

Frecuencia de polimorfismos HLA-DRB1 en pacientes brasileños con malaria por *Plasmodium vivax* y en donantes de sangre de la Región Amazónica

Frequência de polimorfismos HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com malária por *Plasmodium vivax* e em doadores de sangue da Região Amazônica

The frequency of HLA-DRB1 polymorphisms in Brazilian *Plasmodium vivax* malaria patients and in blood donors from the Amazon Region

Luciane Moreno Storti-Melo

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Cláudia Regina Bonini-Domingos

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Daniela Reis da Costa

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Andrea Regina Baptista Rossit

Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Wanessa Christina Souza-Neiras

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Luiz Carlos de Mattos

Laboratório de Imunohematologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Gustavo Capatti Cassiano

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Ricardo Luiz Dantas Machado

Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

RESUMEN

Este estudio evaluó la frecuencia de diferentes alelos HLA-DRB1 en individuos infectados por *Plasmodium vivax* y en donantes de sangre saludables provenientes de áreas endémicas de malaria de Brasil. Se realizó un genotipado de baja resolución de los alelos HLA-DRB1 en 73 pacientes con malaria y en 29 donantes de sangre saludables. Los alelos más frecuentes en individuos del norte de Brasil fueron HLA-DRB1*04, *08, *07 y *13. La frecuencia de HLA-DRB1*07 fue más grande en individuos infectados con malaria que en el grupo control, lo que refuerza la hipótesis de que ese alelo desempeña un papel importante en la susceptibilidad a la malaria. Esta investigación suministra nuevas informaciones sobre un factor potencial de susceptibilidad a la malaria por *P. vivax* en una población brasileña naturalmente expuesta a la enfermedad.

Palabras clave: Malaria; *Plasmodium vivax*; Genes Clase II del Complejo de Histocompatibilidad (MHC).

INTRODUCCIÓN

Los antígenos de leucocitos humanos HLA clase II fueron originariamente descritos como genes involucrados en la respuesta inmune, pues diferentes alelos de estos genes influyen reconocidamente en la producción de anticuerpos¹. Hay estudios asociando estos alelos a enfermedades del sistema inmunológico, como leucemia² y vitiligo³. Además, estudios poblacionales han relatado la asociación de ciertos alelos HLA a la susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas, incluyendo la

hanseníasis⁴, la leishmaniasis mucosa⁵, la tuberculosis⁶ y la hepatoesplenomegalia en casos de esquistosomosis⁷. Pocos estudios han evaluado la influencia de los alelos HLA sobre la inmunidad a la malaria. Los autores de dos estudios (publicados en 1989) no consiguieron establecer una relación entre los tipos de HLA-DR y la respuesta inmunológica contra la proteína circumsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*⁸ y a los epítomos del esporozoito y de los gametocitos en Papúa Nueva Guinea⁹. Sin embargo, dos años después, se descubrió que la protección contra la malaria severa causada por *P. falciparum* estaba asociada a la presencia de los alelos HLA-Bw53, DRB1*1302 y DQB1*0501 en niños africanos¹⁰. Hasta finales del siglo XX, algunos alelos HLA-DR ya había sido asociados a un aumento de la respuesta de anticuerpos contra Nt47 (porción amino terminal p126)¹¹, contra el antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)¹² de *P. falciparum* y contra la repetición de la proteína CSP del *P. vivax* VK247¹³.

Correspondencia / Correspondência / Correspondence :

Luciane Moreno Storti-Melo

Rua José Duran, nº 112. Bairro: Bosque da Felicidade

CEP: 67030-000 São José do Rio Preto-São Paulo-Brasil

Tel.: +55 (17) 3014-5396

E-mail: stortilu@yahoo.com.br

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Lota Moncada

La mayoría de los estudios que investigan la influencia de los alelos HLA sobre la respuesta inmunológica contra la malaria ha sido conducida con antígenos de *P. falciparum* debido a la mayor mortalidad atribuida a la malaria causada por este parásito. No obstante, *P. vivax* es la especie responsable por la mayor parte de los casos de malaria en las Américas del Sur y Central. En Brasil, esta especie responde por más de 80% de los casos clínicos registrados en la Región Amazónica¹⁴. Por eso, es importante comprender los factores que controlan la respuesta inmunológica a los candidatos a antígeno de vacunas, como las proteínas de fase asexual sanguínea de *P. vivax*, en individuos naturalmente expuestos al parásito. En este estudio, se evaluó la frecuencia alélica de HLA-DRB1 en muestras de individuos infectados por *P. vivax* y de donantes de sangre saludables provenientes de áreas endémicas de malaria en Brasil.

