

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

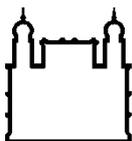
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE AMOSTRAS  
CLÍNICAS DE *Plasmodium falciparum* ISOLADAS DE INDIVÍDUOS DE  
BARCELOS - AMAZONAS UTILIZANDO O GENE QUE CODIFICA  
PARA A PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTA (*m*sp2)

MONICA PALMA CUERO

Rio de Janeiro

Janeiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

*MONICA PALMA CUERO*

Título da Dissertação

Caracterização da diversidade genética de amostras clínicas de *Plasmodium falciparum* isoladas de indivíduos de Barcelos - Amazonas utilizando o gene que codifica para a proteína de superfície do merozoíta 2 (*msp2*)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Profa. Dra. Martha Cecilia Suarez Mutis

Profa. Dra. Simone da Silva Santos

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

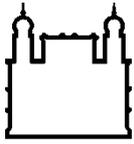
P171 Palma Cuero, Monica

Caracterização da diversidade genética de amostras clínicas de *Plasmodium falciparum* isoladas de indivíduos de Barcelos – Amazonas utilizando o gene que codifica para a proteína de superfície do Merozoíta (*msp2*) / Monica Palma Cuero. – Rio de Janeiro, 2016.  
xvi, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.  
Bibliografia: f. 56-66

1. *Plasmodium falciparum*. 2. Diversidade genética. 3. Gene *msp2*.  
4. Multiplicidade da infecção. 5. Amazonas. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**AUTOR: MONICA PALMA CUERO**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS  
DE *Plasmodium falciparum* ISOLADAS DE INDIVÍDUOS DE BARCELOS -  
AMAZONAS UTILIZANDO O GENE QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA DE  
SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTA 2 (*msp2*)**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Martha Cecilia Suarez Mutis**

**Prof. Dra. Simone da Silva Santos**

**Aprovada em: 28 / 01 / 2016**

### **EXAMINADORES:**

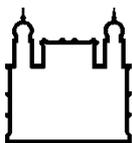
**Prof. Dra. Helena Keiko Toma Presidente** (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

**Prof. Dr. André Machado de Siqueira** (Instituto Nacional de Infectologia)

**Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino** (Instituto Oswaldo Cruz)

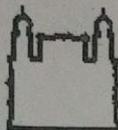
**Prof. Dra. Tainah Silva Galdino de Paula** (Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, Janeiro 28 de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Medicina Tropical de **Monica Palma Cuero**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis. Ao vigésimo oitavo dia do mês de janeiro de dois mil e dezesseis, realizou-se às dez horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Caracterização da diversidade genética de amostras clínicas de *Plasmodium falciparum* isoladas de indivíduos de Barcelos – Amazonas utilizando o gene que codifica para a proteína de superfície do Merozoita 2 (msp2)**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Helena Keiko Toma - UFRJ/RJ (Presidente), Dr. André Siqueira - INI/FIOCRUZ, Dr. Paulo Renato Rivas Totino - IOC/FIOCRUZ e como suplente: Dr<sup>a</sup>. Tainah Silva Galdino de Paula - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 28 de janeiro de 2016.

Dr<sup>a</sup>. Helena Keiko Toma (Presidente da Banca):

Dr. André Siqueira (Membro da Banca):

Dr. Paulo Renato Rivas Totino (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

A meus pais por ser meu exemplo de superação e por sempre me ajudar a cumprir cada um dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e colaboração de várias pessoas a os quais gostaria de agradecer.

A minha orientadora Doutora Martha Cecilia Suarez Mutis pela confiança, por acreditar em mim e permitir-me sonhar e sobre tudo por ajudar-me a fazer desse sonho uma realidade.

A minha Coorientadora Doutora Simone Santos da Silva por compartilhar seus conhecimentos, seu acompanhamento e apoio foram fundamentais para a elaboração deste trabalho.

Ao Doutor Dario Kalume pela ajuda do seu Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED) na fase experimental deste trabalho.

À Doutora Simone Ladeia Andrade por ter cedido as amostras de *P. falciparum* provenientes do Parque do Jaú e pelo compartilhamento de experiências de trabalho.

Aos Professores da Pós-graduação em Medicina Tropical, minha imensa gratidão por compartilhar suas experiências e seus conhecimento em cada uma de suas áreas.

Às pesquisadoras, colegas e amigos do Laboratório de Doenças parasitárias o “Malária Team”, Doutora Verônica, Renata, Tayane, Amanda, Jéssica, Hermano, Ligia, Tamara, Myrna e Deonilde pelas risadas e bons momentos de convivência.

A Vivian Franco estudante de doutorado do Laboratório de Doenças Parasitárias por ser um apoio importante desde o primeiro dia que cheguei. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, por me oferecer sua amizade sincera e por se preocupar por me animar nos momentos mais difíceis.

A Tainah, Andressa e Flavia do laboratório LIPMED pelo auxilio na estadia em seu laboratório.

Aos meus colegas e amigos de mestrado Vanessa A, Michele, Pamela, Tiara, Paulinha, Thais, Laís, Ana Cristina, Vanessa, Eliete, Felipe e Phelipe por me acolher em sua turma maravilhosa, compartilhar suas experiências, conhecimentos e sobre tudo por me ajudar no tempo de adaptação nesta cidade.

Ao pessoal do Laboratorio de Doenças Parasitarias “Chagas”, em especial Amanda e Cristina pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

A Josiane Muller por ser nossa representante perante a Pós-graduação, por sempre me ajudar a resolver as dúvidas e sobre tudo por ser esse grande apoio em cada momento.

A Vanessa Araújo minha grande amiga carioca, por me mostrar o mais lindo de sua cidade e sua gente.

Aos meus amigos Diego Montenegro e Jose Joaquin Carvajal por me apoiar sempre que precisei, por se tornar um apoio acadêmico e sobre tudo emocional.

Ao Centro de Referência Helio Fraga por sua hospitalidade no alojamento durante o tempo de desenvolvimento do meu mestrado.

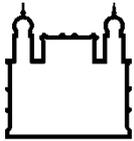
A cada um dos companheiros e amigos do alojamento: Ivan, Nadia, Maju, Liliana, Juliana, Daiane, Thayane, Laira, Neiva, Mauricio, Vubil, Catalina, Yerli e Gonzalo minha gratidão por compartilhar seus conhecimentos e experiências desde sua percepção sendo parte da regra ou da exceção.

Minha imensa gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa do Programa Convênio para Estudantes Estrangeiros (PEC-PG) indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Por último, mas não menos importante, gostaria de expressar toda minha gratidão a toda minha família, em especial, a minha mãe e meu pai por todo o amor, encorajamento e confiança que me ajudaram a alcançar este objetivo.

O navio é seguro quando está no porto,  
mas não é para isso que se fazem os  
navios.

Grace Hopper



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

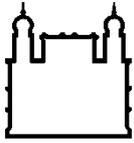
### CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Plasmodium falciparum* ISOLADAS DE INDIVÍDUOS DE BARCELOS - AMAZONAS UTILIZANDO O GENE QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DO MEROZOITA (*msp2*)

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Monica Palma-Cuero

**INTRODUÇÃO:** A complexa diversidade genética do *Plasmodium falciparum* é em parte responsável pela evasão da resposta imune do hospedeiro, pelo surgimento da resistência aos fármacos e pela dificuldade no desenvolvimento de uma vacina anti-malárica eficaz. Estudos sobre a biologia deste parasito se concentram fundamentalmente em áreas holo e hiperendêmicas de malária na África subsaariana. Trabalhos realizados na região Amazônica, ainda são escassos no que se refere à diversidade genética de populações naturais de *P. falciparum*. Este estudo analisou a diversidade genética de *P. falciparum* isolados de indivíduos provenientes da região do médio rio Negro, Amazonas utilizando como alvo o gene que codifica para a proteína de superfície do merozoíta 2. **METODOLOGIA:** O estudo foi realizado em Barcelos, um município de alto risco epidemiológico para malária com uma média anual de 5.000 casos nos últimos cinco anos (IPA médio=156,4/1000). Foram avaliadas 79 amostras isoladas de indivíduos que apresentaram malária clínica ou infecção assintomática. Os DNAs genômicos extraídos foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a confirmação do diagnóstico de infecção pelo *P. falciparum* em seguida foi feita uma PCR-nested, para amplificação da região do bloco 3 do gene *msp2* para diferenciação das famílias alélicas (3D7 e FC27) e a diversidade intra-família foi observada após digestão com a enzima *Hinfl*. **RESULTADOS:** Só foi encontrada a família 3D7 nas amostras estudadas. Dois diferentes genótipos foram encontrados circulando na área, caracterizados pela combinação dos fragmentos 16 pb, 108 pb, 349 (genotipo 1) e 16 pb, 108 pb, 400pb (genotipo 2). Foi observado que só dois indivíduos com malária clínica portavam os dois genótipos simultaneamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao comparar a presença de genótipos com sexo, grupos de idade, área rural ou urbana, antecedentes de malária previa e o desfecho clínico dos indivíduos ( $p>0,05$ ). **CONCLUSÕES:** O estudo do polimorfismo do gene *msp2* tem se mostrado como uma ferramenta útil para o estudo da diversidade genética do *P. falciparum*. No município de Barcelos a diversidade genética deste parasito foi limitada mostrando só a presença de dois genótipos circulantes e em poucos casos uma multiplicidade da Infecção de dois parasitas simultaneamente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CHARACTERIZATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF *Plasmodium falciparum* ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES OF INDIVIDUALS FROM BARCELOS- AMAZONAS USING THE GENE ENCODING THE MEROZOITE SURFACE PROTEIN (*msp2*)

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

**Monica Palma-Cuero**

**INTRODUCTION:** The complex genetic diversity of *Plasmodium falciparum* is partly responsible for the evasion of the host immune response, the emergence of drug resistance and the difficulty in developing an effective anti-malarial vaccine. Studies on the biology of this parasite are mainly concentrated in holo and hyperendemic malaria areas in sub-Saharan Africa. Research in the Amazon region, is scarce in relation to the genetic diversity of natural populations of *P. falciparum*. This study analyzed the genetic diversity of *P. falciparum* isolates from individuals of the Middle Rio Negro, Amazon in Brazil, using the gene coding for the merozoite surface protein 2 (MSP2). **METHODOLOGY:** The study was conducted in Barcelos, a malaria high epidemiological risk municipality, with an annual average of 5,000 cases in the last five years (mean IPA = 156.4 / 1000). We evaluated 79 samples isolated from subjects presenting clinical malaria or asymptomatic infection. The extracted genomic DNA was subjected to polymerase chain reaction (PCR) to confirm the diagnosis of infection with *P. falciparum*. A PCR-nested was made for amplification of the gene *msp2* block 3 region for differentiation of allelic families (3D7 and FC27); intrafamily diversity was observed after digestion with the enzyme *HinfI*. **RESULTS:** Only family 3D7 was observed in the samples. Two different genotypes were found circulating in the area, characterized by the combination of fragments 16 bp, 108 bp, 349 (genotype 1) and 16 bp, 108 bp, 400bp (genotype 2). It was observed that only two individuals with clinical malaria carried two genotypes simultaneously. No statistically significant differences were found when comparing the presence of genotypes with sex, age groups ( $p > 0,05$ ). Only two individuals carried out two different genotypes simultaneously (MOI). **CONCLUSIONS:** The study of polymorphism of the *msp2* gene has been shown to be a useful tool for the study of genetic diversity of *P. falciparum*. The genetic diversity and MOI is very limited in this area with the presence of only two circulating genotypes.

## Índice

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Epidemiologia da Malária</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Malária: um problema de Saúde Pública no mundo .....	3
2.1.2 Malária no continente americano.....	4
2.1.3 Malária no Brasil.....	6
<b>2.2 Ciclo Biológico do Plasmodium sp.</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Ciclo no hospedeiro vertebrado.....	13
2.2.2 Ciclo no vetor (Esporogonia) .....	14
<b>2.3 Classificação Epidemiológica da Malária</b> .....	<b>9</b>
2.3.1 Intensidade da Transmissão.....	10
2.3.2 Estabilidade da Transmissão.....	10
2.3.3 Estratificação epidemiológica de risco da malária .....	11
<b>2.4 Malária no município de Barcelos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5 Infecção Assintomática</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6 Diversidade genética do <i>Plasmodium falciparum</i></b> .....	<b>16</b>
<b>2.7 Aquisição da Imunidade ao <i>Plasmodium falciparum</i></b> .....	<b>18</b>
<b>2.8 Multiplicidade da Infecção</b> .....	<b>17</b>
<b>2.9 Diversidade Genética do gene que codifica à Proteína de Superfície do Merozoíta 2 (<i>m</i>sp2)</b> .....	<b>18</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>21</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>5.1. Área de estudo</b> .....	<b>24</b>
<b>5.2.Aspectos éticos</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2.1 Desenho do estudo</b> .....	<b>25</b>
5.2.1.1 Busca Passiva .....	25

5.2.1.2 Busca Ativa.....	25
<b>5.2.2. Critérios de Inclusão e exclusão .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2.3. Definição de Casos .....</b>	<b>26</b>
5.2.3.1. Caso de Malária por <i>P. falciparum</i> .....	26
5.2.3.2. Caso de Infecção Assintomática .....	26
<b>5.2.4. Amostras .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.5. Extração de DNA Genômico .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.6. PCR para Diagnóstico Molecular de <i>Plasmodium sp.</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.7. Genotipagem de <i>P. falciparum</i> baseado na proteína de Superfície do Merozoíta do <i>P. falciparum</i> (MSP2) .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.8. Polimorfismos dos tamanhos dos fragmentos de restrição-RFLP .....</b>	<b>33</b>
<b>5.3. Análise estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>6.1. Dados Demográficos .....</b>	<b>35</b>
<b>6.2. Classificação segundo local de moradia .....</b>	<b>36</b>
<b>6.3. Antecedentes de máalaria.....</b>	<b>37</b>
<b>6.4. Estado clínico.....</b>	<b>37</b>
<b>6.5. Genotipagem do gene que codifica à proteína MSP2.....</b>	<b>38</b>
6.5.1. Diversidade Genética da Família 3D7 .....	39
6.5.2. Multiplicidade da Infecção .....	46
<b>7 DISCUSSÃO. ....</b>	<b>49</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>9 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>11 ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Distribuição da malária no Mundo segundo Incidência Parasitária Anual (IPA). .....	4
Figura 2.2. Distribuição da malária nas Américas .....	6
Figura 2.3. Mapa do risco da malária no Brasil. ....	9
Figura 2.4. Casos de malária na região amazônica 2003-2014 por espécie parasitária e IPA. ....	9
Figura 2.5. Ciclo biológico do parasito. ....	15
Figura 2.6. Casos de malária no município de Barcelos período 2003-2014 por espécie parasitária .....	13
Figura 2.7. Representação esquemática da estrutura primária das duas famílias alélicas do gene <i>msp2</i> . ....	19
Figura 5.1. Mapa do estado do Amazonas com destaque para o Município de Barcelos. ....	24
Figura 5.2. Genotipagem da família 3D7 do gene <i>msp2</i> através de RFLP .....	33
Figura 6.1. Média da idade dos indivíduos infectados pelo <i>P. falciparum</i> segundo sexo. ....	35
Figura 6.2. Distribuição dos indivíduos infectados pelo <i>P. falciparum</i> segundo faixa etária. ....	36
Figura 6.3. Distribuição de casos de malária segundo o local de moradia. ....	36
Figura 6.4. Média de episódios prévios de malária nos indivíduos segundo o gênero. ....	37
Figura 6.5. Média de idade segundo estado clínico dos indivíduos .....	38
Figura 6.6. Gel de agarosa ao 2,5%: amplificação da família alélica 3D7 do gene <i>msp2</i> .....	38
Figura 6.7. Géis depoliacrilamida 10% mostrando a amplificação da família alélica 3D7 do gene <i>msp2</i> do <i>P. falciparum</i> . ....	42
Figura 6.8. Distribuição da diversidade genética segundo o local de moradia .....	44
Figura 6.9. Número de genótipos circulando segundo estado clínico dos indivíduos. ....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 6.2. Distribuição da diversidade genética em indivíduos no município de Barcelos .....	43
Tabela 6.3. Distribuição da diversidade genética segundo sexo.....	43
Tabela 6.4. Distribuição da diversidade genética segundo a faixa etária dos indivíduos. ....	44
Tabela 6.5. Distribuição da diversidade genética segundo os antecedentes de malária .....	45
Tabela 6.6. Diversidade dos genótipos segundo o desfecho clínico .....	45
Tabela 6.7. Número de genótipos estratificado por sexo .....	46
Tabela 6.8. Número de genótipos circulando de acordo à faixa etária.....	46
Tabela 6.9. Número de genótipos segundo a área de coleta de amostra (rural-urbana).....	47
Tabela 6.10. Número de genótipos segundo antecedentes de malária .....	47

## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. Classificação segundo a intensidade da transmissão .....	10
Quadro 2.2. Estudos de Diversidade Genética e Multiplicidade da Infecção utilizando o gene <i>msp2</i> no <i>P. falciparum</i> nas Américas. ....	19
Quadro 5.1. Iniciadores da primeira PCR para diagnóstico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	28
Quadro 5.2. Mistura de reagentes da primeira PCR para diagnóstico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	28
Quadro 5.3. Perfil térmico da primeira reação de PCR para o diagnóstico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	29
Quadro 5.4. Iniciadores da segunda reação de PCR diagnóstica espécie-específica para <i>Plasmodium sp.</i> .....	29
Quadro 5.5. Mistura de reagentes da segunda reação de PCR nested para diagnóstico espécie-específica .....	29
Quadro 5.6. Perfil térmico da segunda reação de PCR para diagnóstico espécie-específica de <i>Plasmodium sp.</i> .....	30
Quadro 5.7. Iniciadores da primeira reação de PCR para amplificação do gene <i>msp2</i> .....	30
Quadro 5.8. Mistura de reagentes da primeira PCR para a amplificação do gene <i>msp2</i> .....	31
Quadro 5.9. Perfil térmico da primeira reação de PCR para a amplificação do gene <i>msp2</i> .....	31
Quadro 5.10. Iniciadores da segunda reação de PCR para discriminação das famílias alélicas .....	32
Quadro 5.11. Mistura de reagentes da PCR Nested para a amplificação do gene <i>msp2</i> .....	32
Quadro 5.12. Mistura de reagentes da reação de RFLP .....	33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	Estado do Amazonas
bp	Pares de bases
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico )
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane(Dicloro Defenilfeniltricloroetano)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EIR	Entomological inoculation rate(Taxa de Inoculação entomológica)
GLURP	Glutamate Rich Protein (Proteína Rica em Glutamato)
<i>glurp</i>	Gene codificante da Proteína Rica em Glutamato
IPA	Incidencia Parasitaria Anual
MOI	Multiplicity of Infection (Multiplicidade da Infecção)
<i>mSP1</i>	Gene codificante da Proteína de Superfície do Merozoíta 1
<i>mSP2</i>	Gene codificante da Proteína de Superfície do Merozoíta 2
MSP1	Merozoite Surface Protein 1 (Proteína de Superfície do Merozoíta 1)
MSP2	Merozoite Surface Protein 2 (Proteína de Superfície do Merozoíta 2)
PCR	Polymerase Chain reaction (Reação em cadeia da Polimeraza)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismos dostamanhos dos fragmentos de restrição)
PNCM	Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

# 1 INTRODUÇÃO

A malária é um problema de saúde pública relevante no planeta. No Brasil, no ano de 2014, foram registrados cerca de 143.549 casos da doença. Dos casos notificados em 2014, 99,5% aconteceram na Região Amazônica sendo causados principalmente pelo *Plasmodium vivax*, 83% (119.461 casos), seguido do *Plasmodium falciparum* responsável por 16% dos casos (22.365 casos) (1).

O *P. falciparum* (Welch, 1897) é a espécie que mais prevalece no planeta e o *P. vivax* é a de maior distribuição mundial sendo que é a mais prevalente fora do continente africano. O *P. falciparum* é responsável pela maior carga de malária grave que inclui a malária cerebral, anemia grave e outras apresentações clínicas, contribuindo com o maior número de mortes por essa doença no mundo (2). A epidemiologia da malária mostra uma considerável variação geográfica; as dificuldades na diferenciação de cepas em amostras de campo, anteriormente geravam obstáculos ao estudo das relações entre populações de *Plasmodium* e características epidemiológicas (3). Hoje os ensaios moleculares são uma ferramenta utilizada para estudar a diversidade genética de populações de *P. falciparum* em relação aos fatores de intensidade da transmissão, ao fenótipo da doença e a imunidade do hospedeiro (4). A utilização recente da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem contribuído para uma melhor compreensão da biologia do parasito (5,6). Genes polimórficos são utilizados como marcadores genéticos, proporcionando assim um meio para avaliar a composição das populações parasitárias. O entendimento da estrutura genética deste parasito é necessária para a compreensão da dinâmica das populações naturais. Resultados de pesquisas utilizando ensaios de PCR demonstram que as populações de *P. falciparum* são altamente complexas (3). A grande diversidade do *P. falciparum* tem sido relacionada com diversos parâmetros epidemiológicos como a idade (7), hemoglobinopatias (8) e servido para distinguir efeitos sutis da vacinação sobre as populações de parasitos (9,10,(11)

O *P. falciparum* é a mais virulenta das cinco espécies que causam malária em humanos. Estes parasitos da malária são geneticamente diversos em todas

as áreas e níveis de endemicidade (11). A complexa diversidade genética do *P. falciparum* é em parte responsável pela evasão da resposta imune do hospedeiro, pelo surgimento da resistência aos fármacos e pela dificuldade na descoberta de uma vacina anti-malárica eficaz (12,13). Estudos sobre a biologia deste parasito se concentram fundamentalmente em áreas holo e hiperendêmicas de malária na África subsaariana (14). Trabalhos realizados em áreas consideradas de baixa endemicidade, como por exemplo, na região Amazônica são limitados no que se refere a avaliação da diversidade genética de populações naturais de *P. falciparum*. Os estudos nas áreas com transmissão de malária têm utilizado as regiões polimórficas dos genes que codificam as proteínas de superfície do merozoíta 1 e 2 (*msh1* e *msh2*) e a proteína rica em glutamato (*glurp*) como marcadores genéticos para determinar a diversidade genética, multiplicidade da infecção (MOI) e para avaliar o nível de transmissão da malária e a relação desses fatores com a aquisição da imunidade natural da doença (15,16). O gene *msh2*, alvo de nosso estudo, é um dos genes amplamente estudados como um dos principais candidatos vacinais para a malária. Esse gene codifica para uma glicoproteína polimórfica da membrana de superfície do merozoíta (17,18). O presente estudo propõe investigar a diversidade genética do gene *msh2*, que codifica uma proteína abundante da membrana de superfície do merozoíta do *P. falciparum*, em amostras de indivíduos do município de Barcelos, Amazonas, área altamente endêmica para malária, e com relatos de alta frequência de infecções assintomáticas (19,20). Este marcador permite a diferenciação dos genótipos responsáveis por casos graves da doença ou infecções assintomáticas, além de detectar os genótipos de *P. falciparum* resistentes às drogas antimaláricas diferenciando as reinfeções das recrudescências (21).

## 2 MARCO TEÓRICO

A malária é uma doença aguda e febril, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que podem ser transmitidos aos seres humanos por meio da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, que são os vetores do parasito. Este mosquito pica principalmente entre o anoitecer e o amanhecer (22). Existem cinco espécies de parasitos que causam malária em seres humanos: *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Filetti 1890), *Plasmodium malariae* (Grassi & Filetti 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens 1922) e nos últimos anos, casos de malária em humanos têm ocorrido no Sudeste Asiático pelo *Plasmodium knowlesi* (Knowles & Gupta 1931), uma espécie de *Plasmodium* que causa malária em macacos mas que também pode infectar humanos em forma natural (23,24). O *P. falciparum* é a espécie mais prevalente em todo o mundo; O *P. vivax* tem uma ampla distribuição e é a espécie predominante fora do continente Africano; O *P. ovale* e *P. malariae* são transmitidos principalmente em áreas tropicais da África e algumas ilhas do Sudeste Asiático, enquanto que o *P. knowlesi* parece estar restrito ao Sudeste Asiático (25).

### 2.1 Epidemiologia da Malária

#### 2.1.1 Malária: um problema de saúde pública no mundo

A transmissão da malária ocorre em todas as seis regiões geográficas da Organização Mundial da Saúde (OMS) sendo que cerca de 3,2 bilhões de pessoas em 97 países estão em risco de serem infectados e desenvolver a doença (Figura 2.1) (26) . De acordo com as últimas estimativas, 214 milhões de casos de malária ocorreram globalmente em 2015 produzindo 438.000 mortes, o que representa uma diminuição na incidência de casos de malária e nas taxas de mortalidade de um 48% respectivamente desde o ano 2000. O fardo é mais pesado na região da África subsaariana , onde se estima que 90% de todas as mortes por malária ocorrem em crianças com menos de 5 anos, representando 78% de todas as mortes por malária no planeta (26).

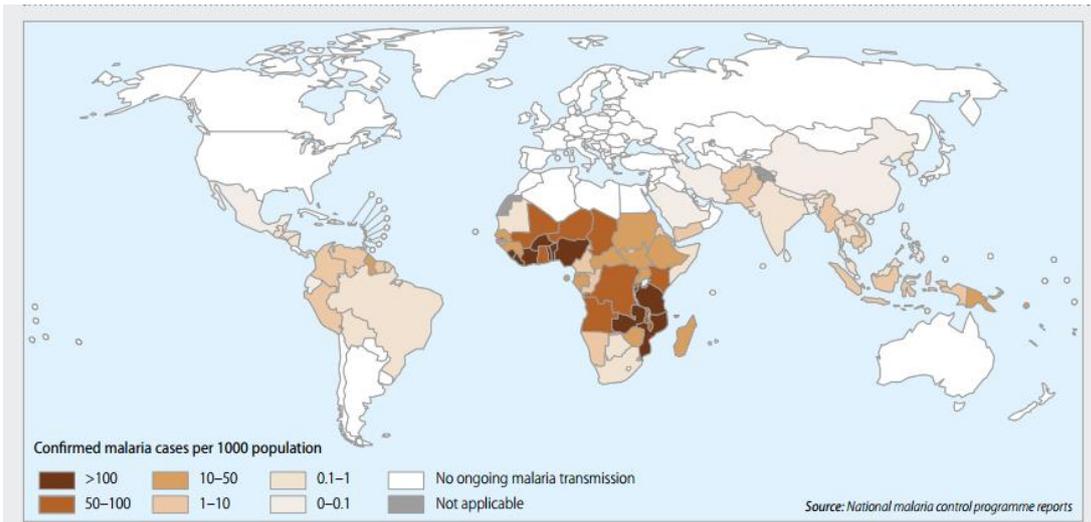


Figura 2.1. Distribuição da malária no Mundo segundo Incidência Parasitária Anual (IPA).

Fonte:(25)

### 2.1.2 Malária no continente americano

Nas Américas, cerca de 121 milhões de pessoas em 21 países estão sob risco de contrair malária; 20 milhões destas pessoas se encontram em áreas consideradas como de alto risco. Nesta região, o *P. falciparum* é responsável por menos de 30% dos casos globais de malária, embora essa proporção seja de mais de 50% na Guiana francesa e Guiana e de quase 100% na República Dominicana e Haiti (26). O número de casos de malária confirmados na região caiu de 1,2 milhões em 2000 para 390.000 casos em 2014. Três países foram responsáveis por 77% dos casos nesse ano: Brasil (37%), Venezuela (23%) e Colômbia (17%). Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que comparado com o ano de 2000, em 2014 foi observada uma redução maior de 75% na incidência de casos de malária microscopicamente confirmados em 15 dos 21 países em áreas com transmissão contínua. Esses países foram: Argentina, Belize, Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Suriname e Guiana Francesa. Outros três países (República Dominicana, Panamá e Guiana) estão em bom caminho para uma redução de 50-75% na incidência de casos em 2015. Peru tem projetado uma diminuição do 25% dos casos para o 2015. Em Venezuela foi relatado aumento no número de casos entre 2008 e 2014. Em 2014 foram relatadas 79 mortes por malária no continente, um declínio de 80%

em comparação com o ano 2000; a metade dessas mortes foram registradas no Brasil (26).

Quanto a eliminação da doença, a Argentina é um dos países com zero casos autóctones desde 2011, e iniciou o processo de certificação da eliminação da malária. Paraguai, também tem reportado zero casos autóctones desde 2012, e Costa Rica registrou zero casos autóctones no 2013 e um caso recente em 2014 (26). A finais do 2015, Brasil com o objetivo de combater a malária e acabar com a doença, lançou, o Plano de Eliminação da Malária no Brasil. A medida faz parte dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) lançados pela Organização das Nações Unidas (ONU) em substituição aos Objetivos do Milênio. A meta é a redução de pelo menos 90% dos casos até 2030, quando comparado com 2015 (27). Outros quatro países em fase de pré-eliminação relataram menos de 1.100 casos (Belize, Equador; El Salvador e México) no 2014. Dez países da América Central e do Caribe juntaram-se à iniciativa regional que tem como objetivo a eliminação da malária até 2020, com o apoio do Fundo Global de Combate à Aids, Tuberculose e Malária (Belize, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Haiti, Honduras, México, Nicarágua e Panamá) (figura 2.2) (26).

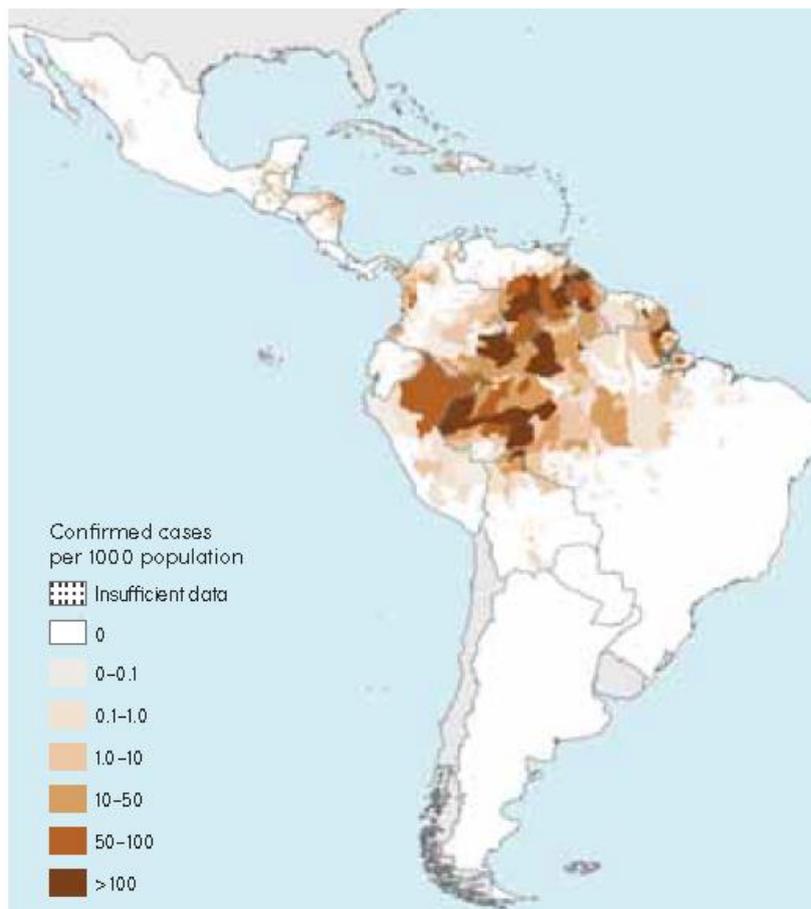


Figura 2.2. Distribuição da malária nas Américas  
 Fonte:(26)

### 2.1.3 Malária no Brasil

No fim do século XIX, a malária estava presente em quase todo o território brasileiro, especialmente na costa litorânea, com exceção de algumas áreas no sul do Brasil. A Amazônia e todo o planalto central foram afligidas por uma grande epidemia no fim do século XIX durante o denominado “ciclo da borracha” quando este produto tornou-se uma matéria prima preciosa que atraiu legiões de nordestinos que invadiram regiões inteiras da Amazônia (28). Estima-se que chegaram à Amazônia, mais de 200.000 nordestinos susceptíveis à doença; esta grande migração gerou a cultura do extrativismo seringalista e deu origem à primeira grande epidemia amazônica de malária (28,29). Na construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, iniciada em 1907 para transportar a borracha extraída dos seringais bolivianos e do Acre, a malária afetou entre 50% a 80% dos trabalhadores caribenhos, brasileiros e bolivianos que trabalhavam nas obras. Esta epidemia foi testemunhada por

Oswaldo Cruz e Carlos Chagas que apoiaram as ações para o controle da doença (30,31). A partir destes eventos, a malária no Brasil seguia avançando no século XX, estando presente nas grandes capitais. Na cidade do Rio de Janeiro foi confirmada microscopicamente a presença de casos de malária provenientes da Ilha do Governador e até da Praça da República no centro carioca, os quais foram corroborados como casos autóctones do Rio o que indicava que a doença também estava presente na capital da República; o mesmo ocorreu no estado de São Paulo, particularmente nas cidades de Santos, Campinas e nos vales dos rios Piracicaba e Tietê. Em geral a malária estava em todas as capitais brasileiras, ocorrendo como uma doença endêmica em todo o país (28). Durante a segunda guerra mundial quando os japoneses ocuparam os seringais da Ásia tropical, o Brasil como país aliado recrutou nordestinos para trabalharem novamente nos seringais da Amazônia formando o “Exército da Borracha”. Essas pessoas recém chegadas eram susceptíveis à malária e aconteceu uma nova epidemia da doença na Amazônia brasileira (30).

Outra grande epidemia de malária no Brasil foi no final da década de 30 no nordeste. Navios franceses, que faziam a rota postal França-Natal via Dakar, provavelmente trouxeram o transmissor da malária na África, O *Anopheles gambiae*. Considera-se que este foi um momento fundamental na institucionalização do combate à malária no país, originando pela primeira vez um serviço especificamente constituído para o controle da doença denominado “Serviço de Malária do Nordeste” (32). Um incrível trabalho de controle da malária foi gerado em todo o território nordestino juntando ações do estado brasileiro e a fundação Rockefeller, que já estava presente no país desde a década de 1910. Juntos, investiram US\$ 350 mil em um exército de médicos e técnicos, experimentados no combate ao mosquito transmissor. A luta contra o *A. gambiae* foi vitoriosa. Foram eliminados todos os criadouros na região e controlada a grande epidemia da doença. Este importante sucesso na luta antimalárica foi conhecido mundialmente, marcando a história da malária ao introduzir na agenda sanitária internacional o debate sobre as possibilidades de erradicação da doença em uma perspectiva global (28,33). Depois da segunda guerra mundial, com a descoberta das propriedades inseticidas residuais do

DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) e da Cloroquina como medicamento antimalárico, juntamente com medidas de saneamento ambiental, levaram a uma drástica redução da malária em países da Europa e de muitos países menos desenvolvidos incluído Brasil. Esta redução levou a criar por parte da OMS o Programa Global de Erradicação da Malária (PGEM), baseado em três princípios: combate ao mosquito por meio do DDT, melhoria das condições sanitárias gerais e tratamento dos pacientes. O programa era bom, mas na prática não funcionou como se esperava. Na região amazônica, por exemplo, houve um incremento dos casos devido à colonização da região com as grandes migrações, a abertura de garimpos e diferentes atrativos econômicos que fizeram que a malária retornasse como um grave problema de saúde pública (28,33).

Hoje no Brasil a imensa maioria dos casos de malária se apresenta na região Amazônica, classificada como área endêmica para a doença e que está conformada pelos estados de Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (34). Uma série de fatores condicionantes e determinantes favorecem a disseminação e manutenção da malária tais como: fatores biológicos (presença de alta densidade de mosquitos vetores, populações migrantes altamente suscetíveis), fatores geográficos (baixa altitude, altas temperaturas, altas taxas de precipitação, vegetação, inúmeros criadouros naturais), assim como fatores ecológicos (desmatamento) e fatores sociais (condições precárias de vida e de trabalho) (35).

No ano 2014, o número de casos de malária registrados no Brasil foi de 143.549, sendo que 99,5% ocorreram na região amazônica (Figura 2.3). O *P. vivax* foi responsável por 119.461 (83%) casos e o *P. falciparum* por 22.365 (16%) casos (1) (Figura 2.4). Apesar das poucas notificações na região extra-amazônica, a doença não pode ser negligenciada, pois se observa uma letalidade mais elevada que na área endêmica (34).

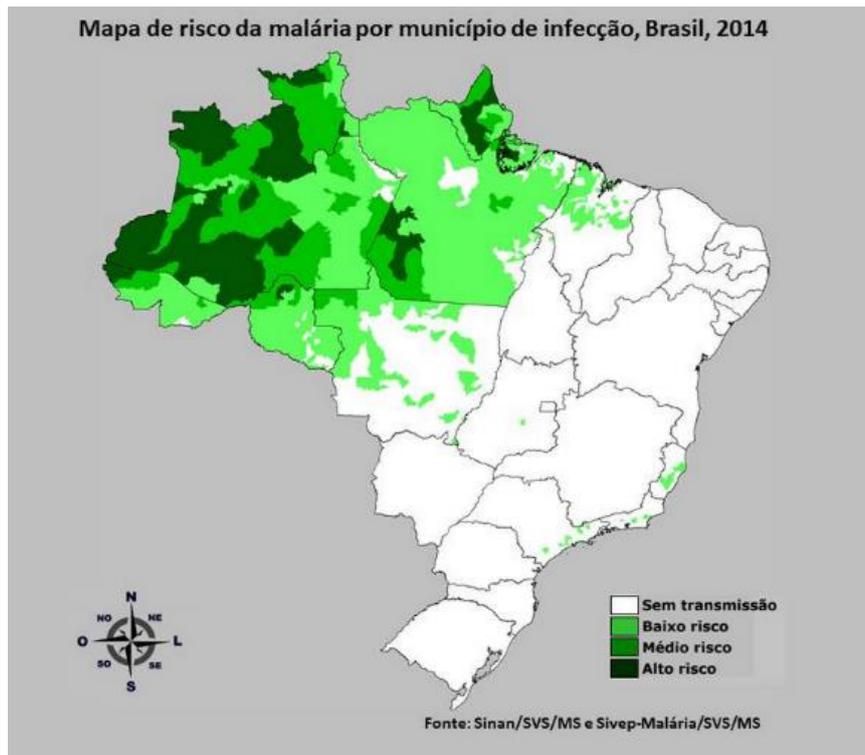


Figura 2.3. Mapa do risco da malária por município de infecção, Brasil, 2014. Fonte:(1)

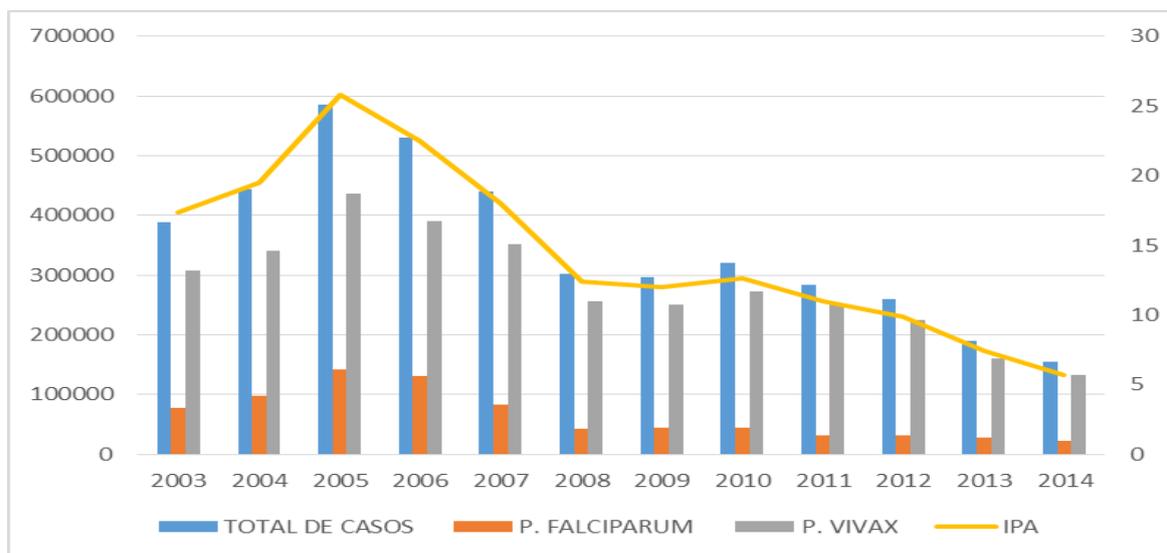


Figura 2.4. Casos de malária na região amazônica, 2003-2014, por espécie parasitária e IPA. Fonte:(1)

## 2.2 Classificação epidemiológica da malária

Dada a diversidade e a complexidade da epidemiologia da malária nas diferentes áreas onde se apresenta a doença, existem diversas formas de

classificar a endemicidade segundo a intensidade de transmissão, da estabilidade e da estratificação epidemiológica de risco.

### 2.2.1 Intensidade da transmissão

Essa classificação é mais usada nos países africanos. Tendo como base a esplenomegalia presente entre todas as crianças entre 2 e 9 anos numa área determinada, a doença pode ser classificada segundo o percentual de esplenomegalia encontrada (36). A intensidade da transmissão se classifica conforme ao descrito no quadro 2.1.

Quadro 2.1. Classificação segundo a intensidade da transmissão

<b>Intensidade da Transmissão</b>	<b>Descrição</b>
<b>Malária Holoendêmica</b>	Quando mais de 75% das crianças entre 2 e 9 anos tem o baço palpável e o percentual nos adultos é baixo.
<b>Malária Hiperendêmica</b>	Quando entre 50 e 75% das crianças tem o baço aumentado e o índice esplênico nos adultos também é elevado.
<b>Malária Mesoendêmica</b>	Quando entre 11 e 50% das crianças entre 2 e 9 anos tem esplenomegalia
<b>Malária Hipoendêmica</b>	Quando menos de 10% das crianças tem esplenomegalia.

### 2.2.2 Estabilidade da transmissão

Essa classificação foi proposta por MacDonald em 1957 dividindo as áreas em estáveis e instáveis segundo a intensidade da transmissão. O desenvolvimento da imunidade é um fator importante para definir essa intensidade.

#### ***Malária estável***

São as áreas de malária onde se tem uma alta taxa de transmissão do *Plasmodium* sp. e as pessoas estão frequentemente expostas aos vetores

assegurando o desenvolvimento de imunidade contra a doença. Crianças menores de 2 anos são mais susceptíveis e apresentam maior risco de adoecer e morrer por malária devido à baixa imunidade. Nestas áreas os indivíduos adultos geralmente são assintomáticos ou oligossintomáticos, com baixas parasitemias, pelo fato de sofrerem constantes picadas do inseto vetor, desenvolvendo, assim, imunidade clínica; os vetores são bem adaptados e é raro encontrar mosquitos livres de infecção (37).

### ***Malária instável***

As áreas de malária instável se caracterizam pela baixa transmissão, sendo que a incidência varia de mês para mês e de ano para ano, de acordo com as condições climáticas do local. Essas áreas ocorrem em locais onde o mosquito não pica o homem frequentemente. Pode ocorrer a presença de anofelinismo sem malária. Ocorrem surtos epidêmicos estacionais que podem ser de grandes proporções se são favorecidos pelas condições climáticas. O grau de imunidade da população destas áreas é muito variável. As populações de áreas instáveis demoram para adquirir imunidade, as crianças são dificilmente infectadas e a maior incidência de malária ocorre em indivíduos adultos. As epidemias de malária geralmente ocorrem nestas áreas (37).

#### 2.2.3 Estratificação epidemiológica de risco da malária

A Organização Mundial da Saúde (OMS), estabeleceu uma estratificação epidemiológica de risco baseada em áreas de alto, médio, baixo e sem risco de transmissão de malária, tendo como referência a Incidência Parasitária Anual (IPA), uma medida que é calculada dividindo o número de casos de malária num ano e local determinado, pela população em risco desta região, para o mesmo período de tempo por cada 1000 pessoas. No Brasil, as áreas são divididas em:

Alto risco (IPA  $\geq$  50)

Médio risco (IPA  $\geq$  10 e  $<$  50)

Baixo risco (IPA  $>$  1 e  $<$  10)

sem risco: (IPA  $<$  1) (38)

Nos últimos informes mundiais da malária (2013, 2014) a OMS classificou como áreas de alto risco epidemiológico aquelas com uma IPA maior ou igual a um caso por mil habitantes. Isso provavelmente pensando na eliminação da doença em certos contextos.

### **2.3 Malária no município de Barcelos**

O município de Barcelos possui uma população de 25.718 habitantes (39). As primeiras informações de malária neste município foram feitas no começo do século XX por Oswaldo Cruz em sua viagem pelo Vale do Amazonas, no qual ele referia que quase todas as crianças examinadas apresentavam esplenomegalia palpável indicando que esta era uma área hiperendêmica para malária (40).

Nos últimos anos, o município de Barcelos apresentou uma média anual de 5.000 casos e uma Incidência Parasitária Anual Média (IPAm) de 156,4 casos por 1000 habitantes (1) sendo classificado como de alto risco epidemiológico, variando desde 70,9 casos por 1000 habitantes em 2004 até 264,4 em 2006 (Figura 2.5). No ano 2012 houve uma diminuição no número de casos apresentando uma IPA de 83,4 mas, em 2014 foi detectado um aumento de casos com uma IPA de 141,6 casos por 1000 habitantes (1).

Um estudo realizado no ano 2000 na sede do município, classificou a cidade como uma área hipoendêmica com predomínio de infecção por *P. vivax* (41); em 2005, outro estudo no Parque Nacional do Jaú, uma área de agricultura familiar mostrou a presença de áreas de malária estável com e infecção assintomática por *Plasmodium* sp (20). Em 2007, outro trabalho analisando a epidemiologia local da malária em uma área de extrativismo vegetal da piaçaba no rio Padauri no médio rio Negro, foi identificada a sazonalidade da endemia com tendência a ocorrência de mais casos no início e no final do período das chuvas; esse estudo também observou a presença de infecção plasmodial assintomática que foi mais frequente no período da estação seca (42).

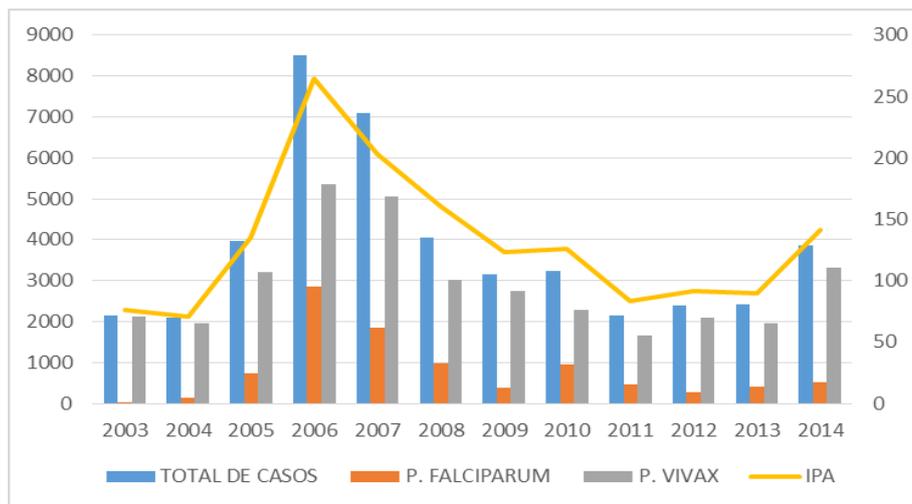


Figura 2.5. Casos de malária no município de Barcelos período 2003-2014 por espécie parasitária

Fonte:(1).

## 2.4 Ciclo biológico do *Plasmodium sp.*

O ciclo do parasito causador da malária se desenvolve no hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado (figura 2.6).

### 2.4.1 Ciclo no hospedeiro vertebrado

No hospedeiro vertebrado ocorrem duas fases do ciclo de vida do *Plasmodium*: a fase exoeritrocítica e a fase eritrocítica. A fase exoeritrocítica inicia com a picada das fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* transmissores do parasito da malária humana; a fêmea inocula os esporozoítas alojados em suas glândulas salivares no tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado. Inoculados na corrente sanguínea, os esporozoítas chegam aos hepatócitos aproximadamente entre 30 a 60 minutos. No hepatócito o parasito inicia a reprodução assexuada (esquizogônica o ciclo exo-eritrocítico) que dura cerca de 7-9 dias dependendo da espécie parasitária, formando uma célula multinucleada chamada esquizonte que por sua vez dará origem a aproximadamente 1.800-40.000 merozoítas (segundo a espécie parasitária). Ao final de 8 a 15 dias, o hepatócito parasitado rompe-se liberando milhares de merozoítas na corrente sanguínea. Nas infecções pelo *P. vivax* e *P. ovale* são formados nos hepatócitos formas dormentes chamadas hipnozoítas, que meses depois da infecção podem se reativar e originar as recaídas da doença.

A fase eritrocítica ocorre quando os merozoítas entram na corrente sanguínea invadem os eritrócitos onde ocorre uma nova esquizogônia que produz esquizontes maduros com 8 a 32 núcleos que dão origem ao mesmo número de merozoítas. O ciclo varia entre 24 e 72 horas, segundo a espécie, culminando com a ruptura do eritrócito e liberação dos merozoítas. A liberação massiva de merozoítas juntamente com outras substâncias tóxicas é a responsável pelos episódios febris e os sintomas característicos da malária. Os merozoítas livres podem invadir novos eritrócitos e manter o ciclo transformando-se em trofozoítas e posteriormente em esquizontes; por causas ainda não bem descritas alguns merozoítas podem se diferenciar em formas de reprodução sexuada chamadas gametócitos sendo as formas infectantes para o mosquito vetor (38) .

#### 2.4.2 Ciclo no vetor (Esporogonia)

Os gametócitos absorvidos durante o repasto sanguíneo do mosquito, amadurecem em gametas masculinos e femininos, cuja fusão forma um zigoto no intestino médio do vetor. Este se transforma em um estágio móvel de oocineto que penetra a parede do intestino do mosquito e origina um oocisto. Estes estádios são os únicos em fase diplóide dos plasmódios. No interior do oocisto ocorre uma divisão meiótica seguida de várias divisões mitóticas resultando na formação de esporozoítas. A ruptura do oocisto gera a liberação de milhares de esporozoítas eventualmente infecciosos, que migram para as glândulas salivares. Este ciclo no mosquito dura entre 10 e 17 dias e depende de uma série de fatores bióticos e abióticos (13,43).

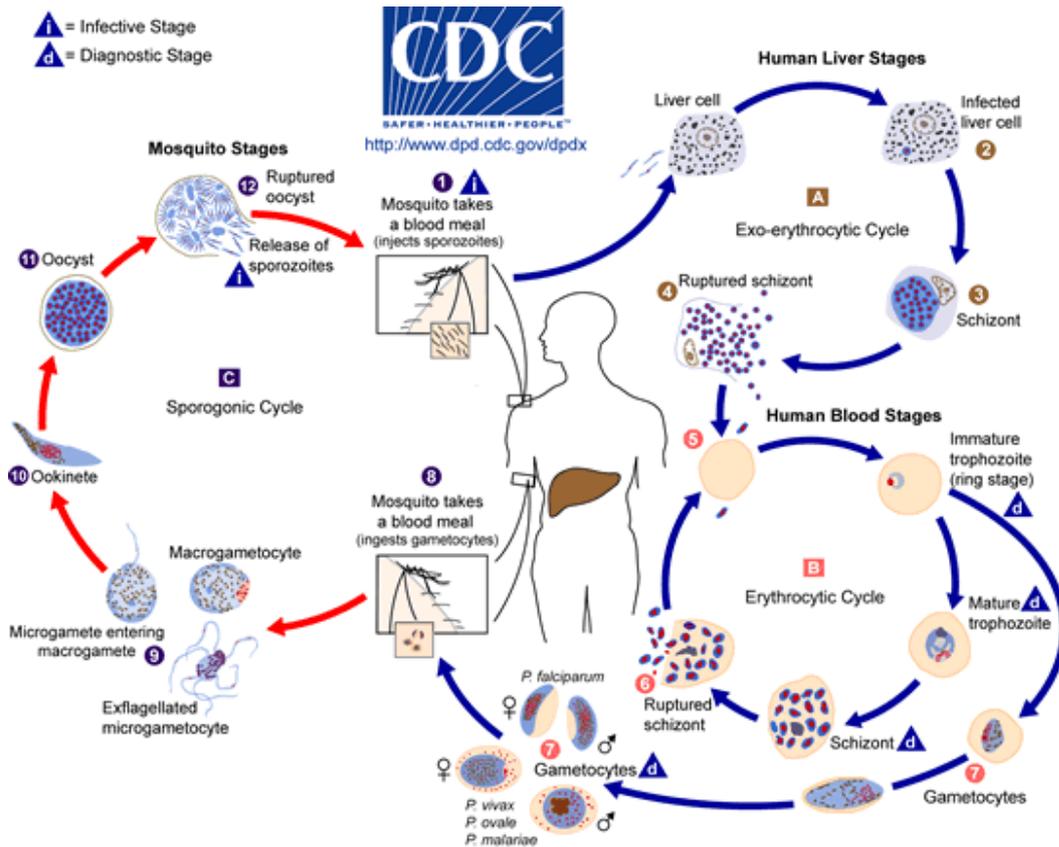


Figura 2.6. Ciclo biológico do parasito da malária.  
Fonte:(44)

## 2.5 Infecção assintomática

A infecção plasmodial assintomática se define como a presença de plasmodios no sangue, na ausência de sintomas, sendo prevalente em áreas altamente endêmicas (45,46). Os primeiros casos de infecção assintomática pelo *Plasmodium* foram descritos pelo cientista Roberth Koch no ano 1900 em indivíduos de Papua Nova Guinéa. Este estado clínico tem sido, de longa data motivo de preocupação particularmente em pesquisadores da África e do Sudeste Asiático (47). No Brasil tem se reportado presença de infecções assintomáticas em diferentes localidades (19,20,48,49). As consequências clínicas da infecção assintomática podem variar em diferentes contextos epidemiológicos e tanto sua patogenia quanto sua epidemiologia não são ainda totalmente compreendidos. Geralmente assume-se que, em áreas endêmicas a parasitemia assintomática está envolvida no desenvolvimento de uma imunidade parcial (50) podendo chegar a proteger contra a doença clínica (51).

Entretanto, umas das consequências mais importantes da infecção assintomática é a presença de reservatórios de gametócitos, que perpetua a propagação da infecção, o que geralmente ocorre através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* (52,53).

## **2.6 Diversidade genética do *Plasmodium falciparum***

O genoma nuclear do *P. falciparum* é composto de 23 megabases distribuído entre 14 cromossomos com aproximadamente 5.300 genes codificantes (54). Globalmente as populações parasitárias do *P. falciparum* mostram uma grande diversidade fenotípica e genotípica (55), permitindo aos parasitos a evasão da resposta imune, aos medicamentos antimaláricos, às vacinas e às estratégias de controle vetorial. Um único indivíduo pode ser infectado por múltiplos clones geneticamente diversos (56).

O principal mecanismo para a geração da diversidade alélica no *P. falciparum* é a recombinação meiótica que acontece no mosquito *Anopheles*, a qual se acredita que depende da intensidade da transmissão, sugerindo que frequentes eventos de recombinação entre alelos geram novos alelos em áreas de alta transmissão (56,57). Este processo meiótico é importante na geração da diversidade em organismos eucariotas (58). Uma série de estudos longitudinais estabeleceu uma correlação entre intensidade da transmissão e a diversidade genética (59,60). Em áreas hiperendêmicas, os indivíduos frequentemente possuem mais de um clone, favorecendo eventos de recombinação genética no vetor, o que gera maior diversidade. Essas áreas são diferentes das áreas de baixa endemicidade onde as populações de parasitos experimentam níveis significativos de endogamia, gerando menor diversidade genética (61). Além da intensidade da transmissão outros fatores como a pressão seletiva do uso de medicamentos antimaláricos e vacinas podem influenciar de forma importante na diversidade genética do parasito (61).

## 2.7 Multiplicidade da Infecção

A multiplicidade da infecção (MOI) é o número de diferentes genótipos de *P. falciparum* que infectam simultaneamente um mesmo indivíduo. Em áreas endêmicas de malária, a MOI pode ser um indicador importante do nível de transmissão da doença, tendo em conta que os dados sugerem que a média do número de clones de parasitos num indivíduo se correlaciona com o nível de transmissão (58,62).

A MOI também pode ser um indicador do estado imune. Em áreas que apresentam transmissão estável de malária a MOI se incrementa conforme o desenvolvimento da imunidade. Em crianças assintomáticas sugere-se que a MOI indica aquisição de imunidade (63) e também influencia o risco de subsequentes ataques de malária. Vários estudos tem mostrado associação inversa (64,65), entre a MOI e os ataques de malária, enquanto outros tem mostrado uma correlação positiva entre a MOI e a malária clínica. Entretanto, o papel da MOI no desenvolvimento da imunidade frente à malária não está claramente definida. Estudos de epidemiologia molecular realizados em Papua Nova Guiné (66), Senegal (7), Tanzania (9), Sudan (62) e Guiné Equatorial (67) tem mostrado que as diferenças na MOI são dependentes da idade. Esta dependência é interpretada como um reflexo da imunidade específica antiparasitária (7). A idade na qual a imunidade efetiva é adquirida varia dependendo da intensidade da transmissão, portanto a idade que a MOI máxima é observada varia entre as diferentes áreas endêmicas da malária. Os genes utilizados como marcadores moleculares para o estudo da diversidade e da MOI do *P.falciparum* codificam para proteínas antigênicas da membrana do merozoíto. Os genes mais utilizados são: *mSP1* e *mSP2* que codificam para as Proteínas de Superfície do Merozoíto 1 e 2 (MSP1 e MSP2 do inglês Merozoite surface Protein ) e o *glurp* que codifica para a Proteína Rica em Glutamato (GLURP do inglês Glutamate Rich Protein) (68).

## **2.8 Aquisição da Imunidade ao *Plasmodium falciparum***

A diversidade genética tem um papel muito importante na aquisição natural da imunidade à malária. Em indivíduos que moram em áreas endêmicas, a imunidade ao *P. falciparum* é adquirida como resultado da exposição natural a múltiplas infecções ao longo dos anos. Em áreas holo e hiperendêmicas, o desenvolvimento da imunidade desenvolve-se numa idade mais jovem que em áreas onde a intensidade da transmissão é menor (57). Em muitas regiões endêmicas, a presença de parasitos no sangue não é sinônimo de doença. Portadores assintomáticos apresentam imunidade adquirida clínica e uma parcial imunidade anti-parasitaria que pode ser observada em até 90% dos indivíduos em algumas áreas holoendêmicas, como se tem demonstrado por técnicas de detecção altamente sensíveis, tais como a reação em cadeia da polimerasa PCR (45).

## **2.9 Diversidade Genética do gene que codifica à Proteína de Superfície do Merozoíta 2 (*mSP2*)**

O gene *mSP2* é composto por 5 blocos, sendo o bloco central o mais polimórfico (69). A proteína MSP2 também é conhecida como Antígeno de Superfície do Merozoíta (MSA-2). É uma proteína abundante da superfície do merozoíta do *P. falciparum*, estágio do parasito que invade os glóbulos vermelhos durante a fase de infecção sanguínea. A função específica da MSP2 não está totalmente definida; parece ter um papel essencial no estado de invasão na corrente sanguínea e é retida na superfície do merozoíta durante a invasão sendo degradada logo depois que esta seja completada (70). Existem evidências que sugerem que a *mSP2* seja um alvo potencial da imunidade protetora frente ao *P. falciparum* (71,72).

Os anticorpos contra a MSP2 possui relação com o fator de proteção à malária em estudos prospectivos longitudinais (72,73), com a fagocitose mediada por opsonização dos merozoítas e a inibição celular dependente de anticorpos da replicação na fase sanguínea (74–76). A proteína MSP2 é altamente polimórfica, está ancorada na superfície do merozoíta, e codifica para o gene *mSP2*. O gene *mSP2* se caracteriza pela presença de domínios

conservados N e C terminal que flanqueiam uma região central variável, que contém sequências repetitivas em tandem (77,78). Dividindo-se em duas famílias alélicas 3D7 e FC27, que se diferenciam nas repetições e nas sequências variáveis que as flanqueiam (figura 2.7) (77,79,80). De fato a variabilidade de sequência dentro das famílias alélicas estão limitadas às regiões repetitivas e algumas pequenas regiões de heterogeneidade dentro das regiões que flanqueiam (21).

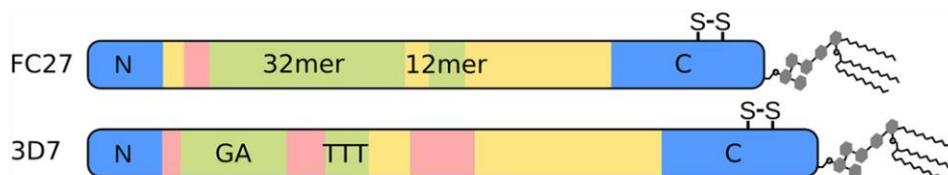


Figura 2.5 Representação esquemática da estrutura primária das duas famílias alélicas do gene *msp2*

As regiões conservadas em N - e C terminal estão em azul, enquanto a região central específica do alelo está composta por repetições polimórficas (verde) e sequências repetitivas (rosa) assim como regiões dimórficas (amarelo), que diferem entre famílias alélicas pois estão conservadas dentro de cada família.

Fonte:(21).

A MSP2 é candidata para ser incluída em uma vacina para malária (81), sendo que o alelo 3D7 foi um dos componentes da vacina de sub-unidade que mostrou uma redução significativa nas densidades do parasito num ensaio clinico feito em Papua Nova Guineia (82).

Foi feita revisão sistemática utilizando o motor de busca de livre acesso pubmed sobre os estudos de diversidade genética e multiplicidade da infecção feitos até o momento nas Américas utilizando o gene que codifica para a proteína de superfície do Merozoíta 2; os achados estão descritos no quadro abaixo.

Quadro 2.2 Estudos de Diversidade Genética e Multiplicidade da Infecção utilizando o gene *msp2* no *P. falciparum* nas Américas.

País	Ano	Autores	# Amostras	Localidade de estudo	% Alélos 3D7	pb Alélos	% Alélos		Híbridos	MOI
							FC27	pb Alélos		
BRASIL	2000	Sallenave-Sales P, M. F. Ferreira-da-cruz	27	Ariquemes (RO)	55%	580-620	45%	500-540-560	Não	1.3
			33	Porto velho (RO)	48%	580-620	52%	500-540-560	Não	
	2001	Hoofman E.H, Ferrerira M.	113	Ariquemes, Guajarámirim e outras localidades (RO)	NR	9 Alélos	NR	10 Alélos	Não	1.08
	2003	Sallenave-Sales P, M.G. Salis	104	Peixoto Azevedo (MT)	42% ( 64)	620	58% (90)	520-500-600	Não	NR
COLÔMBIA	1991	Snewin valerie A, Socrates Herrera.	13	Amostras da Colombia (Choco, Buenaventura, Bagre, Cordoba, Guaviare Dagua, Cisneros, Tumaco, Guapi )	54% (7)	NR	46% ( 6)	NR	2H	NR
	2002	L.Montolla, S. Blair	100	Turbo Zaragoza	80%	(47%)480 (41%) 540	0 10%	368	2 H	NR
	2010	Barrera M.	81	Urabá Bajo Cauca-Alto Sinú, Orinoquia y Amazônia	96.5% (78)	NR	4.9% (4)	NR	1H	NR
	2013	Maestre A, Cadona Fonseca J.	224	Uraba (turbo 95 e Necocle 41) Bajo cauca (El bagre 75, Zaragoza 13)* 91% das amostras amplificaram	91%	500 (85%)e (15%) 550	0	0	Não	0.027
HONDURAS	1999	Haddad.D,Klavs Berzins.	33	Tocoa e Trujillo Honduras	12	500	29	400-450	8H	NR
GUIANA FRANCESA	1999	Ariey Frederey, Thierry Fandeur	77	Guiana Francesa	76%	870	24%	760	6H	1.17
				Rio Padamo região Amazônica sul da Venezuela	88.1% (37)	535				Não teve presença de múltiplas infecções
VENEZUELA	2002	Tami A, D.C.Warhurs	43		7.1% (3)	523	4.8%(2)	350	Não	

Em uma revisão de estudos publicados realizado no período de 1991 a 2013 nas Américas, se encontraram dez trabalhos utilizando o polimorfismo do gene *msp2* para a análise da diversidade genética do *P. falciparum* (Quadro 2.2). Foi demonstrada a circulação simultânea de dois a cinco genótipos nas diferentes regiões: no caso do Brasil foram achados cinco genótipos no estado de Rondônia e quatro no estado de Mato Grosso; na Colômbia, Guiana Francesa e Venezuela foi registrada a presença de dois genótipos, e em Honduras três genótipos. Os estudos feitos com isolados do Brasil e Venezuela evidenciaram a ausência de híbridos. Até agora a maior MOI encontrada foi de 1,3 no estudo feito no estado de Rondônia (Quadro 2.2).

### 3 JUSTIFICATIVA

Segundo as estimativas da OMS, no ano 2013 foram registrados 198 milhões de casos de malária no mundo (26). O *P. falciparum* é responsável pelo maior número de mortes sendo o parasito que causa a malária mais grave (26). É necessário o desenvolvimento de meios eficientes de controle do *P. falciparum* em áreas nas quais há risco de infecção por esse parasito (83). A Informação sobre a natureza e a extensão da variabilidade genética do *P. falciparum* é essencial para compreender o mecanismo subjacente à patologia da malária, à aquisição de imunidade, à disseminação de resistência aos fármacos, às condições de transmissão e ao desenvolvimento de vacinas contra o parasito (84,85). Estudos na África subsaariana, onde a malária é altamente endêmica, têm revelado alta variabilidade na sequência das proteínas de superfície do merozoíta MSP1, MSP2 e na proteína GLURP, os marcadores mais frequentemente utilizados para estudos de diversidade genética (86). No Brasil há poucos estudos de diversidade genética do *P. falciparum* e embora esse parasito não seja o principal agente infeccioso causador da malária no país, essa caracterização é necessária tendo como perspectiva a implementação de novas estratégias para o controle especialmente neste momento em que o Ministério da Saúde está investindo na eliminação do *P. falciparum* no país.

O município de Barcelos no estado do Amazonas é considerado como de alto risco epidemiológico para malária. Nos últimos dez anos, a incidência parasitária anual (IPA) variou entre 70,9 e 264,4 casos por mil habitantes, com uma média anual de  $130,0 \pm 59,7$  casos por 1000 habitantes. Desses, 22,1% foram causados pelo *P. falciparum*, parasito que sempre é notificado nesse município especialmente em áreas de difícil acesso. Contudo, não se conhece a diversidade genética nem a MOI deste parasito na região. Por esse motivo, esses estudos são necessários para conhecer o perfil de genótipos circulantes das populações de parasitos existentes e definir medidas de controle. O presente estudo pretende realizar uma análise molecular retrospectiva de amostras coletadas em diversos estudos pelo Laboratório de Doenças Parasitárias no município de Barcelos, avaliando o perfil populacional das

amostras clínicas de indivíduos com infecção assintomática e malária clínica pelo *P. falciparum* usando o gene que codifica para a MSP2. Essa proposta faz parte da Política de Vigilância Epidemiológica da Resistência aos Antimaláricos do Ministério da Saúde e da Organização Pan-americana da Saúde e vá ao encontro do fortalecimento da capacidade de resposta rápida de saúde pública para a eliminação da doença em algumas áreas do país.

## 4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética do *P. falciparum* em isolados clínicos de indivíduos provenientes da região do médio rio Negro Amazonas, utilizando como alvo o gene *msp2* que codifica para a Proteína de Superfície do Merozoíta 2.

### 4.1. Específicos

- Determinar o número de diferentes genótipos circulantes em populações naturais de *P. falciparum* na área de estudo.
- Avaliar a presença de infecções múltiplas por *P. falciparum* em isolados clínicos de indivíduos provenientes da região do médio Rio Negro Amazonas
- Determinar se existe associação entre a diversidade genética e a presença de infecções múltiplas do *P. falciparum* com o desfecho clínico dos indivíduos infectados.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Área de estudo

O município de Barcelos tem uma população aproximada de 25.718 habitantes e uma área de 122.451 km<sup>2</sup>, está situado ao norte do estado do Amazonas, no médio Rio Negro fazendo fronteira com os municípios de Santa Isabel do Rio Negro ao oeste, Novo Airão ao sudeste, Marãa ao sudoeste, com o estado de Roraima ao leste e com a Venezuela ao Norte (20) (Figura 5.1). A sede municipal está situada na margem direita do Rio Negro e dista 390 km em linha reta e 496 km por via fluvial da capital do estado de Amazonas (Manaus). É uma área de alto risco epidemiológico para malária.

É uma floresta tropical úmida com temperaturas máximas de 31,7°C, temperatura média anual de 28°C, e média pluviométrica anual superior a 2.800 milímetros. Esta região se caracteriza pela sazonalidade das chuvas. A estação chuvosa inicia nos meses de março e abril, chegando ao seu nível máximo nos meses de julho e agosto. A estação seca tem início no mês de outubro e vai até março; a umidade relativa do ar é alta, mantendo uma média anual de 89%, podendo aumentar durante a noite a quase 100% conforme as mudanças de temperaturas (87). Barcelos é banhada pelos rios Negro, Padauri, Unini, Jufaris, Jurubaxi, Aracá, Caurés e Demeni, em cujas margens encontram-se as principais localidades do município.

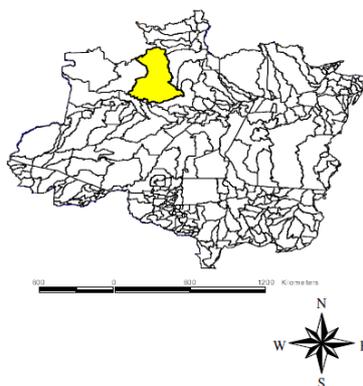


Figura 5.1. Mapa do estado do Amazonas com destaque para o Município de Barcelos.

Fonte:(42)

## **5.2.Aspectos éticos**

Esta pesquisa faz parte de um projeto maior, denominado *Estudos da malária em áreas de alta e baixa morbidade no médio e alto Rio Negro, Estado do Amazonas e novas estratégias de controle*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz sob o número 157/02 (Anexo 1). Esse projeto, que começou em 2003 incorporava uma parte sobre estudos genéticos que não foi realizada na época; entretanto as amostras estavam armazenadas no laboratório. Antes de iniciar o recrutamento dos indivíduos, estes foram devidamente informados sobre os objetivos do estudo, assim como seus direitos como participantes de pesquisa. Somente após esclarecê-los totalmente e com a assinatura do TCLE foi iniciado o recrutamento dos indivíduos. Em caso de crianças e adolescentes com menos de 18 anos, o consentimento foi solicitado aos responsáveis, os quais assinaram o TCLE (Anexo 2).

Embora as amostras foram coletadas anteriormente é importante ressaltar como foi o processo de recrutamento dos participantes.

### **5.2.1 Desenho do estudo**

As amostras foram coletadas em um estudo observacional descritivo; os indivíduos foram abordados de duas formas diferentes:

#### **5.2.1.1 Busca Passiva**

Uma equipe ficou no posto de saúde da Secretaria de Saúde Municipal de Barcelos esperando os indivíduos com sintomas de malária que foram atendidos. Todas as pessoas com resultado positivo na gota espessa para *Plasmodium falciparum* foram abordados para ser recrutados no estudo.

#### **5.2.1.2 Busca Ativa**

Foi feito um rastreamento domiciliar. Estudos seccionais foram realizados no município de Barcelos, usando uma amostragem aleatória sistemática entre os habitantes dos bairros peri-urbanos do município e da área

rural. Esses estudos seccionais pretendiam detectar portadores de infecção assintomática para *P. falciparum*.

Em todos os casos foi aplicado um questionário individual que visava obter informações demográficas, história pregressa de malária, data da última malária, espécie parasitária, etc. Funcionários da Gerência de endemias do município coletaram exames de gota espessa usando os protocolos padronizados do Ministério de Saúde. As amostras foram coletadas no período de 2002-2007 e pertencem a projetos do laboratório de Doenças Parasitárias.

### **5.2.2. Critérios de Inclusão e exclusão**

Inclusão: foram considerados todas as pessoas maiores de um ano infectadas pelo *P. falciparum*, sintomáticos ou assintomáticos e que concordaram participar da pesquisa.

Exclusão: Indivíduos infectados que não residiam na área de estudo.

### **5.2.3. Definição de casos**

#### **5.2.3.1. Caso de malária por *P. falciparum***

Definido como toda pessoa com exame de gota espessa positiva para o *P. falciparum* e com sintomas clínicos associados à doença. Uma vez coletadas as informações e as amostras biológicas todos esses pacientes foram tratados usando os esquemas preconizados pelo Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM). Não houve necessidade de re-tratamento ou mudança de esquema terapêutico em nenhum dos indivíduos do estudo.

#### **5.2.3.2. Caso de infecção assintomática**

Definido como todos os indivíduos positivos para infecção plasmodial na gota espessa e/ou na PCR, sem ter apresentado sintomas da doença 30 dias antes e 30 dias depois de coletadas as amostras biológicas e sem ter tomado medicamentos antimaláricos nem antibióticos no mesmo período. Essas são as

definições usadas pelo Grupo Brasileiro de consenso em estudos de infecção plasmodial assintomática (42)

#### **5.2.4. Amostras**

Para este estudo foram selecionadas 79 amostras coletadas em tubos vacutainer® com EDTA guardados em freezer a -20°C. Estas amostras pertenciam a indivíduos diagnosticados com infecção pelo *P. falciparum* (Gota espessa e PCR), posteriormente as amostras foram submetidas a extração de DNA e realização de provas moleculares.

#### **5.2.5. Extração de DNA genômico**

A extração de DNA genômico foi feita a partir de 300 µl de sangue total, usando o kit comercial *QIAamp*® (QIAGEN). Foram adicionados 20 µl de proteinase K em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml com 300 µl de sangue; se adicionaram 200 µl de solução de lise de células, misturando bem por 15 segundos e se incubou a 56°C por 10 minutos para lisar os glóbulos vermelhos. Se adicionaram 200 µl de Etanol (96-100%) ao tubo que continha o lisado, misturando bem por 15 segundos; foi transferido o conteúdo dos tubos para uma mini-coluna usando uma micropipeta; fechou-se a tampa da coluna e se centrifugou por um minuto a 6.000 xg (8000 rpm); Descartou-se o sobrenadante (que passou pela coluna), se colocou a mini-coluna em um novo tubo; foi feita a primeira lavagem da coluna adicionando-se 500 µl de tampão AW1 e centrifugando por 1 minuto à 6.000xg (8000 rpm), descartando posteriormente o sobrenadante; foi feita a segunda lavagem da coluna adicionando-se 500 µl de tampão AW2, centrifugando à 20.000xg (14000rpm) por 3 minutos descartando novamente o sobrenadante. A coluna se transferiu para um tubo novo e se eluiu o DNA adicionando-se 200 µl do tampão AE, incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente; foi centrifugado por 1 minuto a 6.000xg (8000 rpm); se descartou a coluna e o DNA eluído foi armazenado à -20°C para posterior realização dos experimentos de PCR diagnóstico e genotipagem.

### 5.2.6. PCR para diagnóstico molecular de *Plasmodium sp.*

Os DNAs extraídos foram inicialmente submetidos à PCR para a confirmação do diagnóstico de infecção pelo *P. falciparum*. A técnica baseia-se no protocolo previamente descrito por Snounou com algumas modificações (88). Foi realizada uma primeira amplificação para a identificação de um fragmento gênero-específico seguido de uma segunda amplificação de um fragmento espécie-específico (Nested PCR). Não se realizou eletroforese entre a primeira e segunda PCR para evitar a contaminação.

Quadro 5.1. Iniciadores da primeira PCR para diagnóstico do *Plasmodium sp.*

Iniciadores Primeira Reação	
Iniciadores	Sequencia
rPlu5	5'CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC3'
rPlu6	5'TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG3'

Quadro 5.2. Mistura de reagentes da primeira PCR para diagnóstico do *Plasmodium sp.*

Mix PCR Nested Diagnóstico-Primeira Reação		
Reagente	Concentração/25 µl	Volume(µl)
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen®)	1,5 Mm	1,0 µl
dNTP 10 Mm	0,12 mM	1,5 µl
Iniciador Plu5 10 µM	5pmol	0,6 µl
Iniciador Plu6 10 µM	5pmol	0,6 µl
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	0,5 U	0,1 µl
DNA	10-50ng	3 µl
H <sub>2</sub> O		15,7 µl
	Volume final	25 µl

Quadro 5.3. Perfil térmico da primeira reação de PCR para o diagnóstico do *Plasmodium* sp.

<b>Perfil Térmico Primeira Reação <i>Plasmodium</i> sp</b>			
	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclo</b>
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	
Anelamento	58°C	2 min	25
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	5 min	1
	4°C		

Quadro 5.4. Iniciadores da segunda reação de PCR diagnóstica espécie-específica para *Plasmodium* sp.

<b>Iniciadores Segunda Reação PCR Diagnóstica Espécie Específica</b>	
<b>Iniciadores</b>	<b>Sequencia</b>
<b><i>P. falciparum</i></b>	
<b>rFAL1:</b>	5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'
<b>rFAL2:</b>	5'ACACAATG-AACTCAATCATGACTACCCGTC-3

Quadro 5.5. Mistura de reagentes da segunda reação de PCR nested para diagnóstico espécie-específica.

<b>Mix PCR Nested Diagnóstico Espécie Específica</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Concentração/25 µl</b>	<b>Volume(µl)</b>
Tampão10x (Invitrogen®)	1x	2,5 µl
MgCl 250mM (Invitrogen®)	1,5 mM	1 µl
dNTP mix 10Mm	0,12 mM	1,5 µl
Iniciador Fal1 10mM	240 mM	0,6 µl
Iniciador Fal2 10mM	240 mM	0,6 µl
Taq (Invitrogen®) 5U/ml	0,5 U	0,1 µl

Produto da primeira PCR	1 µl
H2O	17,7µl
Volume final	25 µl

Quadro 5.6. Perfil térmico da segunda reação de PCR para diagnóstico espécie-específica de *Plasmodium* sp.

<b>Perfil Térmico Segunda Reação Espécie Específica</b>			
	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	
Anelamento	65°C	2 min	30
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	5 min	1
	4°C		

### 5.2.7. Genotipagem de *P. falciparum* baseado na proteína de Superfície do Merozoíta (MSP2)

As amostras confirmadas com diagnóstico de infecção pelo *P. falciparum* foram sometidas a uma PCR-Nested para amplificação do bloco 3 do gene *msp2*, baseado no protocolo e iniciadores descritos por Snounou e colaboradores 1999, amplificando 702 pb (3). Foram feitas duas reações separadas usando pares de iniciadores específicos que amplificaram o fragmento do mesmo gene a partir da região semi-conservada para identificar as duas famílias alélicas 3D7 e FC27. Para a família 3D7 foi realizada diluição 1:10 do produto amplificado da primeira reação para continuar com o nested. O mesmo perfil térmico foi utilizado nas duas reações de PCR.

Quadro 5.7. Iniciadores da primeira reação de PCR para amplificação do gene *msp2*

<b>Iniciadores Primeira Reação <i>msp2</i></b>	
<b>Iniciadores</b>	<b>Sequencia</b>
M2-OF	5'-ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA-3'
M2-OR	5'-CTTTGTTACCATC GGTACATTCTT-3'

Quadro 5.8. Mistura de reagentes da primeira PCR para a amplificação do gene *msp2*

<b>Mix PCR Nested Diagnóstico-Primeira Reação</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Concentração/25 µl</b>	<b>Volume(µl)</b>
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen®)	2 mM	1,0 µl
dNTP 10 Mm	0,12 mM	1,6 µl
Iniciador OF10 mM	5pmol	1,25 µl
Iniciador OR10 mM	5pmol	1,25µl
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	0,5 U	0,1 µl
DNA	10-50ng	3 µl
H <sub>2</sub> O		14,3 µl
	Volume final	25 µl

Quadro 5.9. Perfil térmico da primeira reação de PCR para a amplificação do gene *msp2*

<b>Perfil térmico primeira e Segunda reação <i>msp2</i></b>			
	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	
Anelamento	58°C	2 min	24
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	5 min	
	4°C		

Quadro 5.10. Iniciadores da segunda reação de PCR para discriminação das famílias alélicas

<b>Iniciadores Segunda Reação <i>msp2</i></b>	
<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência</b>
<b>Família IC3D7</b>	
M2-ICF	5'-AGAAGTATGGCAGAAAGTAACCTCTACT-3'
M2-ICR	5'-GATTGTAATTCGGGGGATTTCAGTTTGTTCG-3'
<b>Família FC27</b>	
M2-FCF	5'-AATACTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA-3'
M2-FCR	5'-TTTTATTTG GTGCATTGCCAGAACTTGAAC-3'

Quadro 5.11. Mistura de reagentes da PCR Nested para a amplificação do gene *msp2*

<b>Mix PCR Nested <i>msp2</i> Segunda Reação</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Concentração/25 µl</b>	<b>Volume(µl)</b>
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen®)	1,5 mM	1,0 µl
dNTP 10 Mm	0,12 mM	1,6 µl
Iniciador M2-ICF - M2-FCF	0,025 mM	1,25 µl
Iniciador M2-ICR/ M2-FCR	0,025 mM	1,25 µl
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	0,5 U	0,1 µl
Produto da primeira PCR		1 µl
H <sub>2</sub> O		16,3 µl
	Volume final	25 µl

Cinco µl de cada produto da segunda PCR foram submetidos á eletroforese em géis de agarose de 2,5 % em tampão TBE 0,5x sob corrente de 90V. Os produtos de PCR foram visualizados com brometo de etídio através de transiluminador UV. As imagens dos géis foram obtidas através do programa QuantityOne para confirmação da amplificação. Foi utilizado controle positivo de amostras africanas para avaliar a família alélica FC27.

## 5.2.8. Polimorfismos dos tamanhos dos fragmentos de restrição- RFLP

Os produtos do nested PCR das famílias alélicas foram digeridos utilizando a enzima *HinfI* segundo o protocolo de Felger 1999 (89). Foi feita uma mistura dos reagentes (quadro 5.12), a digestão foi feita durante toda a noite à 37°C. Posteriormente os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, usando espaçadores de 1 mm. Os produtos da digestão foram corados com brometo de etídio e visualizados em luz UV. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador de 100 pb.

Quadro 5.12. Mistura de reagentes da reação de RFLP

Mistura RFLP		
Reagente	Concentração/25 µl	Volume(µl)
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,0 µl
<i>HinfI</i> (Invitrogen®) 10U/ul	1,0 U	0,1 µl
Produto da nested PCR		10 µl
H <sub>2</sub> O		7,9 µl
	Volume final	20 µl

A figura 5.2. Mostra um esquema do fragmento amplificado do gene *msp2* família alélica 3D7 (baseada na Sequencia N. 000910.2). Se observam os sítios de corte pela enzima *HinfI* (sítios 16 pb, 124 pb) gerando fragmentos de 16 pb, 108 pb, 349 pb. As regiões polimórficas se encontram entre as bases (271-311) e (363-442).

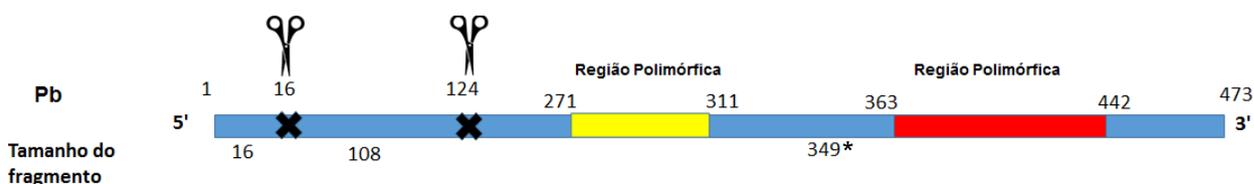


Figura 5.2 Esquema do fragmento amplificado do gene *msp2* família alélica 3D7 (baseada na Sequencia N. 000910.2)

O fragmento 349\* pb pode variar segundo o genótipo (número de repetições das regiões polimórficas)

### 5.3. Análise estatística

A informação coletada foi sistematizada em bancos de dados de estatística em EPIDATA e analisadas usando o programa EPIINFO (CDC-Atlanta, 2000), software de uso livre ou o programa Graphpad Prisma Software®. As variáveis categóricas foram analisadas usando os testes de Qui quadrado ( $\chi^2$ ) com correção de Yates para proporções e em caso de valores esperados menores que cinco foi feito o teste exato de Fisher. A magnitude das associações foi estimada usando os valores de razão de chances (odds ratio) e o coeficiente das associações. Para variáveis contínuas foram realizadas análises de distribuição de frequências, medidas de tendência central (médias e medianas), medidas de dispersão (variância e desvio padrão) e teste t de Student para comparação de médias. Para correlação de duas variáveis numéricas foi usado o teste de Spearman. Em todos os casos foi considerado como estatisticamente significativo um valor de p menor de 0,05.

## 6 RESULTADOS

### 6.1. Dados Demográficos

Foram avaliadas 79 amostras de indivíduos moradores do município de Barcelos. Deles 40 (50,63%) eram de sexo masculino e 39 (49,37%) do sexo feminino. A média de idade foi de  $20,94 \pm 19,66$  anos, sendo de  $20,85 \pm 19,46$  anos entre os homens e de  $21,05 \pm 20,12$  anos entre as mulheres ( $p=0,81$ ). (Figura 6.1). A criança mais nova tinha um ano e o indivíduo com maior idade tinha 77 anos. Na figura 6.2 pode-se observar a distribuição dos 79 casos de malária por faixa etária mostrando que o maior percentual está formado por indivíduos de 15 a 49 anos (27%) e o menor entre os maiores o iguais a 50 anos e menores de 5 anos (14%).

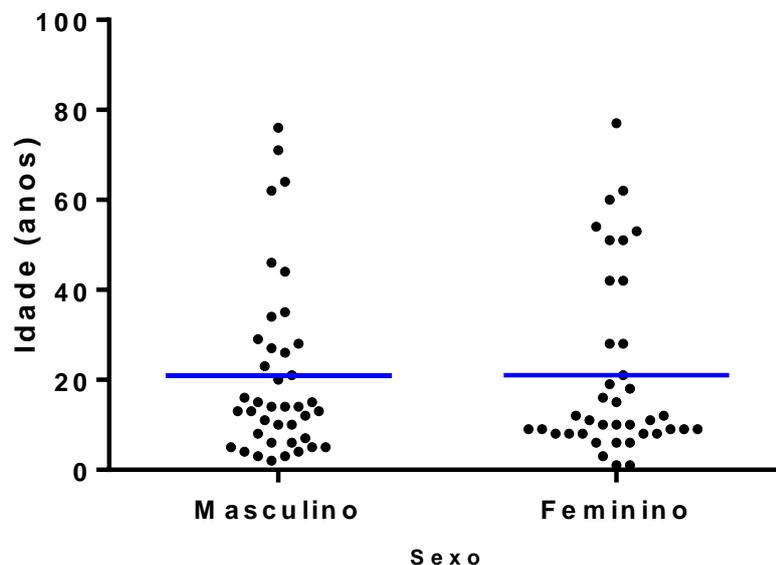


Figura 6.1. Média da idade dos indivíduos infectados pelo *P. falciparum* segundo sexo.



Figura 6.2. Distribuição dos indivíduos infectados pelo *P. falciparum* segundo faixa etária.

## 6.2. Classificação segundo local de moradia

A figura 6.3 mostra a distribuição dos indivíduos estudados por localidade. A localidade de São Sebastião apresentou o maior número de casos (17, 21,52%), seguido por Mariuá com 16 (20,25%) casos. As localidades de Bairro da Paz, Lago das Pombas e comunidade Novo Airão do rio Unini, apresentaram o menor número com 1 (1,27 % caso cada uma).

Cinquenta e três amostras (67,9%) pertenciam a indivíduos moradores da área urbana e 26 (32,91%) a pessoas da área rural.

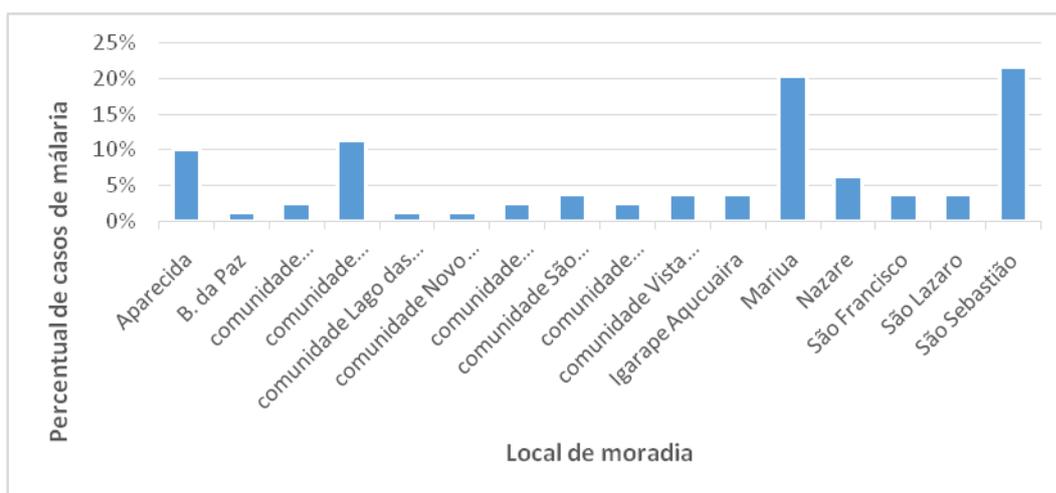


Figura 6.3. Distribuição de casos de malária segundo o local de moradia.

### 6.3. Antecedentes de malária

Dos 79 indivíduos estudados, 71 (89,87%) apresentaram malária previamente e oito eram primo-infectados (10,13%). Entre os indivíduos com histórico de malária prévia, a média de episódios anteriores foi de  $4,30 \pm 3,51$  (IC 95% 3,48-5,14); o número mínimo de infecções anteriores foi de uma e máximo de 20. Entre os homens 39 de 40 anos, (97,50%) reportaram malária previamente. A média de episódios anteriores foi de  $4,2 \pm 3,01$ . Entre as mulheres, 32 (82,05 %) reportaram ter tido malária antes do estudo sendo que a média de episódios prévios foi de  $4,43 \pm 4,09$ ; sete mulheres não reportaram antecedentes prévios de malária (figura 6.4). Essas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p=0,81$ ).

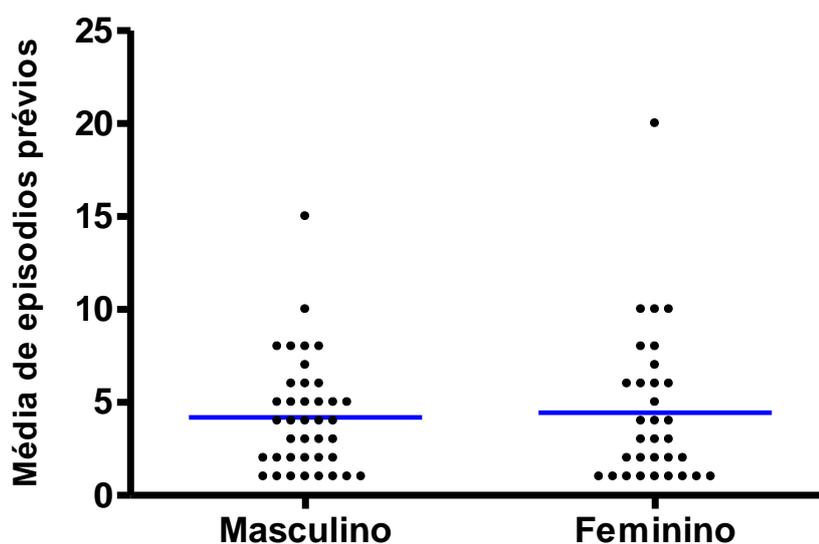


Figura 6.4. Média de episódios prévios de malária nos indivíduos segundo o gênero.

### 6.4. Estado clínico

Dos 79 indivíduos avaliados, 32 (40,51%) tinham infecção plasmodial assintomática e 47 (59,49%) apresentaram quadro de malária clínica. Ao comparar as médias de idades entre indivíduos com malária e os infectados assintomáticos os achados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,01$ ) (Figura 6.5).

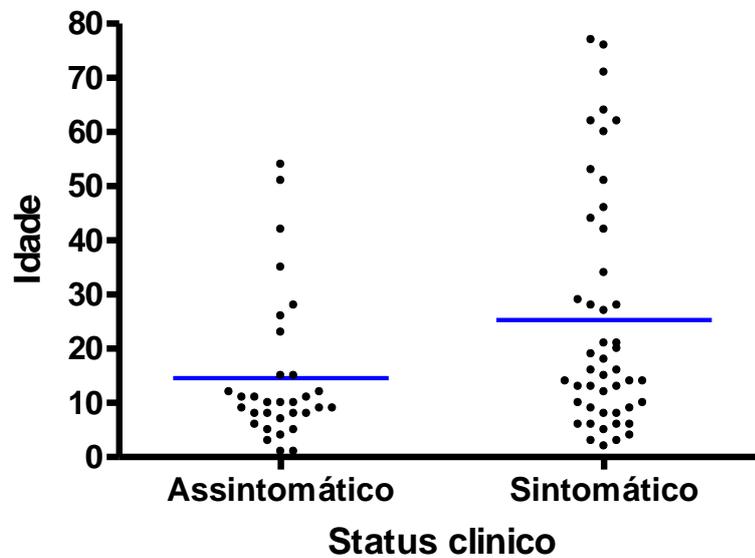


Figura 6.5. Média de idade segundo estado clínico dos indivíduos

### 6.5. Genotipagem do gene que codifica à proteína MSP2

Foi feita a genotipagem do gene *msp2* de 79 amostras por meio da discriminação da família alélica (famílias 3D7 e FC27). Foi encontrada somente a presença da família 3D7 nos isolados avaliados. Foram considerados como genótipos as bandas observadas com maior intensidade nos isolados.

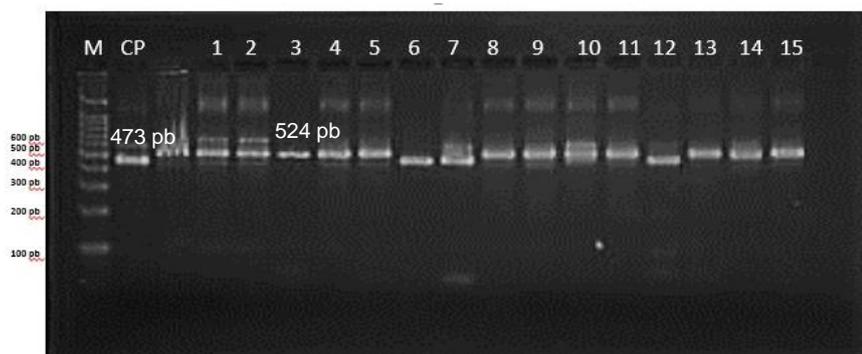


Figura 6.6. Gel de agarosa ao 2,5%: amplificação da família alélica 3D7 do gene *msp2*  
M: marcador de peso molecular 100 pb, CP: controle positivo 3D7; Amostras 1-15

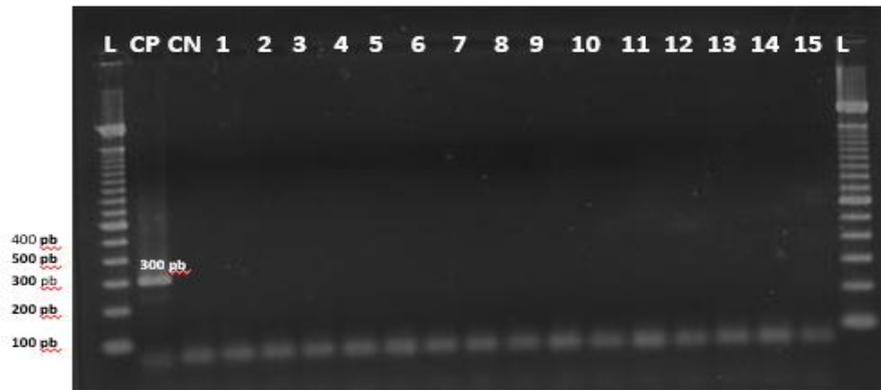
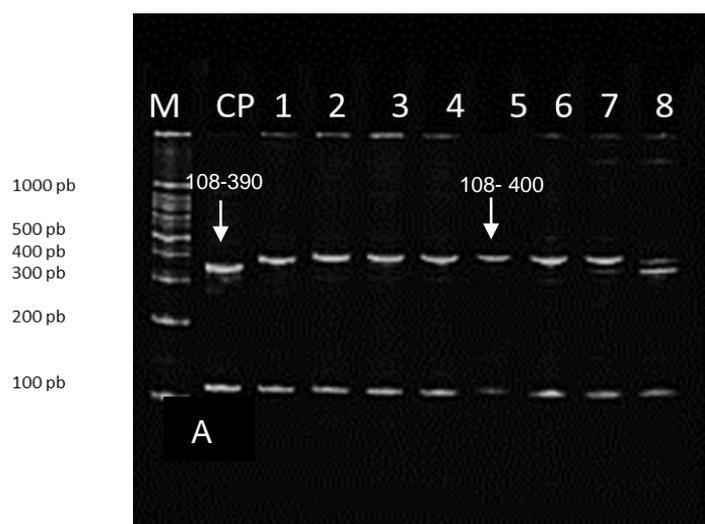


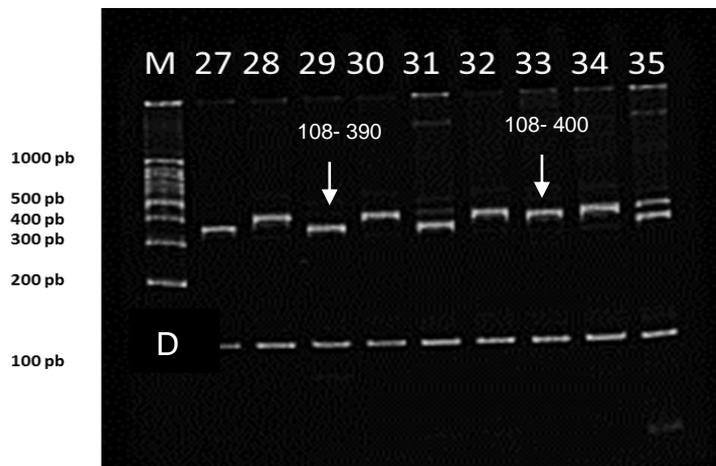
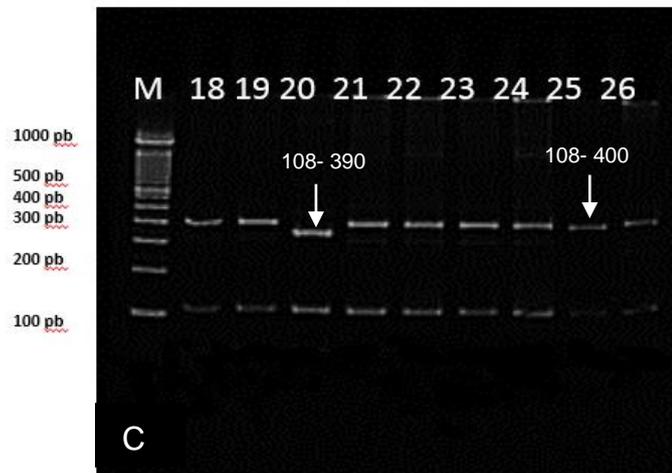
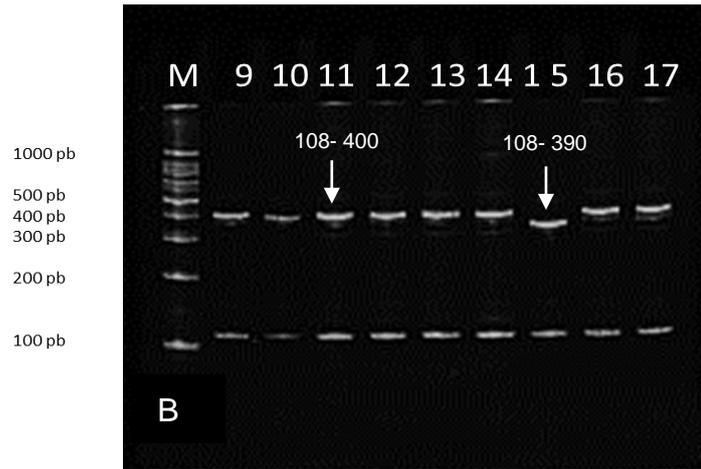
Figura 6.7. Gel de agarosa ao 2,5%: ausência da família alélica FC27 do gene *msp2*

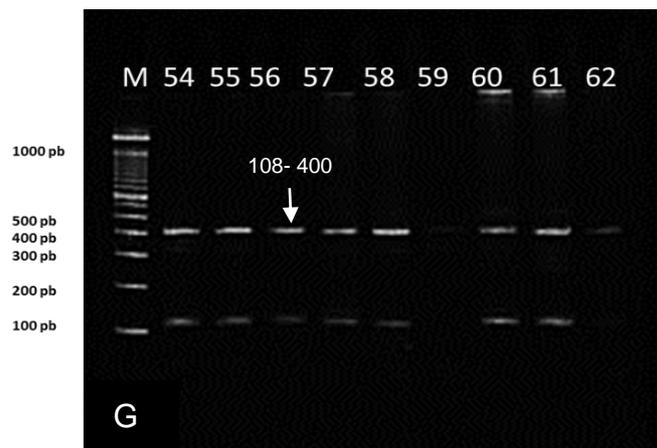
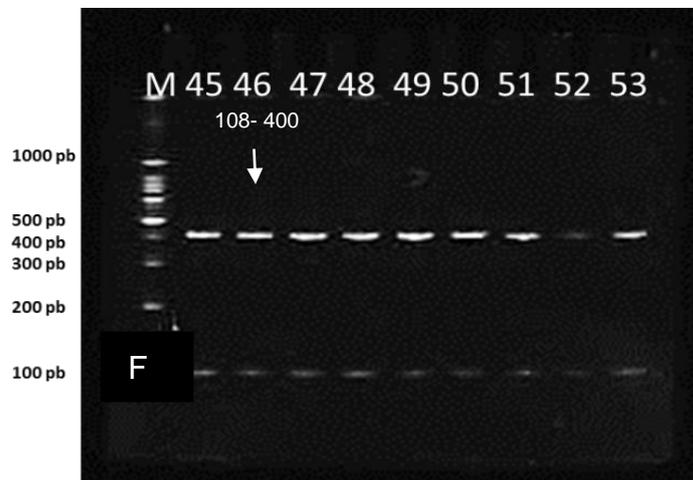
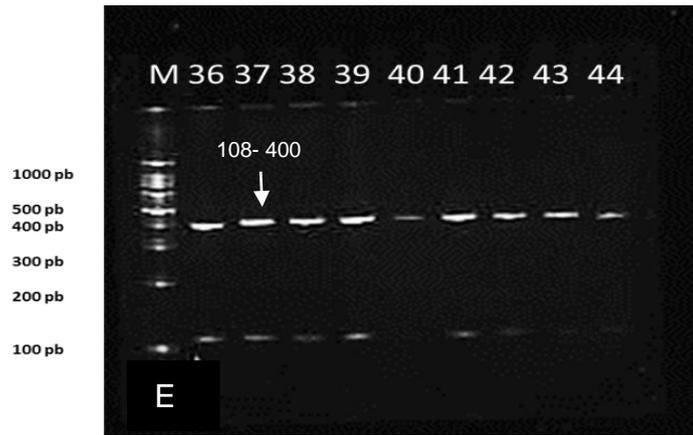
L: marcador de peso molecular 100 pb, CP: controle positivo FC27, CN: controle negativo, Amostras 1-15

### 6.5.1. Diversidade Genética da Família 3D7

A diversidade da família 3D7 foi analisada de acordo com o tamanho das bandas dos produtos digeridos e analisados em géis de poliácridamida 10%. Foram identificados 2 genótipos na família 3D7, caracterizados pela combinação dos fragmentos de 108 pb, 349 e 400pb (Figuras 6.7 A-I). O fragmento de 16 pb não foi identificado em todas as amostras possivelmente pelo baixo peso molecular e rápida migração do fragmento no gel.







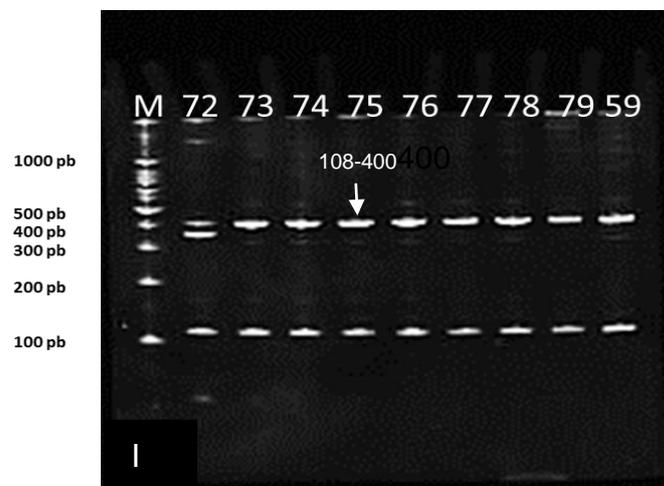
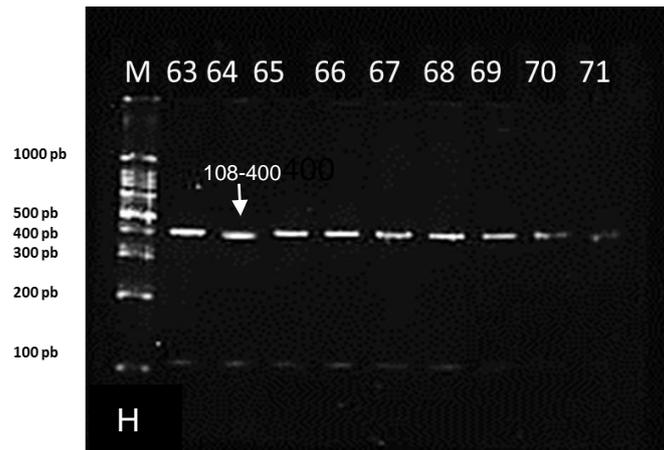


Figura 6.8. Géis de poliacrilamida 10% mostrando a amplificação da família alélica 3D7 do gene *msp2* do *P. falciparum*.

M: marcador de peso molecular 100 pb, CP: controle positivo 3D7; A. Amostras 3-8; B. Amostras 9-17, C. Amostras 18-26, D. Amostras 27-35, E. Amostras 36-44, F. Amostras 45-53, G. Amostras 54-62, H. Amostras 63-71, I. Amostras 72-79.

Quadro 6.1. Alelos do gene *msp2* identificados no Município de Barcelos

Genótipo	Família alélica	Tamanhos dos fragmentos <i>Hinf</i> I
Genótipo 1	3D7	16, 108 e 349
Genótipo 2	3D7	16, 108 e 400

O genótipo 2 (16,108 e 400) foi o mais comum nos indivíduos e só foram identificadas duas amostras que portavam os dois genótipos (Tabela 6.2).

Tabela 6.1. Distribuição da diversidade genética em indivíduos no município de Barcelos

<b>Genótipos</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
Genótipo 1	6	7,59
Genótipo 2	71	89,87
Genotipo1 e 2	2	2,53
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>100,00</b>

A combinação de genótipos (genótipos 1 e 2) só foi achada em duas amostras de indivíduos do sexo masculino. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença dos genótipos segundo o sexo ( $p= 0,2634$ ) (Tabela 6.3)

Tabela 6.2. Distribuição da diversidade genética segundo sexo.

<b>Genótipo</b>	<b>Feminino</b>		<b>Masculino</b>		<b>Total</b>		<b>p- value</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>Genótipo 1</b>	4	10,3	2	5,00	6	7,59	0,2634
<b>Genótipo 2</b>	35	89,7	36	90,00	71	89,87	
<b>Genótipo 1 e 2</b>	0	0	2	5,00	2	2,53	
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>	<b>79</b>	<b>100,00</b>	

Na distribuição de genótipos por faixa etária nos indivíduos do estudo, se observou que o genótipo 1 foi mais frequente em indivíduos da faixa entre 10 e 14 anos (15%,  $n=3$ ), o genótipo 2 na faixa de idade de 15 e 49 anos (95,24%,  $n=20$ ) e a combinação de genótipos genótipo 1 e 2 foi observada na faixa  $\leq 5$  anos (9,09%,  $n=1$ ) e na faixa de 15 - 49 anos (4,76%,  $n=1$ ). Ao comparar as medias das idades dos genótipos identificados não se encontraram diferenças significativas ( $p=0,22$ ) (Tabela 6.4)

Tabela 6.3. Distribuição da diversidade genética segundo a faixa etária dos indivíduos.

	Genótipo 1		Genótipo 2		Genótipo 1 e 2		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Faixa etária</b>								
<b>≤ 5 anos</b>	2	18,18%	8	72,73%	1	9,09%	1	100,00%
<b>6 - 9 anos</b>	1	6,25%	15	93,75%	0	0,00%	6	100,00%
<b>10 - 14 anos</b>	3	15,00%	17	85,00%	0	0,00%	0	100,00%
<b>15 - 49 anos</b>	0	0,00%	20	95,24%	1	4,76%	1	100,00%
<b>≥ 50 anos</b>	0	0,00%	11	100,00%	0	0,00%	1	100,00%
<b>Total</b>	6	7,59%	71	89,87%	2	2,53%	9	100,00%

Nas localidades do estudo, o genótipo 1 somente foi encontrado em 3 indivíduos das localidades de Comunidade Floresta, 2 indivíduos em Mariuá, 1 indivíduo em Igarapé, 1 indivíduo em Acucuaia, 1 indivíduo de São Francisco e 1 de Aparecida. O genótipo 2 foi achado em todas as localidades sendo mais prevalente nas localidades de São Sebastião seguido por Mariuá (Figura 6.8).

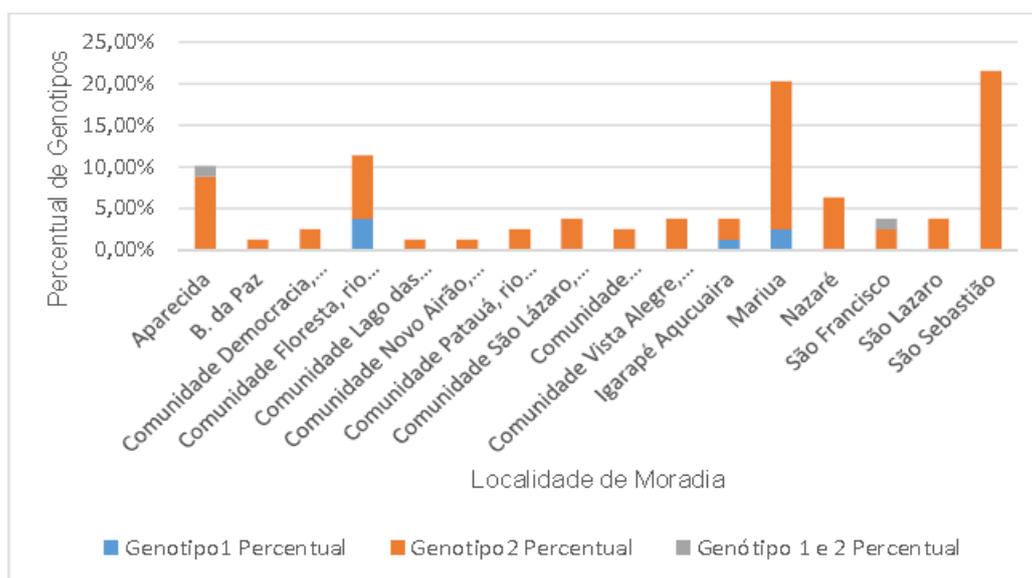


Figura 6.7. Distribuição da diversidade genética segundo o local de moradia

Ao compararmos os portadores de genótipos por áreas (rural e urbana), o genótipo 1 foi mais comum em áreas rurais presente em quatro indivíduos (15,38%), o genótipo 2 foi mais frequente em área urbana, presente em 49 indivíduos (92,45%) e a combinação dos dois genótipos só esteve presente na

área urbana. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao comparar a presença de genótipos por áreas rural e urbana ( $p= 0,12$ ).

Tabela 6.4. Distribuição da diversidade genética segundo os antecedentes de malária

	Genótipo 1		Genótipo 2		Genótipo 1 e 2		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Malária previa</b>								
<b>0</b>	2	25,00	6	75,00	0	0,00	8	100,00
<b>1</b>	0	0,00	16	94,12	1	5,88	17	100,00
<b>2 a 4</b>	0	0,00	25	100,00	0	0,00	25	100,00
<b>≥ 5</b>	4	13,79	24	82,76	1	3,45	29	100,00
<b>Total</b>	6	7,59	71	89,87	2	2,53	79	100,00

Os dois indivíduos que apresentaram ambos os genótipos (1 e 2) circulando haviam apresentado um ou mais de cinco episódios prévios de malária. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o número de malárias prévias e os genótipos circulantes ( $p= 0,11$ )

Foi observado que só dois indivíduos com malária clínica portavam os dois genótipos simultaneamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao comparar a presença de genótipos com o desfecho clínico dos indivíduos ( $p= 0,48$ ) (Tabela 6.6).

Tabela 6.5. Diversidade dos genótipos segundo o desfecho clínico

Genótipo	Assintomáticos		Malária		Total		p-value
	n	%	n	%	N	%	
<b>Genótipo 1</b>	4	66,67	2	33,33	6	100,00	0,485
<b>Genótipo 2</b>	28	39,43	43	60,56	71	100,00	
<b>Genótipo 1 e 2</b>	0	0,00	2	100,00	2	100,00	
<b>Total</b>	32	40,50	47	59,49	79	100,00	

### 6.5.2. Multiplicidade da Infecção

Dos indivíduos estudados, 77 (97,47%) apresentaram infecções monoclonais (portadores de 1 genótipo) e 2 indivíduos com infecções policlonais (portadores de 2 genótipos) (2,53%) circulando simultaneamente. Somente dois indivíduos do sexo masculino apresentaram infecções policlonais pelos genótipos circulantes no município. Cada indivíduo apresentou pelo menos um genótipo. Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de genótipos presentes nos indivíduos quando foram estratificados pelo sexo ( $p= 0,26$ ). (Tabela 6.7).

Tabela 6.6. Número de genótipos estratificado por sexo

Número	Feminino		Masculino		Total		p- value
	n	%	n	%	n	%	
<b>Monoinfecção</b>	39	100,00%	38	95,00%	77	97,46%	
<b>Poli-infecção</b>	0	0,00%	2	5,00%	2	2,53%	
<b>Total</b>	39	100,00%	40	100,00%	79	100,00%	0,2634

Ao comparar o número de genótipos circulando por faixas etárias não se encontraram diferenças significativa ( $P= 0,46$ ) (Tabela 6.8).

Tabela 6.7. Número de genótipos circulando de acordo à faixa etária.

Faixa etária	Número de Genótipos						p- value
	Mono-Infecção		Poli-infecção		Total		
	n	%	n	%	n	%	
<b>≤ 5 anos</b>	10	90,90	1	9,09	11	100,00	
<b>6 - 9 anos</b>	16	100,00	0	0,00	16	100,00	
<b>10 - 14 anos</b>	20	100,00	0	0,00	20	100,00	
<b>15 - 49 anos</b>	20	95,23	1	4,76	21	100,00	
<b>≥ 50 anos</b>	11	100,00	0	0,00	11	100,00	
<b>Total</b>	77	97,46	2	2,53	79	100,00	0,46

Só duas localidades apresentaram presença de infecções múltiplas, cada uma em um indivíduo, um na localidade de Aparecida e outro em São Francisco, ambas na área urbana do município. Com relação à distribuição de número de genótipos segundo a área de coleta (rural e urbana), se observou que não houve diferença significativa ( $p = 0,80$ ) com relação ao número de genótipos por indivíduos desta área (Tabela 6.9).

Tabela 6.8. Número de genótipos segundo a área de coleta de amostra (rural-urbana)

Área	Rural		Urbana		Total		p- value
	n	%	n	%	n	%	
<b>Mono-infecção</b>	26	33,77	51	66,23	77	100,00	
<b>Poli-infecção</b>	0	0	2	100	2	100,00	
<b>Total</b>	26	32,911	53	67,0886	79	100,00	0,80

Os indivíduos que albergavam dois genótipos circulantes simultaneamente, haviam apresentado malárias prévias; no entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o número de genótipos e os antecedentes de malária nos indivíduos ( $p=0,63$ ) (Tabela 6.10)

Tabela 6.9. Número de genótipos segundo antecedentes de malária

	Número de Genótipos						Valor de p
	Mono-infecção		Poli-infecção		Total		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Episódios prévios de malária</b>							
<b>0</b>	8	100,00	0	0,00	8	100,00	0,63
<b>1</b>	16	94,12	1	5,88	17	100,00	
<b>2-4</b>	25	100,00	0	0,00	25	100,00	
<b>≥5</b>	28	96,55	1	3,45	29	100,00	
<b>Total</b>	77	97,47	2	2,53	79	100,00	

Em média, os indivíduos assintomáticos eram portadores de monoinfecções por um só genótipo e os indivíduos com malária clínica apresentaram uma média de 1,04 genótipos. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p= 0,65$ ) (Figura 6.9).

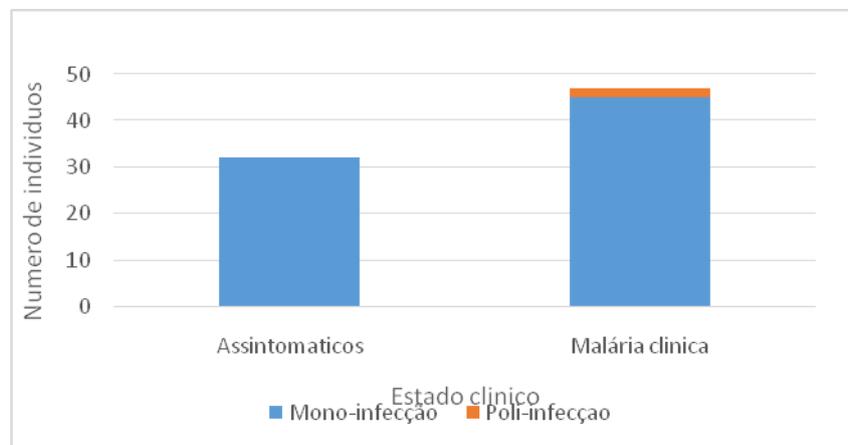


Figura 6.8. Número de genótipos circulando segundo estado clínico dos indivíduos.

## 7 DISCUSSÃO.

O município de Barcelos tem sido considerado como um município de médio e alto risco na apresentação de casos de malária na região amazônica. Até agora várias pesquisas tem sido desenvolvidas para entender a epidemiologia da malária nesta região, chegando a classificar a área urbana como uma área hipoendêmica com transmissão sazonal. A área rural é considerada de alta transmissão com aproximadamente 80% de infecções pelo *P. vivax* e com presença de infecções assintomáticas (19,20,41).

Este é o primeiro estudo da diversidade genética de *P. falciparum* em isolados do município de Barcelos (AM), área endêmica de malária, utilizando como alvo o gene que codifica a Proteína de Superfície do Merozoíta 2 (MSP2). Estudos realizados na África e no sudeste asiático mostram que a diversidade genética de *P. falciparum* limita a eficácia da imunidade protetora frente à doença (82,90). Essa diversidade tem sido uma das hipóteses para explicar a lenta aquisição de imunidade contra a malária nos indivíduos que moram nas áreas endêmicas (91). O conhecimento da diversidade do *P. falciparum* é uma ferramenta importante para o entendimento da patologia da doença, a aquisição da imunidade, a disseminação da resistência as drogas e as condições de transmissão (92). A complexidade genética do parasito é avaliada pela identificação de genótipos circulantes nas diferentes áreas geográficas, fundamental para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle da doença (3).

Tem se identificado que em regiões endêmicas de malária, indivíduos infectados transportam clones de parasitas com características genéticas e fenotípicas diferentes, sendo aparentemente um fenômeno de grande importância para o desenvolvimento de uma imunidade antimalárica eficiente, que depende das contínuas exposições à um grande número de variantes do parasito e antígenos da malária (93,94).

Usando o gene *msp2* como marcador molecular, no município de Barcelos foi observada uma baixa diversidade genética dos isolados do *P. falciparum* na população de estudo. Não foi detectada a família alélica FC27

circulando na região. Foram identificados dois alelos dentro da família alélica 3D7. Esses dados são consistentes com estudos realizados nos estados de Rondônia (Ariquemes e Porto Velho) e Mato Grosso (Peixoto Azevedo), onde o número máximo de alelos reportados foi cinco (95,96). Outros estudos de diversidade genética de outros países nas Américas confirmam estes achados, com um registro máximo, até o momento, de três genótipos para o gene *msp2* em Honduras, Venezuela e na Colômbia, e 2 genótipos na Guiana Francesa (92,97,98), o que possivelmente pode ser explicado pelo fato de serem países de baixa endemicidade se comparados com os países africanos e asiáticos.

A população de parasitos do *P. falciparum* que circulam nos países do continente Americano apresentam um perfil homogêneo, diferente dos achados em estudos feitos na Tailândia (3,99), Senegal (100), Papua Nova Guiné (101), Costa do Marfim (102) e Nigéria (103), onde a diversidade genética é alta. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de ter sido observado uma baixa variabilidade genética dos parasitos circulantes, o que também foi encontrado nas amostras do município de Barcelos, indicando possivelmente que a população de *P. falciparum* nesta área é pequena e que a baixa taxa de transmissão é suficiente para ter como resultado uma redução local na diversidade, comportamento similar ao achado num estudo feito no estado de Rondônia (95).

A conduta do vetor também pode ter um papel importante no desenvolvimento da diversidade genética da região, dado que a taxa de inoculação entomológica do município é baixa (EIR: Entomological inoculation rate) quando comparada com os dados africanos.

Segundo a espécie, o vetor pode apresentar uma EIR diferente, o que pode explicar que áreas de baixa endemicidade na África e na Ásia apresentem uma diversidade genética alta em comparação com os países das Américas, tendo em conta que os vetores transmissores da doença são diferentes e possuem diversos graus de competência vetorial em cada uma das regiões.

Tami et al (2002) (97) sugeriram que a baixa diversidade genética das populações de *P. falciparum* nas Américas não só poderia estar relacionada à

intensidade da transmissão, mas também poderia estar influenciada por um efeito gargalo. Esse efeito poderia ser consequência da introdução recente de espécies do velho mundo a este continente desde o tempo da colonização europeia, mencionando a possibilidade de que as espécies de *Anopheles* das Américas poderiam não transmitir todas as populações de parasitos que foram introduzidas (97).

O 100% dos isolados estudados apresentaram amplificação da família 3D7, com ausência da família alélica FC27. Dados similares tem sido descritos em estudos feitos em municípios da Colômbia onde a família alélica FC27 também não foi encontrada (104,105).

A distribuição das famílias alélicas do gene *msp2* de acordo com o estado clínico tende a variar em diferentes estudos. Em áreas hiperendêmicas de malária tem sido registrada a presença da família alélica 3D7 em amostras de indivíduos com infecções assintomáticas relacionando-se com o desenvolvimento de uma proteção contra a doença clínica (64,106). No presente estudo a família 3D7 foi identificada tanto em indivíduos com infecção assintomática como em indivíduos com malária clínica. A ausência da família FC27 nestes isolados discordam dos estudos feitos em Papua Nova Guiné onde a família alélica FC27 foi mais encontrada em casos de malária clínica que em infecções assintomáticas (107) e de estudos do leste do Sudão e do sudoeste da Nigéria onde a família FC27 foi relacionada com o desenvolvimento de infecção assintomática (103,108,109). No entanto, nossos resultados estão correlacionados com estudos realizados no nordeste da Tanzânia, Gabão e Benin que mostraram a ausência da relação entre genótipos e o desenvolvimento do estado clínico do indivíduo ( $p= 0,48$ ) (99,110–112). Estes resultados podem sugerir que a relação do estado clínico e a diversidade pode estar influenciada pelas características geográficas das regiões visto que as manifestações clínicas podem apresentar variações segundo a endemicidade.

Apesar da recombinação meiótica que ocorre no ciclo esporogônico dentro do mosquito, a presença de poucas variantes alélicas circulando na população do município de Barcelos pode ter reduzido a oportunidade para surgimento frequente de novos genótipos favorecendo a auto fertilização com

uma diversidade limitada, apresentando um padrão homogêneo semelhante a uma característica da população nativa de *P. falciparum* neste município (97).

As amostras de indivíduos obtidas dos bairros do município de Barcelos (área urbana), Padauri e do Parque Natural de Jaú (área rural) possuíam o mesmo tipo de alelos ( $p= 0,12$ ), apesar da distância geográfica entre essas três áreas. Esses achados sugerem que há um repertório restringido de genótipos diferentes circulando na área, não sendo suficientes para gerar mudanças no padrão da diversidade genética populacional, apesar da migração de pessoas na área.

Estudos baseados em técnicas de PCR indicam que o número de genótipos circulando simultaneamente em um mesmo indivíduo (multiplicidade da infecção) depende da intensidade da transmissão (62), sendo que em zonas holoendêmicas de malária tem-se relacionado como dependente da idade, intensidade da transmissão e variabilidade sazonal (7,100,113–115).

No presente estudo, as populações de parasitas do município de Barcelos apresentaram uma proporção baixa de infecções policlonais (2,5% dos indivíduos apresentavam mais de um clone do parasita) com uma média do MOI de 1,02 clones. Estes dados estão de acordo com estudos prévios realizados em Rondônia e na Guiana Francesa, nos quais a multiplicidade também foi baixa (95,98,105). A presença de múltiplas infecções é necessária para o desenvolvimento da auto fertilização no vector e o surgimento de novos alelos recombinantes. A baixa MOI nesta população pode explicar a limitada diversidade genética dada pela baixa proporção de número de clones nos indivíduos de estudo. Não obstante, o número relativamente pequeno de amostras analisadas, também deve ser considerado como uma explicação para a homogeneidade observada.

Este estudo não demonstrou associação significativa entre o estado clínico do indivíduo e a MOI ( $p= 0,65$ ) estando de acordo com um estudo realizado em Senegal onde não foi relatada associação significativa entre o MOI e a malária clínica (116), em contraste com estudos feitos no Congo e Gana onde foi descrita uma associação entre o estado clínico e o MOI (117,118). Os resultados deste estudo mostraram que todos os indivíduos

assintomáticos apresentaram infecções monoclonais, dados similares aos achados em estudo feito numa área de baixa endemicidade e com transmissão sazonal no oeste do Sudão (108). Outros estudos em áreas de alta endemicidade, reportam que indivíduos assintomáticos com múltiplas infecções são associados com uma redução no risco de apresentar malária clínica (119).

A comparação de médias da MOI de indivíduos segundo antecedentes de malária previa não foi significativa ( $p=0,48$ ), diferente a estudos feitos no sudoeste da Etiópia onde a MOI de indivíduos com malárias prévias foi mais alto com relação aos que não tinham apresentado histórico de malárias (120). Estudos diversos têm descrito uma variação da MOI sobre a idade, sugerindo que esta influência é altamente afetada pela endemicidade de malária na área (9,62,66). No estudo aqui apresentado, a MOI não foi dependente da idade ( $p=0,46$ ), porém a falta de correlação destas variáveis, MOI e idade, necessitam de confirmação em um estudo populacional com maior número de amostras.

Este estudo representa a primeira análise das características moleculares de populações de *P.falciparum* tendo como alvo o gene que codifica para a proteína de superfície do merozoíta 2 em isolados do município de Barcelos (AM). Porém é necessário a realização de estudos com um maior número de amostras assim como o uso de outros marcadores para corroborar que a diversidade genética e a MOI desta região é baixa.

## 8 CONCLUSÕES

- Através da genotipagem do gene *msp2* foi encontrada uma diversidade genética limitada com a circulação de dois genótipos em populações de *P. falciparum* no município de Barcelos. Esses genótipos pertenciam à família alélica 3D7. Houve ausência de amplificação para a família alélica FC27.
- Nos isolados clínicos de indivíduos provenientes da região do médio rio Negro Amazonas, foram detectados, em dois indivíduos, a presença de infecções múltiplas com dois genótipos diferentes.
- Não foi encontrada associação entre a diversidade genética e a presença de infecções múltiplas do *P. falciparum* com o desfecho clínico dos indivíduos infectados.

## 9 PERSPECTIVAS

- Realização de um estudo com um maior número de amostras para corroborar os dados obtidos neste estudo;
- Sequenciar os fragmentos de PCR referentes ao bloco 3 do gene *msp2* de *P. falciparum* a fim de se avaliar os polimorfismos existentes na população de parasitos na região de Barcelos;
- Estudar a diversidade genética de *P. falciparum* utilizando outros antígenos candidatos a vacina, como, por exemplo, o gene *msp1* (MerozoiteSurfaceProtein 1) e *glurp* (GlutamateRichProtein);
- Realizar um estudo de eficácia de medicamentos utilizando os genes *msp1* e *msp2* para o monitoramento de falha terapêutica e nova infecção.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sivep M. Malária Notificação de casos [Internet]. 2015. Recuperado de: [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp)
2. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet.* 2013;45(6):648–55.
3. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(4):369–74.
4. Read AF, Taylor LH. The ecology of genetically diverse infections. *Science.* 2001;292(5519):1099–102.
5. Diggs CL, Ballou WR, Miller LH. The major merozoite surface protein as a malaria vaccine target. *Parasitol Today.* 1993;9(8):300–2.
6. Greenhouse B, Myrick A, Dokomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, Rosenthal PJ, et al. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(5):836–42.
7. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(1):81–8.
8. Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, Luty A, Reltien J, Georges A, et al. *Plasmodium falciparum*: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol.* 1997;87(1):39–46.
9. Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, et al. Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis.* 1997;175(4):921–6.
10. Haywood M, Conway DJ, Weiss H, Metzger W, D'Alessandro U, Snounou G, et al. Reduction in the mean number of *Plasmodium falciparum* genotypes in Gambian children immunized with the malaria vaccine SPf66. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:65–8.
11. Kiwanuka GN. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997-2007. *J Vector Borne Dis.* 2009;46(1):1–12.

12. Jimenez JN, Muskus CE, Velez ID. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its implications in the epidemiology of malaria. *Biomedica*. 2005;25(4):588–602.
13. Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(6):987–95.
14. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434(7030):214–7.
15. Ntoumi F, Ngoundou-Landji J, Lekoulou F, Luty A, Deloron P, Ringwald P. Site-based study on polymorphism of *Plasmodium falciparum* MSP-1 and MSP-2 genes in isolates from two villages in Central Africa. *Parassitologia*. 2000;42(3-4):197–203.
16. Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93(4):375–80.
17. Fenton B, Clark JT, Wilson CF, McBride JS, Walliker D. Polymorphism of a 35-48 kDa *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;34(1):79–86.
18. Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, Anders RF, Saul A, Baea K, et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine*. 2003;22(1):30–41.
19. Suárez-Mutis M, Cuervo P, Fernandes O, Coura J. Evidência da presença de infecção assintomática por *Plasmodium* no médio rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(Supl I):268–9.
20. Ladeia-Andrade S. Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. [Rio de Janeiro]: Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2005.
21. MacRaild CA, Zachrdla M, Andrew D, Krishnarjuna B, Novacek J, Zidek L, et al. Conformational dynamics and antigenicity in the disordered malaria antigen merozoite surface protein 2. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119899.
22. OMS. 10 datos sobre el paludismo [Internet]. 2015. Recuperado de: <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/es/>
23. Cox-Singh J, Culleton R. *Plasmodium knowlesi*: from severe zoonosis to animal model. *Trends Parasitol*. 2015;31(6):232–8.
24. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, et al. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):852–60.

25. WHO. World Malaria Report 2014. 2014
26. WHO. Malaria [Internet]. 2015. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
27. MS M da S. Ministério da Saúde lança Plano de Eliminação da malária no Brasil [Internet]. Recuperado de: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20609-ministerio-da-saude-lanca-plano-de-eliminacao-da-malaria-no-brasil>
28. Camargo EP. Malaria, Maleita, Paludismo. *Cienc Cult.* 2003;55(1):26–32.
29. Albuquerque BCJ de, Suárez Mutis MC. A malária no Amazonas. In: Espaço e doença: um olhar sobre o Amazonas. FIOCRUZ; 1998. p. 2–10.
30. Alburquerque BCJ, Suarez-Mutis MC. A malária no Amazonas. In: Rojas LBI, de Toledo LM, organizadores. Espaço Doença: Um olhar sobre o Amazonas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998. p. 1–9.
31. Chagas C. Notas sobre a epidemiologia do Amazonas. *Bras Méd.* 1913;42.
32. Hochman G, Mello MT, Santos PR. [Malaria in pictures: images from Brazil's public health campaigns in the first half of the twentieth century]. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2002;9 Suppl:233–73.
33. Marques AC. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol Today.* 1987;3(6):166–70.
34. MS M da S. SVS Malaria [Internet]. 2015. Recuperado de: [http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10933&Itemid=646](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646)
35. Tauil P, Daniel-Ribeiro C. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. *Res Rev Parasitol.* 1998;58:163–7.
36. WHO. Expert committee on Malaria, Report on the Third Session. *Tech Rep.* 1950;8.
37. Rey L. Parasitologia. In: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Americas e na Africa. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
38. Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2, organizador. Rio de Janeiro: Guanabara; 2013.
39. IBGE. Amazonas: Barcelos [Internet]. 2015. Recuperado de: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130040&search=amazonas|barcelos>
40. Cruz O. Relatório das condições medico sanitárias do valo do Amazonas. Rio de Janeiro: Casa de Oswldo Cruz; 1913.

41. Cevallos TW. Estudo do processo de transmissão da malária humana na sede do município de Barcelos, Estado do Amazonas, Brasil. [Rio de Janeiro]: Departamento de Medicina Tropical. IOC. FIOCRUZ, Departamento de Medicina Tropical. IOC. FIOCRUZ; 2001.
42. Suárez-Mutis MC. Epidemiologia da malária em comunidades do rio Padauri, médio rio Negro, uma área de extrativismo vegetal da piaçaba no estado de Amazonas. [Rio de Janeiro]: Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz; 2007.
43. Ferreira MU, Hoffmann EHE, Wunderlinch G. Diversidade Antigênica nos Parasitas da Malária. In: Coura JR, organizador. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 875–86.
44. CDC. Malaria Biology [Internet]. 2012. Recuperado de: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
45. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(1):15–9.
46. Agyeman-Budu A, Brown C, Adjei G, Adams M, Dosoo D, Dery D, et al. Trends in multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic residents in the middle belt of Ghana. *Malar J.* 2013;12:22.
47. Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(3):229–37.
48. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):641–8.
49. Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet.* 1999;353(9162):1415–6.
50. Staalsoe T, Hviid L. The Role of Variant-specific Immunity in Asymptomatic Malaria Infections: Maintaining a Fine Balance. *Parasitol Today.* 1998;14(5):177–8.
51. Farnert A, Arez AP, Correia AT, Bjorkman A, Snounou G, do Rosario V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(1):50–3.
52. Babiker HA, Abdel-Muhsin AM, Ranford-Cartwright LC, Satti G, Walliker D. Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(4):582–90.

53. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 2012;11:29.
54. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;419(6906):498–511.
55. Kemp DJ, Cowman AF, Walliker D. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Adv Parasitol.* 1990;29:75–149.
56. Tanabe K, Sakihama N, Walliker D, Babiker H, Abdel-Muhsin AM, Bakote'e B, et al. Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum* msp1. *Gene.* 2007;397(1-2):153–60.
57. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, et al. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(5):726–35.
58. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:11–4.
59. Hoffmann EH, da Silveira LA, Tonhosolo R, Pereira FJ, Ribeiro WL, Tonon AP, et al. Geographical patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2. *Ann Trop Med Parasitol.* 2001;95(2):117–32.
60. Paul RE, Hackford I, Brockman A, Muller-Graf C, Price R, Luxemburger C, et al. Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(2):195–203.
61. Yuan L, Zhao H, Wu L, Li X, Parker D, Xu S, et al. *Plasmodium falciparum* populations from northeastern Myanmar display high levels of genetic diversity at multiple antigenic loci. *Acta Trop.* 2013;125(1):53–9.
62. Arnot D. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92(6):580–5.
63. Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:59–64.
64. al-Yaman F, Genton B, Reeder JC, Anders RF, Smith T, Alpers MP. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(5):602–5.

65. Muller DA, Charlwood JD, Felger I, Ferreira C, do Rosario V, Smith T. Prospective risk of morbidity in relation to multiplicity of infection with *Plasmodium falciparum* in Sao Tome. *Acta Trop.* 2000;78(2):155–62.
66. Felger I, Tavul L, Kabintik S, Marshall V, Genton B, Alpers M, et al. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp Parasitol.* 1994;79(2):106–16.
67. Guerra-Neira A, Rubio JM, Royo JR, Ortega JC, Aunon AS, Diaz PB, et al. *Plasmodium* diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa). *Int J Health Geogr.* 2006;5:27.
68. Farnert A, Lebbad M, Faraja L, Rooth I. Extensive dynamics of *Plasmodium falciparum* densities, stages and genotyping profiles. *Malar J.* 2008;7:241.
69. Hamid MM, Mohammed SB, El Hassan IM. Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Field Isolates in Central Sudan Inferred by PCR Genotyping of Merozoite Surface Protein 1 and 2. *N Am J Med Sci.* 2013;5(2):95–101.
70. Boyle MJ, Langer C, Chan JA, Hodder AN, Coppel RL, Anders RF, et al. Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2014;82(3):924–36.
71. al-Yaman F, Genton B, Anders R, Taraika J, Ginny M, Mellor S, et al. Assessment of the role of the humoral response to *Plasmodium falciparum* MSP2 compared to RESA and SPf66 in protecting Papua New Guinean children from clinical malaria. *Parasite Immunol.* 1995;17(9):493–501.
72. Stanistic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun.* 2009;77(3):1165–74.
73. Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 2008;76(5):2240–8.
74. Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, et al. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med.* 2014;12:108.
75. Stubbs J, Olugbile S, Saidou B, Simpore J, Corradin G, Lanzavecchia A. Strain-transcending Fc-dependent killing of *Plasmodium falciparum* by merozoite surface protein 2 allele-specific human antibodies. *Infect Immun.* 2011;79(3):1143–52.

76. McCarthy JS, Marjason J, Elliott S, Fahey P, Bang G, Malkin E, et al. A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720. *PLoS One*. 2011;6(9):e24413.
77. Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, Kemp DJ, et al. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1991;88(5):1751–5.
78. Fenton B, Clark JT, Khan CM, Robinson JV, Walliker D, Ridley R, et al. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol*. 1991;11(2):963–71.
79. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;39(2):227–34.
80. Snewin VA, Herrera M, Sanchez G, Scherf A, Langsley G, Herrera S. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;49(2):265–75.
81. Anders RF, Adda CG, Foley M, Norton RS. Recombinant protein vaccines against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Hum Vaccin*. 2010;6(1):39–53.
82. Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A, et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis*. 2002;185(6):820–7.
83. Gupta P, Singh R, Khan H, Raza A, Yadavendu V, Bhatt RM, et al. Genetic profiling of the *Plasmodium falciparum* population using antigenic molecular markers. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:140867.
84. Basco LK, Tahar R, Escalante A. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVIII. Polymorphisms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 gene in isolates from symptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(3):238–44.
85. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VII. Analysis of recrudescence and reinfection in patients with uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63(5-6):215–21.
86. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J*. 2011;10:79.
87. Rojas LI, Toledo L. Espaço Doença: Um olhar sobre o Amazonas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998.

88. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol.* 1996;50:263–91.
89. Felger I, Irion A, Steiger S, Beck HP. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:3–9.
90. Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, Anders RF, et al. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2004;52(1):159–68.
91. MERCEREAU-PUIJALON O. Revisiting host/parasite interactions: molecular analysis of parasites collected during longitudinal and cross-sectional surveys in humans. *Parasite Immunol.* 1996;18(4):173–80.
92. Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorado IG, Figueroa J, Stahl S, et al. Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(1):30–4.
93. Koukouikila-Koussounda F, Malonga V, Mayengue PI, Ndounga M, Vouvongui CJ, Ntoumi F. Genetic polymorphism of merozoite surface protein 2 and prevalence of K76T pfcr mutation in *Plasmodium falciparum* field isolates from Congolese children with asymptomatic infections. *Malar J.* 2012;11:105.
94. Ogouyèmi-Hounto A, Gazard DK, Ndam N, Topanou E, Garba O, Elegbe P, et al. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from children in South of Benin. *Parasite.* 2013;20:37.
95. Sallenave-Sales S, Daubersies P, Mercereau-Puijalon O, Rahimalala L, Contamin H, Druilhe P, et al. *Plasmodium falciparum*: a comparative analysis of the genetic diversity in malaria-mesoendemic areas of Brazil and Madagascar. *Parasitol Res.* 2000;86(8):692–8.
96. Sallenave-Sales S, Ferreira-da-Cruz MF, Faria CP, Cerruti C Jr, Daniel-Ribeiro CT, Zalis MG. *Plasmodium falciparum*: limited genetic diversity of MSP-2 in isolates circulating in Brazilian endemic areas. *Exp Parasitol.* 2003;103(3-4):127–35.
97. Tami A, Grundmann H, Sutherland C, McBride JS, Cavanagh DR, Campos E, et al. Restricted genetic and antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* under mesoendemic transmission in the Venezuelan Amazon. *Parasitology.* 2002;124(Pt 6):569–81.
98. Arieu F, Chalvet W, Hommel D, Peneau C, Hulin A, Mercereau-Puijalon O, et al. *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(6):978–85.

99. Magesa SM, Mdira KY, Babiker HA, Alifrangis M, Farnert A, Simonsen PE, et al. Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania. *Acta Trop.* 2002;84(2):83–92.
100. Konate L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, et al. Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:21–8.
101. Fluck C, Schopflin S, Smith T, Genton B, Alpers MP, Beck HP, et al. Effect of the malaria vaccine Combination B on merozoite surface antigen 2 diversity. *Infect Genet Evol.* 2007;7(1):44–51.
102. Silue KD, Felger I, Utzinger J, Beck HP, Smith TA, Tanner M, et al. Prevalence, genetic diversity and multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in school children in central Cote d'Ivoire. *Med Trop Mars.* 2006;66(2):149–56.
103. Oyedeji SI, Awobode HO, Anumudu C, Kun J. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from naturally infected children in north-central Nigeria using the merozoite surface protein-2 as molecular marker. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(8):589–94.
104. Maestre A, Arango E, Carmona-Fonseca J. Status of allele frequency and diversity of *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp before implementation of an artemisinin-based combined therapy in Northwestern Colombia. *Colomb Med Cali.* 2013;44(4):208–12.
105. Montoya L, Maestre A, Carmona J, Lopes D, Do Rosario V, Blair S. *Plasmodium falciparum*: diversity studies of isolates from two Colombian regions with different endemicity. *Exp Parasitol.* 2003;104(1-2):14–9.
106. Farnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Bjorkman A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis.* 1999;179(4):989–95.
107. Engelbrecht F, Felger I, Genton B, Alpers M, Beck HP. *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol.* 1995;81(1):90–6.
108. IE AE, EIGHazali G, TM AE, Hamad AA, Babiker HA, Elbashir MI, et al. Allelic polymorphism of MSP2 gene in severe *P. falciparum* malaria in an area of low and seasonal transmission. *Parasitol Res.* 2007;102(1):29–34.
109. Amodu OK, Oyedeji SI, Ntoumi F, Orimadegun AE, Gbadegesin RA, Olumese PE, et al. Complexity of the msp2 locus and the severity of childhood malaria, in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008;102(2):95–102.

110. Issifou S, Ndjikou S, Sanni A, Lekoulou F, Ntoumi F. No influence of the transmission season on genetic diversity and complexity of infections in *Plasmodium falciparum* isolates from Benin. *Afr J Med Med Sci.* 2001;30 Suppl:17–20.
111. Issifou S, Rogier C, Adjagba-Olakpo M, Chabi-Worou N, Ntoumi F. Complexity and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infections in young children living in urban areas of Central and West Africa. *Parasitol Res.* 2003;90(5):423–8.
112. Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron P. Polymorphism in two merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon. *Malar J.* 2003;2:12.
113. Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, et al. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:15–20.
114. Engelbrecht F, Togel E, