%	>9	SIM
Nvajo (índios Norte Americanos)	73%	27%	27%	2,70	SIM
Índios (dos EUA em geral)	79%	16%	21%	4,94	SIM
Pérsia	38%	33%	62%	1,15	SIM
Turquia	43%	34%	57%	1,26	SIM
Filipinas	45%	22%	55%	2,04	SIM
Vietinã	42%	22%	58%	1,91	SIM
Papua Nova Guiné	41%	27%	59%	1,52	SIM
Finlândia	34%	41%	66%	0,83	NÃO
Hungria e Austrália	36%	44%	64%	0,82	NÃO
Suécia	38%	47%	62%	0,81	NÃO
Suíça	40%	50%	60%	0,80	NÃO
Noruega	39%	50%	61%	0,78	NÃO
Bulgária	32%	44%	68%	0,73	NÃO
República Tcheca	30%	44%	70%	0,68	NÃO
Portugal	35%	53%	65%	0,66	NÃO

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a associação entre o sistema histo-sangüíneo ABO e a malária não grave causada pelo *Plasmodium falciparum*, em indivíduos da Amazônia Brasileira.

2.2. Específicos

- a) Determinar e comparar a freqüência genotípica do sistema histo-sangüíneo ABO em indivíduos com e sem malária provenientes da Amazônia Legal brasileira.
- b) Associar os dados obtidos com o histórico de malária.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Áreas de Estudo

Foram avaliados 98 indivíduos maláricos provenientes de quatro áreas endêmicas de malária da Amazônia brasileira: Macapá, Estado Amapá; Novo Repartimento, Pará; Porto Velho, Rondônia e Plácido de Castro, Acre. No momento da coleta nenhum dos pacientes possuía sintomas de malária grave. Destes, 38 foram diagnosticadas molecularmente com infecções mistas de *P. falciparum* e *P. vivax* e 60 confirmadas infecções simples de *P. falciparum*.

Macapá, capital do Estado do Amapá, possui 344.153 habitantes em uma área de 6.407 km² (IBGE, 2007). Está localizada a 14 m de altitude em uma latitude de 0°2'18,84" Norte e uma longitude de 51°3'59,1" Oeste. No extremo Sul, o município é cortado pela linha do Equador. A base da Economia é o comércio devido à sua posição geográfica estratégica (<http://www.prefeiturademacapa.ap.gov.br/>). Foram diagnosticados 3027 casos positivos de malária no município em 2007, destes apenas 652 eram autóctones. Registrou-se no mesmo ano, 752 casos de infecção simples *P. falciparum* e 47 infecções mistas de *P. falciparum* e *P. vivax* (SIVEP, 2008).

Novo Repartimento, no Estado do Pará, cidade com 51.645 habitantes em 15.399 km² de área (IBGE, 2007). Localiza-se a uma latitude 04°19'50" Sul e a uma longitude 49°47'47" Oeste, a 560 quilômetros da capital e tem a agricultura como principal atividade econômica (<http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>). A cidade registrou 1.853 casos de malária no ano passado, sendo que apenas 380 eram importados de outras localidades. O *P. falciparum* foi diagnosticado em 401 desses pacientes e apenas 7 eram infecções mistas com *P. vivax*. (SIVEP, 2008).

Porto Velho, capital do Estado de Rondônia possui 369.345 habitantes em 34.082 km² (IBGE, 2007). A 85 m do nível do mar, está localizada em uma latitude de 08° 45' 43" Sul e uma longitude de 63° 54' 14" Oeste (<http://www.portovelho.ro.gov.br>). O *P. falciparum* foi o responsável por 6.860 dos 32.382 casos de malária desta capital, sendo 396 destes infecções mistas com *P. vivax*, registrados em 2007 (SIVEP, 2008).

Plácido de Castro, no Estado do Acre, com 17258 habitantes em 2.047km² localiza-se a uma latitude de 10°20'07" Sul e a uma longitude de 67°11'08" Oeste (IBGE, 2007), distante cem quilômetros da capital Rio Branco. O município notificou 1.673 exames positivos para malária em 2007 e 433 desses foram positivos para o *P. falciparum* (SIVEP, 2008, <http://www.seiam.ac.gov.br>).

3.2. Amostras

As amostras de sangue periférico foram coletadas entre janeiro de 2002 a dezembro de 2004, de indivíduos com idade superior a 18 anos e que residiam, por no mínimo, 10 anos na região estudada, e ficaram estocadas a -20 °C no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

O critério para a triagem dos indivíduos maláricos foi gota espessa positiva para *P. falciparum* ou para *P. falciparum* e outras espécies confirmadas por diagnóstico molecular, evidência de ciclos de febre, calafrios, fraqueza e dores no corpo, sintomas compatíveis com a doença. Em relação aos 142 doadores (grupo controle), foram incluídos os indivíduos que procuraram os bancos de sangue para doações, triados clinicamente, portanto; sem sintomas para malária e sem histórico anterior da doença.

Os dados epidemiológicos, inclusive o histórico de malária (número de episódios anteriores), foi obtido por meio de uma ficha epidemiológica respondida pelo próprio paciente. Em pacientes de Macapá o histórico de malária foi 1.5 (\pm 2.01); em Porto Velho foi 0.9 (\pm 1.57); em Novo Repartimento foi 1.7 (\pm 2.62) e em Plácido de Castro foi 1.6 (\pm 2.57). Tais como as idades, a média geométrica em cada área foi 28 (\pm 1.35), 25 (\pm 2.35), 32 (\pm 1.15) e 30 (\pm 1.02) anos, respectivamente, as idades variaram de 18 a 52 anos em todas as áreas estudadas.

3.2.1. Caracterização fenotípica do Sistema histo-sangüíneo ABO

A verificação da freqüência dos fenótipos do sistema ABO, tanto para os indivíduos não maláricos quanto para os pacientes infectados pelo *P. falciparum*, foi realizada anteriormente por Cavasini et al. (2006). Nos doadores de sangue a freqüência do grupo sangüíneo O foi de 63%, do grupo AB foi de 3%, do grupo B foi 12% e do grupo A de 22%. Já no grupo de pacientes infectados por *P. falciparum* foi de 63%, 1%, 9% e 27%, respectivamente.

3.2.2. Caracterização de exposição e infecção dos doadores de sangue pelo *Plasmodium falciparum*

Amostras de doadores de sangue foram avaliadas previamente quanto à presença de DNA plasmodial (Fugikaha et al., 2007), bem como para anticorpos citofílicos IgG de classe 1 e 3. Para determinação da condição de exposição à malária, foi utilizada a proteína circunsporozoítica (CSP) e, para determinação de infecção prévia, utilizou-se o fragmento da proteína de superfície do merozoíto – MSP-1 (dados não publicados). Todas as amostras foram negativas no

diagnóstico molecular e não responderam para os anticorpos contra o antígeno da MSP-1. Todas confirmaram a exposição à malária visto terem sido observados anticorpos de ambas as sub-classes para a CSP.

3.3. Aspectos Éticos

Este é um sub-projeto aprovado em 2002 pelo Comitê de Ética em pesquisa da FAMERP dentro do projeto “Epidemiologia e Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias” (CEP/FAMERP nº 538/2002) (Anexo 1).

3.4. Análise Laboratorial

3.4.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído de sangue total periférico, segundo protocolo descrito por Pena et al. (1991), com modificações. Resumidamente, foi realizada a extração do DNA das 98 amostras microscopicamente positivas pela gota espessa como *P. falciparum* e dos 142 doadores, seguindo o seguinte procedimento: em um tubo de polipropileno contendo 1 mL de solução de lise 1 (Sacarose 0.32M; Tris-HCL 10 mM; MgCl₂; Triton 1% 100x; Água Mili-Q autoclavada q.s.p. 100 mL) foram adicionados 300 µL de sangue periférico, colhidos em tubo contendo EDTA. Após a homogeneização, o tubo foi centrifugado a 6.500 rpm durante 5 minutos e, em seguida, desprezado o sobrenadante. Adicionou-se ao tubo 1 mL de solução de lise 1, e este foi homogeneizado até o “pellet” ser desfeito com posterior repouso por 5 minutos. O tubo foi centrifugado novamente a 6.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente desprezado. Então o precipitado obtido foi dissolvido em 450 µL de

solução de lise 2 (NaCl 0.075 M; EDTA 0.02 M pH 8,0; Água Mili-Q autoclavada q.s.p. 500 µL), 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) e homogeneizado a seguir. Feito isso, a amostra ficou incubada em banho-maria por 3 horas a 42 °C. Após a incubação, novos procedimentos foram realizados para a desproteinização da amostra. Adicionou-se 500 µL de fenol ao tubo, que foi homogeneizado por inversão, seguido da centrifugação por 5 minutos a 7.000 rpm. Organizou-se uma segunda série de tubos, para os quais foi transferido o sobrenadante da primeira série e, a seguir, adicionados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram homogeneizados e submetidos a nova centrifugação por 5 minutos a 7.000 rpm. Este último procedimento foi repetido mais uma vez. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi transferido para outros tubos contendo 50 µL de KCl gelado, aos quais foi adicionado 500 µL de etanol também gelado. Os tubos foram invertidos várias vezes até precipitarem o DNA, e então centrifugadas por 30 segundos a 13000 rpm. Os sobrenadantes foram desprezados e aos tubos foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação foi efetuada por 30 segundos a 13.000 rpm. Cuidadosamente, os sobrenadantes foram desprezados e os tubos mantidos abertos para secagem por 15 minutos. Por fim o DNA foi hidratado com 100 µL de tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; Água Mili-Q autoclavada q.s.p. 100 mL) sendo posteriormente armazenado a 20 °C até o momento de uso.