MATERIALES Y MÉTODOS

SUJETOS DEL ESTUDIO Y LOCALIDADES

Los pacientes seleccionados para este estudio cumplieron con los siguientes criterios: buscaron atención médica debido a la presencia de síntomas clínicos de malaria, tenían más de 18 años de edad y presentaban un diagnóstico positivo de malaria por *P. vivax* por el método de gota espesa. Fue firmado, por cada paciente, el término de libre consentimiento esclarecido antes de la colecta de muestras de sangre periférica. Los sujetos de la investigación fueron distribuidos en cuatro áreas endémicas de malaria en Brasil: Macapá, Estado de Amapá (00°02'20" S, 51°03'59" W); Novo Repartimento, Estado de Pará (04°19'50" S, 49°47'47" W); Porto Velho, Estado de Rondônia (-08°45'43" S, 63°54'14" W) y Plácido de Castro, Estado de Acre (10°16'33" S, 67°09'00" W). Macapá es la capital del Estado de Amapá, localizada en el margen del Río Amazonas, en un área de bosque tropical. Su población era estimada en 366.486 habitantes y su índice parasitario anual (IPA) fue de 6,0 en 2009. Porto Velho está localizada en el Estado de Rondônia, en lo alto de la Cuenca Amazónica. En 2010, Porto Velho tenía cerca de 383.425 habitantes y un IPA de 53,7. Plácido de Castro se localiza en la frontera de los Estados de Rondônia y Amazonas y tenía una población de 18.235 habitantes. El IPA de Plácido de Castro era de 20,6 en 2009. Novo Repartimento es un área de prospección de oro localizada al sudeste del Estado de Pará. Su población era estimada en 55.759 habitantes y presentó un IPA de 15,4 en 2010. Todos esos lugares se caracterizaban por presentar clima tropical sin una estación seca, con una precipitación promedio mensual de más de 60 mm.

El grupo control se compuso de donantes de sangre que, de acuerdo a las normas brasileñas que regulan la donación de sangre y los requisitos de inclusión de este estudio, presentaron las siguientes características: edad superior a 18 años; habían nacido en alguna de las ciudades del área de estudio; declararon no tener histórico de malaria y no presentaban ningún síntoma de la enfermedad durante la entrevista inicial; y los resultados en examen por gota espesa fueron negativos. Se utilizaron métodos de diagnóstico molecular para la comparación de las frecuencias de HLA-DRB. Los sujetos de los dos

grupos no presentaron diferencias estadísticamente significantes a respecto del promedio de edad o etnia, lo que indica una buena correspondencia entre ellos (análisis exacto de Fisher, $p > 0.05$). Las muestras de ADN fueron extraídas de sangre periférica congelada usando el Easy-ADN™ Extraction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); el diagnóstico de malaria fue confirmado por medio de la reacción en cadena de polimerasa *semi-nested* (*semi-nested* PCR) con *primers* de ADN-r específicos de subunidades pequeñas¹⁵. El protocolo de este estudio fue analizado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil (N. 235/2006).

ALELOS HLA CLASE II

Las muestras de ADN de los pacientes maláricos ($n=73$) y de los sujetos del grupo control ($n = 29$) fueron sometidas a genotipado de los alelos HLA-DRB1. La concentración de ADN se midió usando un espectrofotómetro a 260 y 280 nm, y se utilizó una concentración de 100 ng/mL para realizar el genotipado de baja resolución de HLA-DRB1 por PCR con *primers* específicos de secuencia (PCR-SSP), como previamente descrito¹⁶.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias alélicas fueron calculadas por la fórmula $AF = a/N$, en la cual a es el número de muestras positivas para un alelo específico y N es el número total de alelos en la población estudiada¹⁷. Se utilizó el programa R, versión 2.8.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, <http://www.r-project.org>) para realizar los análisis estadísticos. El equilibrio de Hardy-Weinberg se analizó conforme lo recomendado por Guo y Thompson¹⁸. La heterogeneidad de las frecuencias alélicas HLA entre los grupos control y malárico se evaluó por la prueba Qui-cuadrado, con la prueba de corrección de Yates o la prueba exacta de Fisher. Los valores de p por debajo de 0.05 fueron considerados estadísticamente relevantes.

RESULTADOS

El genotipado de los alelos HLA-DRB1 fue realizado en un total de 102 individuos infectados y no infectados (control) provenientes de cuatro áreas endémicas del norte de Brasil. Como descrito en la tabla 1, se encontraron 13 alelos diferentes; las frecuencias observadas para cada individuo y para cada grupo también se presentan en la tabla 1. Los alelos más frecuentes en ambos grupos fueron HLA-DRB1*04, *08, *07 y *13. En los individuos infectados, los alelos más frecuentes fueron HLA-DRB1*04, *08 y *13, seguidos de HLA-DRB1*07. En el grupo control, HLA-DRB1*04, *08, y *13 también fueron los más frecuentes, pero HLA-DRB1*07 fue uno de los grupos de alelos menos frecuentes. Cuando comparados los dos grupos de individuos, la frecuencia de HLA-DRB1*07 fue mayor en el grupo infectado que en el control; esta diferencia fue considerada estadísticamente significativa ($p = 0.006$, prueba de Qui-cuadrado con el índice de corrección de Yates). Los *loci* estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población estudiada (Pearson $\chi^2 = 0.5$, $p = 0.799$).

Tabla 1 – Frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en muestras colectadas en la Amazonía brasileña, abarcando a los individuos infectados con malaria y el grupo control

Alelos HLA-DRB-1	Frecuencias de alelos		
	Total de muestras (n=102)	Grupo malárico (n=73)	Grupo control (n=29)
*01	0,147	0,151	0,138
*03	0,196	0,192	0,207
*04	0,304	0,315	0,276
*07	0,255	0,342 [†]	0,034
*08	0,265	0,260	0,276
*09	0,029	0,014	0,069
*10	0,078	0,068	0,103
*11	0,098	0,110	0,069
*12	0,029	0,028	0,034
*13	0,235	0,220	0,276
*14	0,147	0,136	0,172
*15	0,127	0,110	0,172
*16	0,088	0,054	0,172

n= número de muestras, Pruebas de Qui-cuadrado con corrección de Yates, $\chi^2 = 7,521$, $p = 0,006$, comparación entre los grupos malárico y control.

DISCUSIÓN

Las moléculas de HLA clase II son componentes esenciales de la respuesta inmune adaptativa. Existen estudios anteriores que señalan una correlación entre alelos HLA y la susceptibilidad a diversas enfermedades, incluso malaria^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13}. Además, variaciones étnicas y/o geográficas aparentemente desempeñan un papel importante en esta correlación. Brasil es un país de dimensiones continentales y sus habitantes presentan una variada composición genética. Esta diversidad resulta en una población mestiza compuesta por contribuciones de tres importantes grupos: caucásicos, africanos y amerindios¹⁹. Debido a su distinto histórico de colonización, cada región del país presenta diferentes niveles de prevalencia para los tres grupos étnicos^{20,21}. Encontramos una alta frecuencia de los alelos HLA-DRB1*04 en los sujetos estudiados, lo que guarda semejanza con los resultados presentados en estudios realizados anteriormente^{22,23}. Como este alelo es característico de pueblos indígenas de las Américas, su prevalencia refleja la contribución de los amerindios a la composición genética de la población brasileña, especialmente en el norte del país²⁴. Además, la alta frecuencia de HLA-DRB1*04, observada tanto en los individuos infectados como en los individuos saludables, indica que este alelo no está asociado a la susceptibilidad o a la protección contra la malaria por *P. vivax*. Por otro lado, la frecuencia mucho más alta de HLA-DRB1*07 en el grupo de individuos infectados sugiere la participación de este alelo en la susceptibilidad a la malaria. Oliveira-Ferreira et al¹³ detectó una baja respuesta inmune inducida por HLA-DRB1*07 contra la región repetitiva de la CSP del *P. vivax* VK210. En realidad, existen estudios con vacunas virales^{22,25} y candidatas a vacunas con CSP de *P. falciparum*²⁶ que han demostrado que este alelo no consigue activar una respuesta inmune consistente.

A pesar de que fueron observadas diferencias en las frecuencias HLA-DRB1*07 entre individuos infectados y no infectados, no pudo establecerse un mecanismo en el cual

este alelo deba funcionar en la susceptibilidad a la malaria. Pueden existir muchas moléculas de HLA asociadas a la malaria humana, aunque haya sido posible analizar apenas los alelos HLA-DRB1 en este estudio. El análisis de una única molécula de HLA no puede reflejar completamente como las múltiples variaciones genéticas afectan a la región MHC. Una posibilidad es la de que los alelos MHC estén en desequilibrio de ligación con otros genes involucrados en la susceptibilidad a la malaria por *P. vivax*. Además, pacientes homocigotos para el alelo HLA-DRB1*07 no podrían ser distinguidos de portadores debido a las limitaciones referentes a las colectas en este estudio.

En la Amazonia brasileña, la malaria predomina en condiciones meso endémicas con una gran variedad de formas de transmisión^{14,27}. Por eso, la endemicidad de la malaria podría ser vista como una presión selectiva para la manutención de las frecuencias genotípicas de las moléculas de HLA. Es preciso una investigación de otros alelos HLA asociados a la malaria, realizando un análisis serológico, clínico y epidemiológico de una muestra más amplia. Ese estudio debe evaluar, también, la influencia de otras enfermedades infecciosas. La epidemiología de las enfermedades infecciosas está condicionada por una interrelación compleja entre el parásito, su vector y el ser humano. El proceso coevolutivo parásito-huésped puede ser visto como una carrera armamentista, en el que los cambios con objetivos de adaptación genética en uno se acompañan de alteraciones en el otro, en este caso en poblaciones amazónicas genéticamente distintas²⁸.

CONCLUSIÓN

Se descubrió que la frecuencia alélica HLA-DRB1*07 fue mayor en los pacientes de malaria que en el grupo control, lo que puede sugerir que este alelo desempeñe un papel en la susceptibilidad del sistema inmunológico a la malaria por *P. vivax*. Los resultados de este estudio corroboran la necesidad de investigaciones sobre los genes ligados al complejo de histocompatibilidad. Particularmente, existe una carencia de estudios con un muestreo más amplio, bien como estudios que abarquen a individuos de áreas con diferentes índices de infección, para que se establezca de forma más exacta el papel de los alelos HLA en la susceptibilidad a los parásitos de *P. vivax* en esta región.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que participaron de este estudio; a los Drs. Carlos Eugênio Cavasini, Aline Barroso, Maria Cristina Figueredo y Mauro Tada, por la colaboración en el estudio de campo; a Juliana Cintra, por la ayuda con el genotipado de los alelos HLA; al Dr. Antônio José Cordeiro, por su participación en los análisis estadísticas; al Prof. Luiz Hildebrando Pereira da Silva, por permitir el uso de las instalaciones del Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEPEM).

APOYO FINANCIERO

Esta investigación fue financiada por la Fundación de Amparo a la Investigación del Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brasil (02/09546-1; 06/00982-4) y el Consejo Nacional para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq), Brasília, Brasil (302353/03-8; 410405/2006-0).

Frequência de polimorfismos HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com malária por *Plasmodium vivax* e em doadores de sangue da Região Amazônica

RESUMO

Este estudo avaliou a frequência de diferentes alelos HLA-DRB1 em indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* e em doadores de sangue saudáveis provenientes de áreas endêmicas de malária do Brasil. Foi realizada uma genotipagem de baixa resolução dos alelos HLA-DRB1 em 73 pacientes com malária e em 29 doadores de sangue saudáveis. Os alelos mais frequentes em indivíduos do norte do Brasil foram HLA-DRB1*04,*08,*07 e*13. A frequência de HLA-DRB1*07 foi maior nos indivíduos infectados com malária do que no grupo controle, o que reforça a hipótese de que esse alelo desempenha um papel importante na suscetibilidade à malária. Esta pesquisa fornece novas informações sobre um fator potencial de suscetibilidade à malária por *P. vivax* em uma população brasileira naturalmente exposta à doença.

Palavras chave: Malária; *Plasmodium vivax*; Genes Classe II do Complexo de Histocompatibilidade (MHC).

The frequency of HLA-DRB1 polymorphisms in Brazilian *Plasmodium vivax* malaria patients and in blood donors from the Amazon Region

ABSTRACT

We evaluated the frequency of different HLA-DRB1 alleles in *Plasmodium vivax*-infected individuals and in healthy blood donors from malaria endemic areas of Brazil. Low-resolution human leukocyte antigen-DRB1 genotyping was performed for 73 malaria patients and 29 healthy blood donors. The most frequent alleles in individuals from northern Brazil were human leukocyte antigen-DRB1*04,*08,*07 and *13. The frequency of human leukocyte antigen-DRB1*07 was higher in malaria-infected individuals than in the control group, which reinforces the theory that this allele plays an important role in susceptibility to malaria. This study offers new information about a potential susceptibility factor for *P. vivax* malaria in a Brazilian population that is naturally exposed to malaria.

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; MHC Class II genes.



REFERENCIAS

- 1 Germain RN. Antigen processing and presentation. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p. 287-340.
- 2 Ozdilli K, Oguz FS, Anak S, Kekik C, Carin M, Gedikoglu G. The frequency of HLA class I and II alleles in Turkish childhood acute leukaemia patients. *J Int Med Res*. 2010 Sep-Oct;38(5):1835-44.
- 3 Hu DY, Ren YQ, Zhu KJ, Lv YM, Cheng H, Zhang Z, et al. Comparisons of clinical features of HLA-DRB1*07 positive and negative vitiligo patients in Chinese Han population. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. In Press 2011.
- 4 Todd JR, West BC, McDonald JC. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. *Rev Infect Dis*. 1990 Jan-Feb;12(1):63-74.
- 5 Petzl-Erler ML, Belich MP, Queiroz-Telles F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Hum Immunol*. 1991 Dec;32(4):254-60.
- 6 Duarte R, Carvalho C, Pereira C, Bettencourt A, Carvalho A, Villar M, et al. HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance. *Rev Port Pneumol*. 2011 Jan;17(1):15-9.
- 7 Assaad-Khalil SH, Helmy MA, Zaki A, Mikhail MM, el-Hai MA, el-Sawy M. Some genetic, clinical and immunologic interrelations in schistosomiasis mansoni. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1993;51(6):619-26.
- 8 Brown AE, Chandanayingyong D, Fuggle SV, Webster HK. Immune responses to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in relation to HLA-DR type. *Tissue Antigens*. 1989 Sep;34(3):200-4.
- 9 Graves PM, Bhatia K, Burkot TR, Prasad M, Wirtz RA, Beckers P. Association between HLA type and antibody response to malaria sporozoite and gametocyte epitopes is not evident in immune Papua New Guineans. *Clin Exp Immunol*. 1989 Dec;78(3):418-23.
- 10 Hill AVS, Yates SNR, Allsopp CEM, Gupta S, Gilbert SC, Lalvani A, et al. Human leukocyte antigens and natural selection by malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994 Nov;346(1317):379-85.
- 11 Banic DM, Goldberg AC, Pratt-Riccio LR, Oliveira-Ferreira J, Santos F, Gras-Masse H, et al. Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 May;66(5):509-15.

- 12 Johnson AH, Lee RG, Mendell NR, Shon D, Suh YJ, Bomba-Nkolo D, et al. Human leukocyte antigen class II alleles influence levels of antibodies to the *Plasmodium falciparum* asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 2004 May;72(5):2762-71.
- 13 Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Ribeiro CT, Goldberg AC, et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop*. 2004 Sep;92(1):63-9.
- 14 Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
- 15 Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Intern*. 1997 Jul;46(2):91-5.
- 16 Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992 May;39(5):225-35.
- 17 Garavito EG. Asociación HLA y artritis reumatoidea juvenil: en busca de las bases moleculares dependiente del MHC [tese]. Colombia (CO): Universidad del Norte; 2003.
- 18 Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992 Jun;48(2):361-72.
- 19 Moraes ME, Fernandez-Viña M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens*. 1993 May;41(5):238-42.
- 20 Alves-Silva J, Silva SM, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000 Aug;67(2):444-61.
- 21 Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosomes lineages. *Am J Hum Genet*. 2001 Jan;68(1):281-6.
- 22 Pollard GA. Influenza Immunization of schoolchildren: can we interrupt community epidemics? *Pediatrics*. 1999 Jun;103(6 Pt1):1280-2.
- 23 Parolín ML, Carnese FR. HLA-DRB1 alleles in four Amerindian populations from Argentina and Paraguay. *Genet Mol Biol*. 2009 Apr;32(2):212-9.
- 24 Zago MA, Silva Júnior WA, Tavella MH, Santos SE, Guerreiro JF, Figueiredo MS. Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six variable number of tandem repeats. *Hum Hered*. 1996 Sep-Oct;46(5):274-89.
- 25 Desombere I, Willems A, Leroux-Roels G. Response to hepatitis B vaccine: multiple HLA genes are involved. *Tissue Antigens*. 1998 Jun;51(6):593-604.
- 26 Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Castro ZR, Nussenzweig RS, Schmeckpeper B, et al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *J Infect Dis*. 2000 Nov;182(5):1486-96.
- 27 Lorenzetti A, Fornazari PA, Bonini-Domingos AC, Souza R, Penhalbel R, Fugikaha E, et al. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. *Acta Trop*. 2008;107(1):8-12.
- 28 Nesse RM, Williams GC. Health and disease. In: Salzano FM, Bortolini MC, editors. The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge: Cambridge University Press; 2002. p. 165-88.

Recibido en / Recebido em / Received: 2/28/2011
Aceito en / Aceito em / Accepted: 5/17/2011