3.4.2. Genotipagem do sistema histo-sangüíneo ABO

Foram efetuadas três reações de PCR/RFLP como descrito previamente e esquematizado na Figura 8 (Yamamoto et al., 1992; Mattos et al., 2001). Em

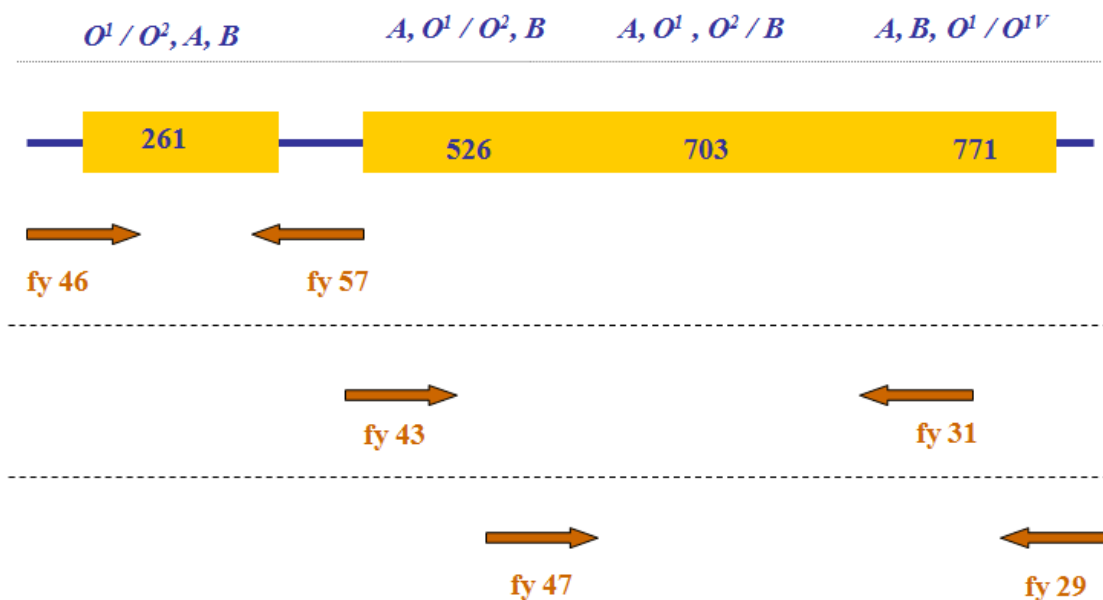


Figura 8: Representação esquemática dos pares de *primers* que amplificam os segmentos que concentram as diferenças de nucleotídeos entre os principais alelos do *gene ABO*. Modificado de Mattos *et al.*, 2001.

suma, as reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25µL utilizando 0,5U de Taq DNA polimerase (0,2µL) da INVITROGEN[®], 2,5µL do tampão (200mM Tris-HCL, 500mM de KCL); 0,8µL de solução de cloreto de magnésio (INVITROGEN[®] 50mM), 10,5µL de água Mili-Q autoclavada, e 2,0µL de aproximadamente 5ng de DNA. Para a diferenciação dos alelos *A*, *B*, *O*¹ e *O*² foram executadas três diferentes reações de PCR nas condições já especificadas com 35 ciclos no termociclador (Mastercycler - Ependorff[®], EUA) sendo esse composto de: 2 minutos a 94°C para separação da dupla fita de DNA; 2 minutos a 63°C para hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores e 3 min a 72°C para extensão. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação do alelo *ABO*O01* foram: *fy-46* e *fy-57* (INVITROGEN[®]) (5' GAATTCACCTCGC CACTGCCTGGGTCTC 3' e 5' GAATTCATGTGGGTGGCACCCCTGCCA 3', respectivamente), que amplificam um fragmento de 249 pares de base (pb). Para a segunda reação de PCR, que diferencia o alelo *ABO*O02* e *ABO*B*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *fy-43* e *fy-31* (INVITROGEN[®]) (5' GGATCCAGGGGTGCACGGCCGGCGGC 3' e 5' GAAATCGCCCTC GTCCTT 3') que amplificam um fragmento de 467 pb. A terceira reação de PCR utiliza os oligonucleotídeos *fy-47* e *fy-29* (INVITROGEN[®]) (5' TGCTGGAGGTGCGCGCCTAC 3' e 5' CGT TCTGCTAAAACCAAG 3') para identificação do alelo *ABO*B* e geram um fragmento de 621 pb.

3.4.3. Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP)

Após a amplificação, foram realizadas as digestões com as enzimas de restrição (Figura 9). A *Kpn* I (INVITROGEN[®]) tem como sítio de restrição 5' GGATC C 3'. Assim, na digestão do produto da primeira reação de PCR, o alelo

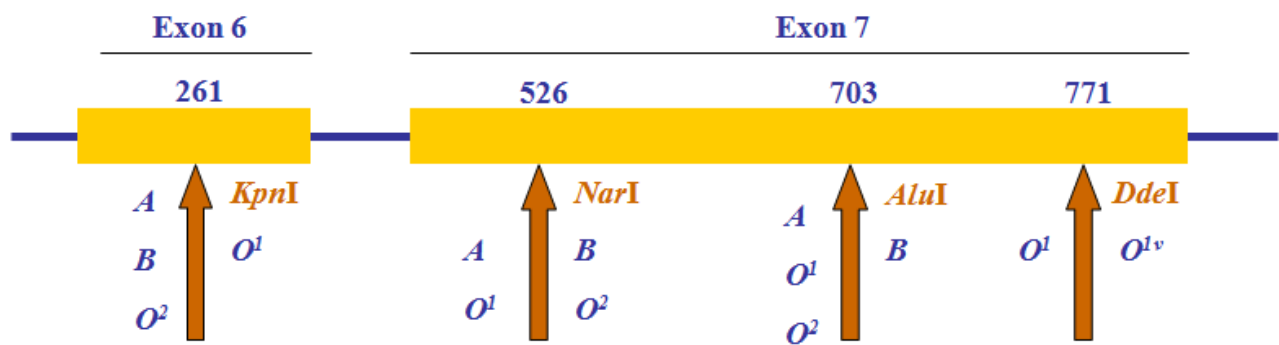


Figura 9: Representação esquemática dos locais de reconhecimento das enzimas de restrição que diferenciam os alelos A, B, O¹, O^{1v} e O² do *gene ABO*. Modificado de Mattos *et al.*, 2001.

*ABO*O01* formará dois fragmentos, um de 84 e outro de 164 pb. Para os alelos *ABO*A*, *ABO*B* ou *ABO*O02* não há o sítio de restrição. Ao segundo produto de PCR com a digestão pela enzima *Nar I* (INVITROGEN[®]) são formados dois fragmentos de 205 e 262 pb quando for *ABO*O02* e *ABO*B*. No terceiro produto de PCR, a digestão foi realizada com a *Alu I* (INVITROGEN[®]) que digere o fragmento em três de 189, 280 e 152pb quando for o alelo *ABO*B*, enquanto os outros alelos são digeridos em apenas dois de 469 e 152pb.

3.4.4. Visualização dos padrões de bandas obtidos após PCR-RFLP

Cinco microlitros de cada produto de PCR e oito microlitros da digestão (do primeiro PCR) pela enzima de restrição foram adicionados a dois microlitros de solução corante indicadora (0,25g de azul de bromofenol + 40g de sacarose em 100mL de água destilada), adicionado de brometo de etídio (5 μ L/ mL em TBE) e foram fracionados eletroforeticamente em gel de agarose a 2% (Ultra pure agarose, INVITROGEN[®]), a 100V por 40 minutos. Os outros produtos das digestões com as enzimas de restrição *Nar I* e *Alu I* foram fracionados em eletroforese de gel de poliacrilamida a 12,5%, a 120V (Fisher Scientific[®] e Life Technologies[®]). Em seguida, as amostras e o marcador de peso molecular de tamanho de 100 pb ou 50 pb (INVITROGEN[®]) foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta (Gel doc 2000, BIORAD[®]).

3.5. Análise Estatística

O equilíbrio de Hardy e Weinberg foi determinado de acordo com Beiguelman (1994). A associação entre os dados foi determinada utilizando o teste exato de Fisher e o teste do Qui-quadrado pelo *software* de estatística R

versão 2.4. (Copyright 2006 The R Foundation For Statistical Computing ISBN 3-90051-07-0). O nível de significância adotado foi de 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Perfis de bandas encontradas com o RFLP dos polimorfismos do sistema histo-sangüíneo ABO.

As Figuras de 10 a 12 demonstram os fragmentos obtidos na digestão do produto de PCR com as enzimas de restrição observados para cada grupo sangüíneo analisado.

O fragmento amplificado no primeiro PCR tem um tamanho de 249 pb, a enzima *Kpn I* digere apenas o alelo *ABO*O01* em dois fragmentos um de 164 pb e outro de 84 pb. O segundo PCR amplifica um fragmento de 467 pb, a enzima *Nar I* digere os alelos *ABO*O02* e *ABO*B* em dois fragmentos um de 262 e 205 pb. E a terceira reação de PCR amplifica um fragmento de 621 pb e a digestão com a enzima *Alu I* gera fragmentos de 152, 189 e 280 pb para o alelo *ABO*B* e de 152 e 469pb para os demais alelos do sABO.

4.2. Distribuição genotípica e alélica do sistema histo-sangüíneo ABO.

A Tabela 1 demonstra a distribuição percentual dos genótipos do sABO identificados entre os pacientes infectados pelo *P. falciparum* e os doadores de sangue da região Amazônica brasileira.

Para o grupo sangüíneo O, o genótipo homozigoto *ABO*O01O01* foi prevalente tanto nos maláricos quanto nos doadores de sangue, seguido do heterozigoto *ABO*O01O02* que se apresentou em aproximadamente 9% dos maláricos e 2% do controle e por fim, o genótipo homozigoto *ABO*O02O02*, esteve presente em apenas 1% da população estudada. O grupo O, fenótipo determinado por esses genótipos, representou a maioria da população estudada, cerca de 64 % nos pacientes e 61 % nos doadores.

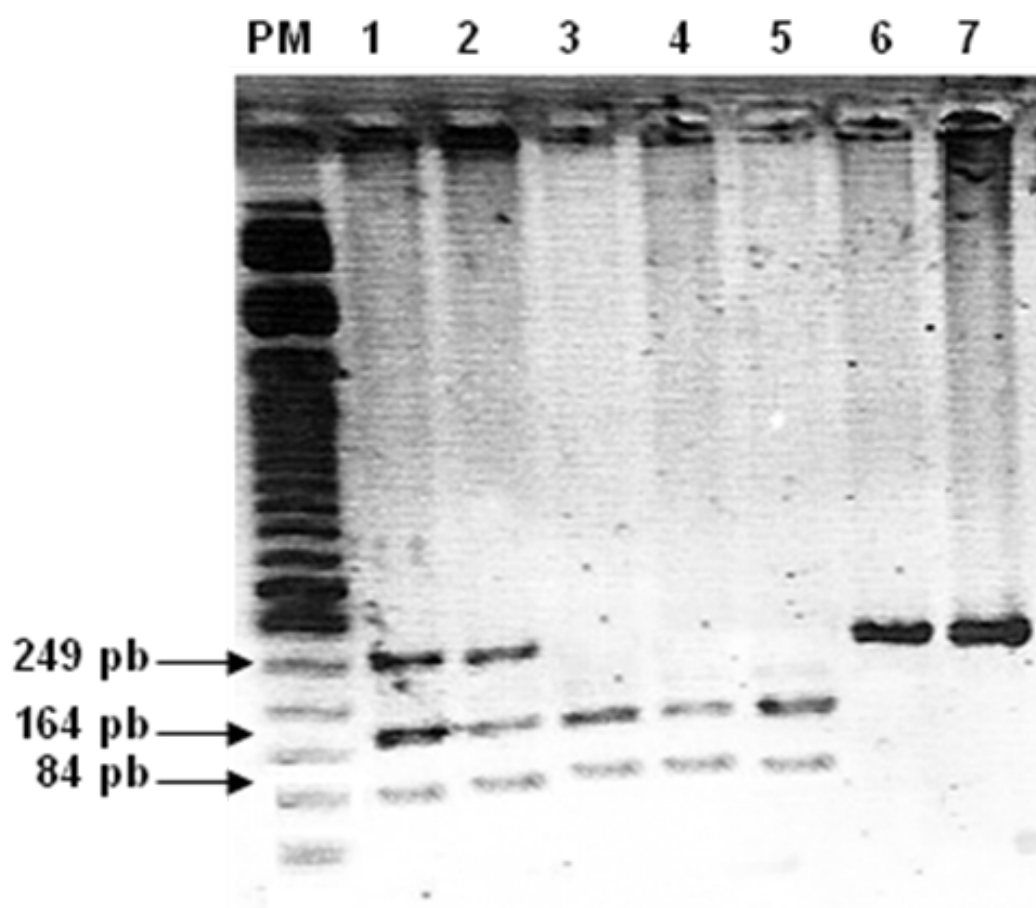


Figura 10: Fragmentos encontrados na digestão do 1° PCR com a enzima *Kpn I* em gel de agarose 2%. **PM:** peso molecular de 50 pb; **1:** ABO* BO01; **2:** ABO* AO01; **3 a 5:** ABO* O01O01 ; **6 e 7:** ABO* AA.

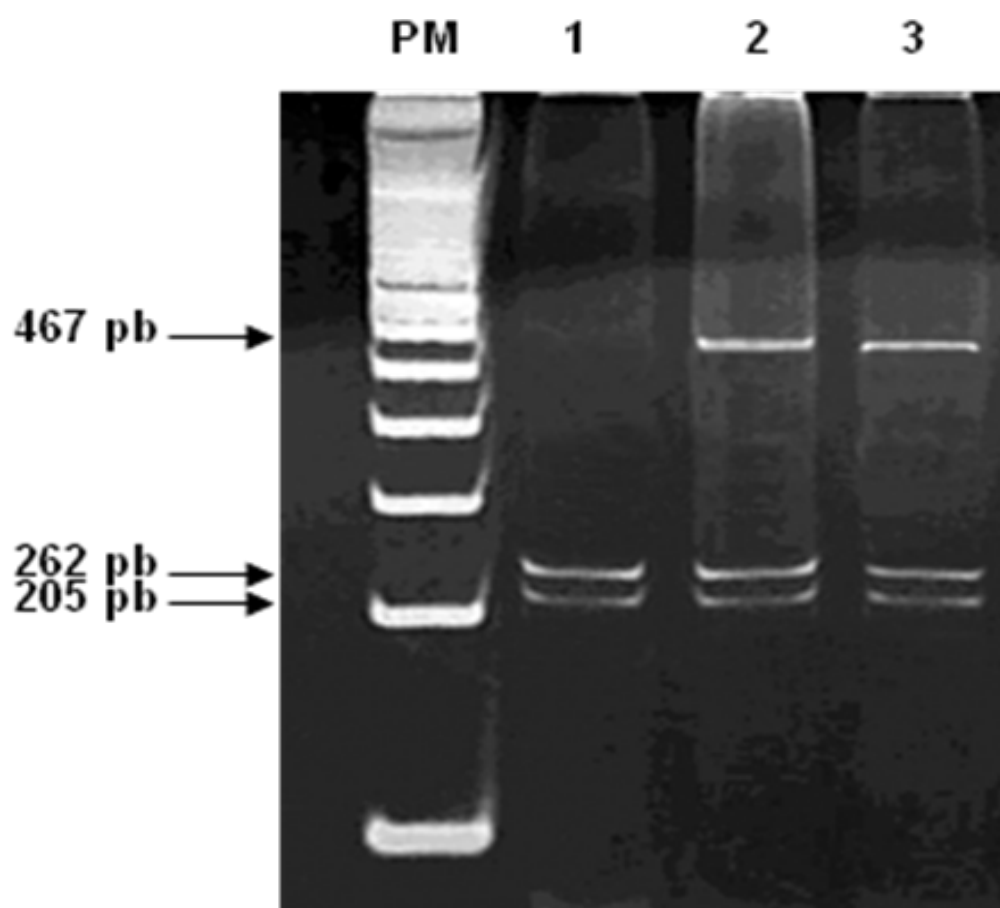


Figura 11: Fragmentos encontrados na digestão do 2° PCR com a enzima *Nar I* em gel de poliacrilamida 12,5%. **PM:** peso molecular de 100 pb; **1:** *ABO*BB*; **2 e 3:** *ABO*BO01*.

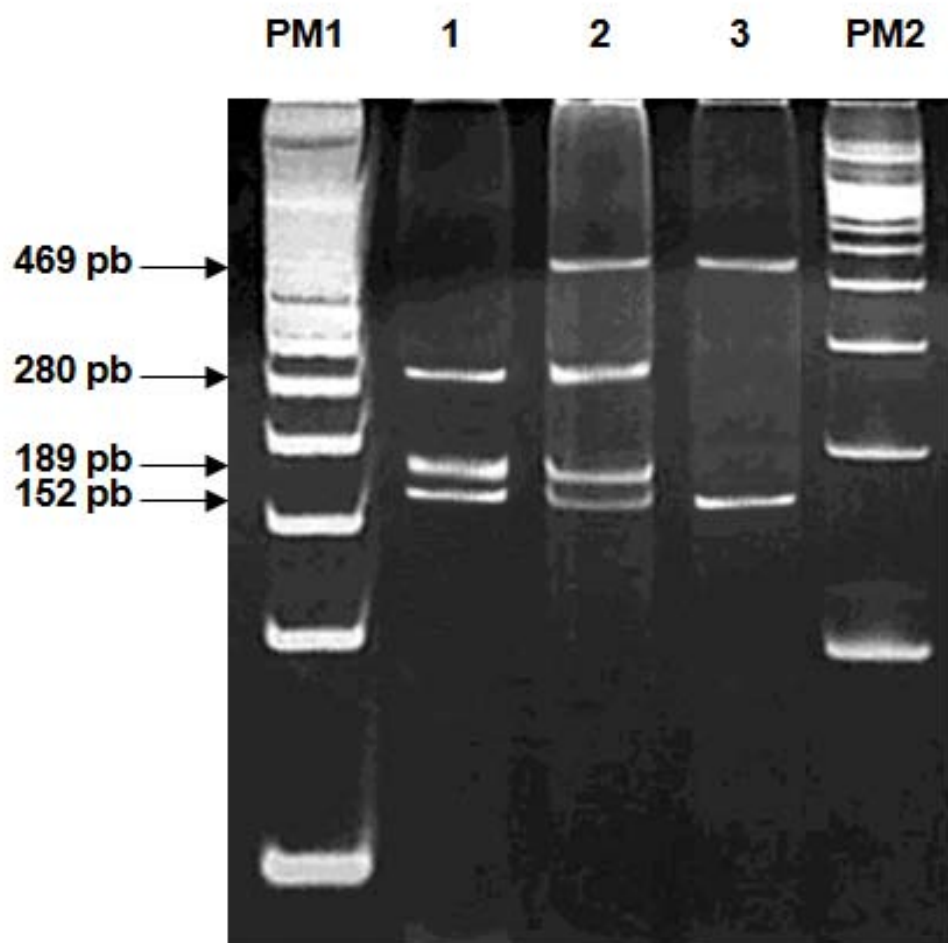


Figura 12: Fragmentos encontrados na digestão do 3° PCR com a enzima *Alu I* em gel de poli-acrilamida 12,5%. **PM1:** peso molecular de 50 pb; **PM2:** peso molecular de 100 pb; **1 :** ABO* BB; **2:** ABO* BO01; **3:** ABO* O01O01.

A genotipagem para o grupo A mostrou que a maioria desses indivíduos era heterozigoto *ABO*AO01* (21% dos infectados e 25% dos doadores); e o grupo A apresentou-se, aproximadamente, em 22% dos maláricos e 20% dos não maláricos.

Dos indivíduos infectados com o *P. falciparum*, o genótipo homozigoto *ABO*BB* apresentou-se em apenas 1% desses indivíduos e heterozigoto em 9%. Já nos doadores de sangue, 11% eram heterozigotos. O genótipo *ABO*AB* representou cerca de 3% da população infectada e 5% da não infectada.

O alelo mais freqüente nesta população foi o *ABO*O01*, verificado em 74% dos infectados e 73% dos doadores de sangue. O alelo *ABO*A* foi o segundo mais freqüente, apresentando-se em 13% dos indivíduos estudados, seguido pelo alelo *ABO*B* (9%) e, por fim, o alelo *ABO*O02* que foi observado em apenas 4% da amostragem. Segundo a lei de Hardy e Weinberg a população encontra-se em equilíbrio.

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes na comparação das freqüências alélicas e genotípicas do sABO dos pacientes e do grupo controle, mesmo quando foram analisados apenas indivíduos com infecções puras de *P. falciparum* (Tabela 1).

4.3. Histórico de malária e a freqüência do sistema histo-sangüíneo ABO.

A Tabela 2 descreve o número de episódios prévios de malária dos pacientes e associa com o grupo sangüíneo ABO determinado de cada indivíduo. Os resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significantes (teste exato de Fisher; $P > 0,05$).

Tabela 1: Comparação entre os resultados das freqüências genótípicas e alélicas do sistema histo-sangüíneo ABO em pacientes infectados pelo *Plasmodium falciparum* e doadores de sangue não-maláricos na Amazônia Brasileira.

Sistema Histo-sangüíneo ABO		Amazônia Brasileira		
Genótipos	Fenótipos determinados	Doadores n=142	Pacientes com <i>P. falciparum</i> n=98	Valor de <i>P</i> (Teste exato de Fisher)
<i>ABO*AA</i>	A	04 (2,82%)	01 (1,02%)	0,6184
<i>ABO*AO01</i>	A	25 (17,61%)	21 (21,43%)	0,5668
<i>ABO*AB</i>	AB	05 (3,52%)	03 (3,06%)	0,8645
<i>ABO*BB</i>	B	04 (2,82%)	01 (1,02%)	0,6184
<i>ABO*BO01</i>	B	17 (11,97%)	09 (9,18%)	0,6370
<i>ABO*O01 O01</i>	O	81 (57,04%)	53 (54,08%)	0,7476
<i>ABO*O01O02</i>	O	04 (2,82%)	09 (9,18%)	0,0641
<i>ABO*O02O02</i>	O	02 (1,04%)	01 (1,02%)	0,7451
		Freqüências Alélicas		
<i>ABO*A</i>		0,13	0,13	0,9709
<i>ABO*B</i>		0,11	0,07	0,2646
<i>ABO*O01</i>		0,73	0,74	0,9399
<i>ABO*O02</i>		0,03	0,06	0,1916

Tabela 2: Associação ente grupo sanguíneo ABO determinado e o histórico de malária dos indivíduos infectados pelo *P. falciparum*.

sABO	Histórico de malária	Primo-infectado	Mais que um episódio malárico
Grupo A		11	11
Grupo não-A		36	40
<i>P</i> (teste exato de Fisher)			1,0000
Grupo AB		-	03
Grupo não-AB		47	48
<i>P</i> (teste exato de Fisher)			0,2435
Grupo B		03	07
Grupo não-B		44	44
<i>P</i> (teste exato de Fisher)			0,3218
Grupo O		33	30
Grupo não-O		14	21
<i>P</i> (teste exato de Fisher)			0,2935

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A malária é uma parasitose com alta taxa de transmissão e está presente ao redor do globo. Aproximadamente 40 % da população mundial está exposta a essa doença. Das quatro espécies de plasmódio que infectam o homem, o *Plasmodium falciparum* é o responsável pela forma mais grave da doença. A maioria dos sintomas clínicos da malária está relacionada aos contínuos ciclos da reprodução assexuada que ocorre dentro dos eritrócitos do hospedeiro e que envolve a invasão pelos merozoítos, o crescimento e a esquizogonia (Pinzón et al., 2008).

O processo de invasão consiste em uma série de interações seqüenciais e específicas entre proteínas de superfície da hemácia e do merozoíto. Para entender essa etapa, é preciso compreender essas inúmeras associações entre os ligantes do *P. falciparum* e seus receptores na célula do hospedeiro (Wickramarachchi et al., 2008). Assim, vê-se que a invasão do eritrócito é o ponto central no ciclo eritrocitário desse parasito e, acredita-se, que a presença de múltiplas vias para esse processo é uma estratégia de sobrevivência para o *P. falciparum*. Destas vias, as duas mais estudadas e bem caracterizadas são a que envolve a glicoforina A (GPA) e o Antígeno ligante do eritrócito de 175 k-Da (EBA-175) e, a outra relacionada com a glicoforina C (GPC) e o Antígeno ligante do eritrócito de 140 k-Da (ou PfEBP-2). Além disso, existem cinco receptores adicionais no eritrócito, a glicoforina B (GPB) e quatro receptores não identificados chamados de X, Y, E e Z, os quais acredita-se participarem de vias independentes/alternativas de GPA (Lobo et al., 2004). O sABO tem sido implicado como um co-fator dessas vias, uma vez que alguns estudos têm associado o grupo sanguíneo A com maior risco de

formação de rosetas por este protozoário (Fisher et al., 1998. Barragan et al., 2000; Rowe et al., 2007).

Indiscutivelmente, o sABO é o sistema sangüíneo mais conhecido e, também o mais misterioso funcionalmente (Cserti & Dzik, 2007). Na prática clínica, é o mais importante na compatibilidade transfusional e no transplante de órgãos sólidos (Novaretti et al., 2008). Os antígenos do sistema de grupos sangüíneos ABO são expressos em todos os tecidos do corpo e seus antígenos constituem-se de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídios). É importante ressaltar que a expressão dos antígenos desse sistema histo-sangüíneo é diferente em quantidade dependendo do tecido (Perry et al., 2007).

Os polimorfismos gênicos e genotípicos deste sistema vem sendo utilizados em estudos de caráter antropológico, pois sua distribuição varia de acordo com a etnia e a localização geográfica da população (Ohashi et al., 2003; <http://www.bloodbook.com/world-abo.html>). A distribuição diferencial entre os vários grupos étnicos é um aspecto característico dos grupos sangüíneos (Beiguelman, 1994) e tem sido usada tanto como marcador de composição étnica quanto como indicador de ancestralidade de uma população Ohashi et al., 2003). Pode-se observar, por exemplo, prevalência do grupo A e baixas freqüências do grupo B em países europeus, principalmente nos localizados ao Norte, enquanto na Ásia ocorrem altas freqüências dos grupos B e AB (<http://www.bloodbook.com/world-abo.html>). Há relatos da prevalência do grupo B na Índia e do grupo O entre os Ameríndios da América do Sul ((Pant et al., 1998; <http://www.bloodbook.com/world-abo.html>).

O Brasil apresenta alta miscigenação, com populações etnicamente diversas e grande heterogeneidade entre suas regiões, devido ao padrão peculiar

de colonização. A região Norte exibe maior contribuição ameríndia e, conseqüentemente, o grupo O é prevalente (Guerreiro et al., 1988). Já o sudeste do país exibe uma maior proporção de caucasóides e o grupo A constitui uma parcela significativa da população (Novaretti et al., 2000). Além disso, o padrão regional de miscigenação foi consideravelmente alterado pelas correntes de migração interna (Guerreiro et al., 1988; Novaretti et al., 2000).

As freqüências globais dos fenótipos eritrocitários do sABO encontradas neste estudo foram semelhantes àquelas descritas na literatura para a região analisada. O grupo O foi prevalente, seguido dos grupos A, B e AB. Os valores encontrados estão muito próximos àqueles relatados por Guerreiro e colaboradores em 1988. Esse fato não é surpreendente haja vista os ameríndios puros pertencerem ao grupo O e constituírem parcela significativa na composição étnica da região norte brasileira (Barjas-Castro et al., 2003).

A não demonstração de diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes e os doadores de sangue analisados sugerem que os fenótipos ABO não exercem influência na severidade da malária causada pelo *P. falciparum* na Amazônia brasileira. As freqüências do grupo O observadas não diferem entre pacientes e doadores, mas apresentam diferenças marcantes em relação a outras localidades. Embora seja prevalente na cidade de São Paulo, o grupo O apresenta menor percentual que o relatado para a Amazônia brasileira e isso pode ser reflexo da diferente composição étnica da população paulista (Salaru e Otto et al., 1989; Novaretti et al., 2008). Paralelamente, sua freqüência também diminui nas populações de origem asiática tais como a indiana e a japonesa (Pant et al., 1998; <http://www.bloodbook.com/world-abo.html>). Portanto, a variabilidade

nas freqüências fenotípicas dos grupos sanguíneos ABO está relacionada a áreas geográficas bem como a diferentes etnias.

Relatamos aqui um estudo de associação entre a malária não grave causada pelo *P. falciparum* e as freqüências alélicas, genotípicas e fenotípicas do sistema histo-sangüíneo ABO em uma população da Amazônia Brasileira.

O genótipo homozigoto *ABO*O01O01* foi o mais encontrado para grupo O na casuística. Barjas-Castro et al., em 2003 verificaram, em populações indígenas da própria Amazônia Brasileira, que existem outras formas alélicas distribuídas heterogeneamente entre as diferentes tribos existentes na região. Estas outras formas alélicas não foram investigadas neste estudo e, portanto não se pode excluir definitivamente sua presença nesta casuística. De fato, a variabilidade alélica no grupo O foi relatada tanto em ameríndios bem como em indivíduos de outras etnias em outras áreas do Brasil (Olsson et al., 1997; Olsson et al., 1998; Mattos et al., 2001).

O grupo A apresentou freqüência menor que aquela verificada em outras áreas do Brasil e isso parece refletir a ausência dos alelos A e B do locus ABO em populações ameríndias (Olsson et al., 1998). Ao mesmo tempo, a baixa freqüência do grupo A na casuística analisada pode ser resultante da miscigenação de ameríndios com outras etnias introduzidas na Amazônica Brasileira pelo processo de colonização (Olsson et al., 1998). Em contrapartida, estudos realizados em populações caucasianas da Europa encontraram o grupo A presente em metade da população (<http://www.bloodbook.com/world-abo.html>).

O genótipo mais comum encontrado entre pacientes e doadores do grupo A foi o *ABO*AO01*. Essa combinação alélica é esperada para a região, pois o alelo *O01* é freqüente entre ameríndios e o alelo A é comum em outras etnias

presentes na Amazônia brasileira (Olsson et al., 1997). Embora haja evidências de que o grupo A contribua com maior risco de formação de rosetas malária por *P. falciparum*, não existem claras demonstrações de que o alelo A exerça efeito deletério em seus portadores tanto em homozigose como em heterozigose com o alelo *ABO*O01*. Em ameríndios da América Central, este grupo é o menos freqüente (Cserti & Dzik, 2007, <http://www.bloodbook.com/world-abo.html>).

Os indivíduos do grupo B corresponderam à menor parcela dos indivíduos analisados, sendo a maioria de heterozigoto *ABO*BO01*. Por outro lado, este grupo é o mais freqüente em populações asiáticas tal como em indianos e chineses (Pant et al., 1998; <http://www.bloodbook.com/world-abo.html>).

O grupo AB foi o menos freqüente na região estudada. Isto é concordante com os relatos realizados em todas as populações ao redor do mundo (<http://www.bloodbook.com/world-abo.html>).

O alelo mais freqüente foi o *ABO*O01*. Há relatos demonstrando a ocorrência de outros polimorfismos do gene O em ameríndios da Amazônia brasileira (Barjas-Castro et al., 2003). Entretanto, estes outros polimorfismos não foram analisados neste estudo e, portanto não é possível estabelecer relações entre eles e a ocorrência mais freqüente do alelo *ABO*O01* tanto nos pacientes com nos controles. No entanto, quando os polimorfismos relatados por Barjas-Castro e colaboradores (2003) são agrupados como *ABO*O01* e *ABO*O02*, os resultados são coincidentes com os apresentados neste estudo.

No entanto, outros estudos têm demonstrado, em muitas populações humanas, um grande número de caracteres genéticos que não parecem descender de casamentos preferenciais, como é o caso dos grupos sangüíneos, os genótipos se distribuem de acordo com a Lei de Hardy e Weinberg. Foi

realizada a comparação entre os números observados e esperados em cada amostra e não foi encontrado diferenças significativas entre elas ($P > 0,05$), podendo as amostras serem consideradas como extraídas de uma população em equilíbrio genético quanto aos grupos histo-sangüíneos ABO (Beiguelman, 1994).

Esses estudos deixam claro que a região Amazônica brasileira apresenta características peculiares que se refletem, inclusive nas freqüências dos fenótipos eritrocitários do sistema ABO.

Com toda essa complexidade e peculiaridade, a associação do sABO com doenças é lógica e intrigante. Muitos pesquisadores têm observado uma relação entre sistema histo-sangüíneo ABO do paciente com diversas doenças que vão desde leucemias (Novaretti et al., 2008) até as infecto-parasitárias (Vogel et al., 1970) como a malária. Muitos trabalhos vêm demonstrando uma maior susceptibilidade de indivíduos dos grupos sangüíneos não-O em desenvolverem a malária grave causada pelo *P. falciparum*, visto estes contribuírem, como co-receptores, para o desenvolvimento de citoaderência e a formação de rosetas (Loscertales et al., 2007; Rowe et al., 2007; Fry et al., 2008; Vafa, et al 2008). Por sua vez, a maioria dos autores tem observado esse tipo de agregação em hemácias de pacientes dos grupos sanguíneos não-O principalmente, do subgrupo A₁ (Fischer et al., 1998; Rowe et al., 2007). Lell e colaboradores (1999) observaram ainda, que pacientes maláricos do grupo histo-sangüíneo A têm menor nível de hemoglobina e maior risco de entrar em coma que os indivíduos infectados que possuem outros grupos sangüíneos. Infelizmente, estes dados não puderam ser relacionados no presente estudo. Adicionalmente, Barragan e colaboradores (2000) confirmaram que o grupo A representa o alvo mais forte para a formação de rosetas. Para isso usaram três tipos de hemácias: as

enzimaticamente tratadas e convertidas em hemácias O, hemácias de indivíduos do grupo O e, ainda, hemácias Bombay para simular a formação de rosetas. Os autores observaram o mesmo grau de agregação entre elas e muito menor que as hemácias A. Concluíram então, que as rosetas aparecem especificamente, mas não exclusivamente, em eritrócitos com os antígenos A e/ou B. Em contrapartida, na América do Sul não foi observado qualquer tipo de associação entre a frequência fenotípica desse sistema e a frequência de malária na Colômbia (Montoya et al., 1994) na Amazônia brasileira (Cavasini et al., 2006).

Os resultados moleculares conseguidos neste trabalho não encontraram significância na associação entre a suscetibilidade a malária não grave por *P. falciparum* e o sABO, confirmando os resultados fenotípicos previamente encontrados em países Amazônicos (Montoya et al., 1994; Cavasini et al., 2006). No entanto, essa ausência de associação pode estar relacionada, talvez ao reduzido tamanho amostral, a baixa prevalência desse parasito na região estudada (aproximadamente 20%) e o número de amostras com infecções mistas inseridas neste estudo. Além disso, diferenças nas cepas do parasito que circula na região ou mesmo outros fatores específicos do hospedeiro podem contribuir para a não associação aqui reatada (Cserti & Dzik, 2007). Não se pode esquecer que grande parte dos trabalhos que encontraram relação entre a malária *falciparum* e o sABO foram realizados em regiões com grande incidência de malária grave, o que não se observa na região da Amazônia brasileira (Noronha, et al., 2000; Kirchgatter & Del Portillo, 2002).

Por outro lado, nossos resultados mostram uma maior frequência de indivíduos de grupo sanguíneo O. Estes achados sugerem que este grupo sanguíneo representa um dos fatores responsáveis pela baixa frequência de

malária grave nesta região. De fato, outros estudos em áreas endêmicas fora da América do Sul inferiram um efeito protetor do grupo O contra malária grave, pelo mecanismo de redução da formação de rosetas eritrocitárias (Rowe et al., 2007; Fry et al., 2008). Se esse fato for real e associado ao equilíbrio de Hardy e Weinberg em que o sABO se encontra nesta população, pode-se utilizar a hipótese postulada por Rowe e colaboradores (2007) de que a pressão seletiva imposta pela malária pode contribuir para a distribuição global da variabilidade do grupo sanguíneo ABO, e assim manter níveis reduzidos de malária grave causada pelo *Plasmodium falciparum* na Amazônia brasileira. Embora os pacientes analisados neste estudo não tenham sido acompanhados clinicamente no momento de inclusão, não apresentaram sinais clínicos de malária grave. Esta observação contribui para a hipótese acima apresentada, porém, novos estudos devem ser realizados a fim de confirmar esta proposição.

Durante as últimas décadas, muitos estudos não foram capazes de vincular o sABO à incidência de malária (Facer et al., 1979; Montoya et al., 1994), e resposta sorológica (Akinboye et al., 1987; Thakur et al., 1992) ou à taxa de repetidos episódios de malária (Singh et al., 1995). Interessantemente, os resultados aqui encontrados também não confirmaram a associação entre o número de episódios prévios de malária e o sistema histo-sanguíneo ABO. Provavelmente esta associação não ocorra tendo em vista a proposta de outros autores que sugerem que o sABO não está envolvido com o processo infeccioso e, sim com a severidade da doença causada pelo *P. falciparum* (Loscertales et al., 2007; Fry et al., 2008).

Outra visão a ser considerada refere-se ao fato de que a virulência mostra-se associada com a seletividade do *Plasmodium falciparum* na invasão dos

eritrócitos (Chotivanich et al., 2000). Então o maior entendimento das interações biológicas entre o parasito e o hospedeiro representar-se-ia imperativo nas implicações clínicas (McKenzie et al., 2006). A resistência inata para infecções maláricas em humanos foi atribuída a variações nos antígenos de grupo sangüíneo. Observou-se significativa correlação envolvendo os fenótipos do grupo sangüíneo MNSs (receptor de eritrócito para *P. falciparum*) e do Duffy (receptor de eritrócito para *P. vivax*) entre doadores de sangue e pacientes maláricos na região Amazônica (Cavasini et al., 2006), amostras estas incluídas neste estudo. Além disso, outros trabalhos sugerem que infecções mistas com *P. falciparum* podem afetar os padrões brasileiros de transmissão levando a atenuação da doença por este parasito e, conseqüentemente refletir no modo como essa espécie se estabelece na população (Black et al., 1994).

Realmente, co-infecções frequentemente ocorrem nas áreas endêmicas de malária no Brasil e o par *P. falciparum* - *P. vivax* parece ser o mais comum (Lorenzetti et al., 2008). Quando infecções mistas são diagnosticadas erroneamente como infecções puras de *P. vivax*, o tratamento pode levar a uma explosão na parasitemia de *P. falciparum*. Muitos fatores confundem a relação entre parasitemia e doença, levando à perda da correlação entre a carga de parasito circulante e o estado clínico. Estudos prévios sugerem que interações *P. falciparum* - *P. vivax* em infecções mistas podem ter um profundo efeito clínico amenizando os sintomas da doença, talvez pela manutenção de baixas densidades de *P. falciparum* (Field et al., 1949), uma vez que a severidade da doença está muito mais relacionada com a densidade parasitária, do que outros fatores tais como o sistema sangüíneo ABO, idade do paciente e múltiplas infecções (Vafa et al., 2008).

Finalmente, ressalta-se a importância de novos estudos com os sistemas sangüíneos que ampliem a casuística, tenham um acompanhamento dos indivíduos afetados por um período de tempo maior, promovendo, assim, melhor entendimentos sobre a relação parasito/hospedeiro e, conseqüentemente, permitindo melhoria da qualidade de vida da população atingida pela malária causada pelo *Plasmodium falciparum*.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Na Amostra estudada:

- Não existe associação entre a suscetibilidade à malária pelo *P. falciparum* e o sistema histo-sangüíneo ABO.
 - O genótipo mais freqüente na foi o homozigoto *ABO*001001* e o menos freqüente foi o *ABO*AB*.
 - Encontramos o alelo *ABO*001* na maioria dos indivíduos estudados enquanto que o alelo *ABO*B* foi o menos freqüente.
 - Não há associação entre o histórico de malária e os polimorfismos do sABO.
 - A freqüência elevada de indivíduos do grupo O, bem como a freqüência reduzida de indivíduos do grupo sangüíneo A, pode estar associada com os índices menores de malária grave na Amazônia brasileira.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRE, GOVERNO DO ESTADO, Sistema Estadual de Informações Ambientais – SEIAM – O **Estado do Acre**: Municípios: int. Disponível em: <<http://www.seiam.ac.gov.br>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2008.

AIKAWA, M.; MILLER, L. H.; JOHNSON, J.; RABBEGE, J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. **The Journal of Cell Biology**, v. 77, p. 72 - 82, 1978.

AKINBOYE, D. O.; OGUNRINADE, A. F. Malaria and loaisis among blood donors at Ibadan, Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81 (3) p. 398 – 399, 1987.

BANNISTER, L. H.; BUTCHER, G. A.; DENNIS, E. D.; MITCHELL, G. H. Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites in vitro. **Parasitology**, v. 71, p. 483 - 491, 1975.

BARJAS-CASTRO, M. L.; SOARES, M. C.; MENEZES, R. C.; CARVALHO, M. H.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. ABO blood group in Amerindians from Brazilian Amazon. **Annals of Human Biology**, v. 30 (20), p. 220 - 224, 2003.

BARRAGAN, A.; KREMSNER, P. G.; WAHLGREN, M.; CARLSON, J. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* resetting. **Infection and Immunity**, v. 68(5), p. 2971 - 2975, 2000.

BAYOUMI, R. A.; BASHIR, A. H.; ABDULHADI, N. H. Resistance to *falciparum* malaria among adults in central Sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 45 - 55, 1986.

BEIGUELMAN, B.; ALVES, F. P.; MOURA, M. M.; ENGRACIA, V.; NUNES, A. C. S.; HECKMANN, M. I. O.; FERREIRA, R. G. M.; SILVA, L. H. P.; CAMARGO, E. P.; KRIEGER, E. P. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian western Amazonian region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98(4), p. 455 - 460, 2003.

BEIGUELMAN, B.; Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Ribeirão Preto, **Sociedade Brasileira de Genética**; p. 179 - 202. 1994.

BLACK, J.; HOMMEL, M.; SNOUNOU, G.; PINDER, M. Mixed infections with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* and fever in malaria. **Lancet**, v. 343, p. 1095, 1994.

BLOODBOOK, Racial & ethnic distribution of ABO blood types. **World ABO blood types**: int. Disponível em: <<http://www.bloodbook.com>>. Acesso em: 26 março 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil visto do Espaço**. Disponível em: <<http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em: 16 fevereiro 2008.

CABELLO, P. H.; DIAS LIMA, A. M. V. M.; AZEVEDO, E. S.; KRIEGER, H. ABO blood group and *Leishmania donovani chagasi* infection: an apparent association. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18.2, p. 297 - 299, 1995.

CALLEGARI-JACQUES S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, p. 824 - 834, 2003.

CARVALHO-SILVA D. R.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J.; PENA, S. D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 281 - 286, 2001.

CAVASINI, C. E; MATTOS, L. C.; ALVES, R. T.; COUTO, A. A.; CALVOSA, V. S. P.; DOMINGOS, C. R. B.; CASTILHO, L. M.; ROSSIT, A. R. B; MACHADO, R. L. D. Frequencies of ABO, MNS, and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas, **Human Biology**, v. 78(2), p. 255 - 259, 2006.

CHAUDHURI, A.; POLYAKOVA, J.; ZBRZESNA, V.; WILLIAMS, K.; GULATI, S.; POGO, A. O. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 10793 - 10797, 1993.

CHITMIS, C. E; BLACKMAN, M. J. Host cell invasion by malaria parasites. **Parasitology**, v.16, p. 411-415, 2000.

CHOTIVANICH, K.; UDOMSANGPETCH, R.; SIMPSON, J, A.; NEWTON, P.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J.Parasite multiplication potential and the severity of falciparum malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181 (3) p. 1206-1209, 2000.

CHUNG, W. Y.; GARDINER, D. L.; HYLAND, C.; GATTON, M.; KEMP, D. J.; TRENHOLME, K. R. Enhance invasion of blood group A1 erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **Molecular Biology and Parasitology**, v. 144, p. 128 - 130, 2005.

COWMAN, B.; CRABB, A. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**; v. 124, p. 755 - 766, 2006.

CSERTI, C. M.; DZIK, W. H. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. **Blood**, v. 110(7), p. 2250-2258, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DANIELS, G. Blood group polymorphisms: molecular approach and biological significance. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 4, p. 383-390, 1997.

DANIELS, G.; **Human Blood Groups**, cap. 2, Ed. Blackwell Science, 1995.

DOLAN, S. A.; MILLER, L. H.; WELLEMS, T. E. Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 86, p. 618 - 624, 1990.

DURASINGH, M. T.; MAIER, A. G.; TRIGLIA, T.; COWMAN, A. F. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 4796 - 4801, 2003.

DVORAK, J. A.; MILLER, L. H.; WHITEHOUSE, W. C.; SHIROISHI, T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science**; v. 187, p. 748 - 750. 1975.

FACER, C. A.; BROWN, J. ABO blood groups and falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73 (5) p. 599 – 600, 1979.

FANG, X. D.; KASLOW, D. C.; ADAMS, J. H.; MILLER, L. H. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 44, p. 125 - 132, 1991.

FIELD, J. W. Blood examination and prognosis in acute falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43 p. 33 – 48, 1949.

FISCHER, P. R.; BOONE, P. Severe malaria associated with blood group **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58(1), p.122 - 123, 1998.

FORD, L.; LOBO, C. A.; RODRIGUEZ, M.; ZALIS, M. G.; MACHADO, R. L. D.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; COUTO, A. R.; ENYONG.P. A.; LUSTIGMAN, S. Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* invasion ligand proteins in individuals living in malaria-endemic areas in Brazil and Camerron. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77 (5), p. 977 - 983, 2007.

FOWLER, R. E.; MARGOS, G.; MITCHELL, G. N. The cytoskeleton and motility in apicomplexan invasion. **Advances Parasitology**, v. 56, p. 213 - 263; 2004.

FRY, A. E.; GRIFFITHS, M. J.; AUBURN, S.; DIAKITE, M.; FORTON, J. T.; GREEN, A.; RICHARDSON, A.; WILSON, J.; JALLOW, M.; SISAY-JOOF, F.; PINDER, M.; PESHU, N.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K.; MOLYNEUX, M. E.; TAYLOR, T. E.; ROCKETT, K. A.; KWIATKOWSKI, D. P. Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Plasmodium falciparum malaria. **Human Molecular Genetics**, v. 17 (4), p. 567 - 576, 2008.

FUGIKAHA, E.; FORNAZARI, P. A.; PENHALBEL, R. S.; LORENZETTI, A.; MAROSO, R. D.; AMORAS, J. T.; SARAIVA, A. S.; SILVA, R. U.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; MATTOS, L. C.; ROSSIT, A. R.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L.; Molecular screening of Plasmodium sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49 (1), p. 01 - 04, 2007.

GALINSKI, M. R.; MEDINA, C. C.; INGRAVALLO, I.; BARNWELL, J. W. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell**, v. 69, p. 1213 - 1226, 1992.

GUERREIRO, J. F.; MAIA, E. A. C. F. ABO and Rh groups, migration and estimates of racial admixture for the population of Belém, state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11 (1), p. 171 - 186, 1988.

GUPTA, M. & RAI CHOWDHURI, A. N. Relationship between ABO blood groups and malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, p. 157 - 162, 1977.

HARRIS, J. B.; KHAN, A. I.; LAROCQUE, R. C.; DORER, D. J.; CHOWDHURY, F.; FARUQUEA, S. G.; SACK, D.A.; RYAN, E. T.; QADRI, F.; CALDERWOOD, S. B. Blood group, immunity and risk of infection with *Vibrio cholerae* in an Area of endemicity. **Infection and Immunity**, v.73 (11), p. 7422 - 7427, 2005.

HENRY, J.B. **Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19. ed. Ed. Manole, 1999.

HILL, A. S. V. Malaria resistance genes: a natural selection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p 225 - 232, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE – Cidades: int. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidades>>. Acesso em 19 dezembro de 2007.

KANBAY, M.; GÜR, G.; ARSLAN, H.; YILMAZ, U.; BOYACIOGLU, S. The relationship of ABO blood group, age, gender, smoking, and *Helicobacter pylori* infection. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 1214 - 1217, 2005.

KIRCHGATTER, K.; PORTILLO, H. DEL A. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. **Molecular Medicine**, v. 8 (1) p. 16 - 23, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KIRCHGATTER, K.; PORTILLO, H. DEL A. Clinical and molecular aspects of severe malaria. **Annals of Brazilian Academy of Sciences**, v. 77 (3) p. 455 - 475, 2005.

LELL, B.; MAY, J.; SCHMIDT-OTT, R. J.; LEHMAN, L. G.; LUCKENER, D.; GREVE, B.; MATOUSEK, P.; SCHMID, D.; HERBICH, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; MEYER, C. G.; BIENZLE, U.; KREMSNER, P. G. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 794 - 799, 1999.

LOBO, C. A.; FRAZAO, K.; RODRIGUEZ, M.; REID, M.; ZALIS, M.; LUSTIGMAN, S. Invasion profiles of Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*: phenotypic and genotypic analyses. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5886 - 5891, 2004.

LORENZETTI, A.; FORNAZARI, P. A.; DOMINGOS, A. C. B.; PENHALBEL, R. S. R.; FUGIKAHA, É.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; FRAGA, V. D.; MORAN, L.C.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; COUTO, V. S. C. D.; MACHADO, R. L. D. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. **Acta Tropica**, v. 107(1), p.8 – 12, 2008.

LOSCERTALES, M. P.; BRABIN, B. ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria? **Malaria Journal**, v. 5, p. 72, 2006.

LOSCERTALES, M. P.; OWENS, S.; O'DONNELL, J.; BUNN, J.; BOSCH-CAPBLANCH, X.; BRABIN, B. J. ABO blood group phenotypes and *Plasmodium falciparum* malaria: unlocking a pivotal mechanism. **Advances Parasitology**, v. 65, p. 1 - 50, 2007.

MACAPÁ, PREFEITURA, Conheça Macapá: int. Disponível em: <<http://www.prefeiturademacapa.ap.gov.br>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2008.

MAIER, A. G.; DURAISINGH, M. T.; REEDER, J. C.; PATEL, S. S.; KAZURA, J. W.; ZIMMERMAN, P. A. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. **Nature Medicine**, v. 9, p. 87 - 92, 2003.

MATTOS, L. C.; CINTRA, J. R.; SANCHEZ, F. E.; SILVA, R. C. M. A.; RUIZ, M. A.; MOREIRA, H. W. ABO, Lewis secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus. **São Paulo Medical Journal**, p. 55 - 58, 2002.

MATTOS, L. C.; SANCHEZ, F. E.; CINTRA, J. R.; SALLES, A. B. C. F.; DOMINGOS, C. R. B.; MOREIRA, H. W. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, p. 15 - 22, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MCKENZIE, F. E.; WONGSRICHANALAI, C.; MAGILL, A. J.; FORNEY, J. R.; PERMPANICH, B.; LUCAS, C.; ERHART, L. M.; O'MEARA, W. P.; SMITH, D. L.; SIRICHAISINTHOP, J.; GASSER, R. A. JR. Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. **Journal Parasitology**, v. 92 (6), p. 1281 - 1285, 2006.

MENENDEZ, C.; FLEMING, A.; ALONSO, P.L. Malaria-related Anemia. **Parasitology Today**, v. 16 (11), p. 469 – 475, 2000.

MILLER, L. H.; AIKAWA, M.; JOHNSON, J. G.; SHIROISHI, T. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 149, p. 172 - 184, 1979

MONTOYA, F.; RESTREPO, M.; MONTOYA, A. E.; ROJAS, W. Blood Groups and Malaria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 33 - 38, 1994.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10. ed, p 134 - 135. Ed. Ateneu, 2002.

NORONHA, E.; ALECRIM, M. G.; ROMERO, G. A.; MACÊDO, V. Clinical study of falciparum malaria in children in Manaus, AM, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33 (2) p. 185 - 190, 2000.

NOVARETTI, M. C. Z.; DOMINGUES, A. E.; MANHANI, R.; PINTO, E. M.; DORLBIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D. A. F. *ABO* genotyping in leukemia patients reveals new *ABO* variant alleles. **Genetics and Molecular Research**, v. 7(1), p. 87 - 94, 2008.

NOVARETTI, M. C. Z.; DORLBIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE, D. A. F. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, p. 23 - 32, 2000.

OHASHI, J.; NAKA, I.; OHTSUKA, R.; INAOKA, T.; ATAKA, Y.; NAKAZAWA, M.; TOKUNAGA, K.; MATSUMURA, Y.; Molecular polymorphism of *ABO* blood group gene in Austronesian and non-Austronesian populations in Oceania. **Tissue Antigens**, v. 63 (4), p. 355 - 361, 2004.

OLSSON, M.L.; GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.A.; CHESTER, M.A. Molecular analysis of the O alleles at the blood group *ABO* locus in populations of different ethnic origin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, p. 779-782, 1997.

OLSSON, M.L.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.A.; CHESTER, M.A. Heterogeneity of the O alleles at the *ABO* blood group locus in Amerindians. **Vox Sanguinis**, v. 74, p. 46-50, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- PANDEY, K.C.; SINGH, S.; PATTNAIK, P.; PILLAI, C. R.; PILLAI, U.; LYNN, A. Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 123, p. 23 - 33, 2002.
- PANT, C.S.; SRIVASTAVA, H.C.; YADAV, R.S.; Prevalence of malaria and ABO groups in a Seaport Area in Raigad, Maharashtra. **Indian Journal of Malariology**, v. 35, p. 225 - 227, 1998.
- PATHIRANA, S. L.; ALLES, H. K.; BANDARA, S.; PHONE KYAW, M.; PERERA, M. K.; WICKREMASINGHE, A. R.; MENDIS, K. N. ABO-blood-group-types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria, **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.99 (2), p. 119 - 124, 2005.
- PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; GONTIJO, N. F.; MEDEIROS, A. M.; RIBEIRO, J. C. C. DNA bioprints simple non-isotopic DNA fingerprint with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, p. 14 - 52, 1991.
- PERRY, H. E.; FRANKLIN, R. A.; BRAY, S. J.; LO, M. K.; SVENSSON, L. A. C.; HENRY, S. M. A novel study of association between *Neisseria gonorrhoeae* and the human carbohydrate blood groups. **Immunohematology**, v. 23 (3), p.100 - 104, 2007.
- PINZÓN, C. G.; CURTIDOR, H.; BERMÚDEZ, A.; FORERO, M.; VANEGAS, M.; RODRÍGUEZ, J.; PATARROYO, M. E. Studies of *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated membrane antigen (RAMA) protein peptides specifically binding to human RBC. **Vaccine**, v. 26, p. 853 - 862, 2008.
- PONCE DE LEÓN, P.; VALVERD, J.; ABO system: molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45 (2), p. 107 - 108, 2003.
- PORTO VELHO, PREFEITURA, Principal: int. Disponível em: <<http://www.portovelho.ro.gov.br>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2008.
- ROWE, J. A.; HANDEL, I. G.; THERA, M. A.; DEANS, A. M.; LYKE, K. E.; KONÉ, A.; DIALLO, D. A.; RAZA, A.; KAI, O.; MARSH, K.; PLOWE, C. V.; DOUMBO, O. K.; MOULDS, J. M. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104 (44), p. 17471 - 17476, 2007
- SALARU, N. N.; OTTO, P. A. Blood groups in a large sample from the city of São Paulo (Brazil): allele and haplotype frequencies for MNSs, Kell-Cellano, Rh and ABO blood systems. **Revista Brasileira de Genética**, v. 12 (2), p. 625 - 643, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SANTOS, S. E. B.; SALAZANO, F. M.; FRANCO, M. H. L. P.; FREITAS, M. J. M. Mobility, genetic markers, susceptibility to malaria and race mixture in Manaus, Brazil. **Journal of Human Evolution**, v. 12, p. 373 - 381, 1983.

SCHOROEDER, M.L.; RAYNER, H.L. Red cell, platelet, and white cell antigens. **In Wintrobe's Clinical Hematology**. Philadelphia – London. LEA & FEBIGER, p. 617 - 624, 1993.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) – Malária. **Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal**. Dados de 2004 a 2006. Dados atualizados em 17 de abril de 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) – Malária. **Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal**. Dados de 01 de janeiro de 2007 a 21 de dezembro de 2007. Dados atualizados em 15 de fevereiro de 2008.

SHARARA, A.,I.; ABDUL-BAKI, H.; ELHAJJ, I.; KREIDIEH, N.; KFOURY BAZ, E. M. Association of gastroduodenal disease phenotype with ABO blood group and *Helicobacter pylori* virulence-specific serotypes. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. 829 - 833, 2006.

SHERMAN, I. W. **Malaria Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection**. Washington, 1998.

SINGH, N.; SHUKLA, M. M.; UNIYAL, V. P.; SHARMA, V. P. ABO blood groups among malaria cases from district Mandla, Madhya Pradesh. **Indian Journal of Malariology**, v. 32 (2) p. 59 - 63, 1995.

THAKUR, A.; VERMA, I. C. Malaria and ABO blood groups. **Indian Journal of Malariology**, v. 29 (4) p. 241 - 244, 1992.

UDOMSANGPETCH, R.; TODD, J.; CARLSON, J.; GREENWOOD, B. M. The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum* infected red cells. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 149 - 153, 1993.

UDOMSANGPETCH, R.; WÄHLIN, B.; CARLSON, J.; BERZINS, K.; TORII, M.; AIKAWA, M.; PERLMANN, P.; WAHLGREN, M. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 1835 - 1840, 1989.

VAFA, M.; TROYE-BLOMBERG, M.; ANCHANG, J.; GARCIA, A.; MIGOT-NABIAS, F. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. **Malaria Journal**, v. 7, p. 1 - 9, 2008.

VOGEL. ABO blood group and disease. **American Society of Human Genetic**, p. 464 - 475, 1970.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WICKRAMARACHCHI, T.; DEVI, Y. S.; MOHMMED, A.; CHAUHAN, V. S.; Identification and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* merozoite apical protein involved in erythrocyte binding and invasion. **PLoS ONE**, v. 3 (3) e1732, 2008.

YAMAMOTO, F. Molecular Genetics of ABO. **Vox Sanguinis**, v. 78 (2), p. 91 - 103, 2000.

YAMAMOTO, F.; HAKOMORI, S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B tranferases is based on amino acid substitutions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 19257 - 19262, 1990.

YAMAMOTO, F.; McNEILL, P. D.; KOMINATO, Y.; YAMAMOTO, M.; HAKOMORI, S.; ISHIMOTO, I.; NISHIDA, S.; SHIMA, M.; FUJIMURA, Y. Molecular genetic analysis of ABO blood group system: 4 another type of O allele. **Vox sanguinis**, v. 64, p. 175 - 178, 1993.

YAMAMOTO, F.; McNEILL, P.D.; HAKOMORI, S. Human histo-blood group A² transferase coded by A² allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 187, p. 366 - 374, 1992.

ZELINSKI, T. Chromosomal Localization of Human Blood Group Genes. In Molecular and Fundamental Aspects of Blood Group Antigens. Bethesda, MD. **American Association of Blood Banks**, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1



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

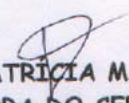
Parecer n.º 214/2002

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

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

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


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

ANEXO 2

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



**REVISTA DA
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MEDICINA TROPICAL**



MA047**IDENTIFICAÇÃO E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DE INFECÇÕES MISTAS DO *PLASMODIUM FALCIPARUM* NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

CARVALHO DB¹, LORENZETTI A¹, FORNAZARI PA¹, BONINI-DOMINGOS AC¹, D'ALMEIDA COUTO VSC³, CAVASINI CE¹, ROSSIT ARB¹, MACHADO RLD¹

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo; ²Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo; ³Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará. e-mail: ricardomachado@famerp.br

Objetivo: Determinamos a prevalência de infecções mistas do *Plasmodium falciparum* por diagnóstico molecular e levantamos questões sobre sua importância nos aspectos clínicos em pacientes de quatro diferentes áreas da Amazônia brasileira. **Material e Métodos:** Foram analisadas 115 amostras de sangue humano proveniente da Amazônia Brasileira (Macapá/Ap, Porto Velho/Ro, Novo Repartimento/Pa e Plácido de Castro/Ac), microscopicamente positiva para *P. falciparum* pela gota espessa. Foi utilizado um protocolo de PCR semi-aninhado com oligonucleotídeos espécie-específicos. A independência entre as proporções foi determinada pelo teste do Qui-quadrado e o teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Foram identificados 73,03% de infecções simples pelo *P. falciparum*, e também foram observadas 26% de infecções duplas e 0,87 de infecções triplas envolvendo o *P. vivax* e o *P. malariae*. Não houve correlação significativa entre as co-infecções do *P. falciparum* e as áreas estudadas. Foi observada associação positiva entre as infecções mistas com o *P. falciparum* e a redução de manifestações clínicas. **Conclusão:** Nossos resultados confirmam que co-infecções com o *P. falciparum* acontecem freqüentemente na Amazônia brasileira e que estas estão sub-estimadas. Além disso, pontuamos a necessidade de melhora do diagnóstico microscópico no campo ou a mudança para uma metodologia mais acurada para melhor diferenciar as espécies de Plasmodio, desde que é essencial para a escolha do tratamento, bem como para o controle desta nosologia. Maiores investigações são necessárias para estabelecer o papel de infecções mistas com o *P. falciparum* na severidade da doença.

Fonte Financiadora: Fapesp e CNPq

ANEXO 3

Vol. 41 Suplemento I, 2008
ISSN-0037-8682



REVISTA DA
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MEDICINA TROPICAL

44^o Congresso da
Sociedade
Brasileira de
Medicina
Tropical

Brinco-de-Princesa,
Fruchosa-Royal (Vell.) Murz

2^o Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul
3^o Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa

DP508**ASSOCIAÇÃO ENTRE O SISTEMA HISTO-SANGÜÍNEO ABO E A INFECÇÃO POR PLASMODIUM FALCIPARUM NA AMAZÔNIA BRAZILEIRA**

CARVALHO, DANILA BLANCO (1,2); CAVASINI, CARLOS EUGÊNIO (2); COSIMO, ALEXANDRE (2); BONNINI-DOMINGOS, ANA CAROLINA(3); D'ALMEIDA-COUTO, VANJA SUELI CALVOSA (4); ROSSIT, ANDRÉA REGINA BAPTISTA (1,2); MATTOS, LUIS CARLOS (5); MACHADO, RICARDO LUIZ DANTAS (1,2).

1. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, IBILCE/UNESP, SP; 2. Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP; 3. Laboratório de Doenças Genéticas e Hemoglobinopatias, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP; 4. Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará. 5. Laboratório de Imunogenética, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP.

Objetivos: Este estudo avaliou a associação entre os genótipos do sistema histo-sangüíneo ABO e a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* em indivíduos da Amazônia brasileira. **Material e Métodos:** A genotipagem ABO foi feita pelo método PCR/ RFLP em amostras de DNA genômico de 95 indivíduos maláricos e 144 não maláricos, oriundos de Macapá/AP, Belém/PA, Porto Velho/RO e Rio Branco/AC. A presença ou ausência de infecção por *P. falciparum* foi confirmada por métodos moleculares em todas as amostras analisadas. Naquelas provenientes dos doadores de sangue foi investigada a presença de anticorpos anti-CSP e anti-MSP, além da presença do *P. falciparum* pelo método PCR/RFLP. A associação entre os resultados foi determinada com o uso do teste Qui-quadrado e do teste Exato de Fisher, adotando-se o nível de significância de 5%. **Resultados Parciais:** Todos os doadores de sangue foram negativos para anticorpos anti-MSP e para a presença do *P. falciparum*. A maioria deles mostrou reatividade para os anticorpos anti-CSP. O grupo sangüíneo O foi prevalente entre os doadores enquanto os grupos sangüíneos não O (A, B ou AB) foram prevalentes entre os pacientes ($p = 0,0034$). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem a ocorrência de associação entre o sistema histo-sangüíneo ABO e infecções por *P. falciparum*, e indicam um possível efeito protetor do grupo O contra a infecção por esse parasito. Maiores investigações são necessárias para elucidar a importância desse marcador genético na severidade da malária causada por *P. falciparum*. Fonte Financiadora: FAPESP, CNPq

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)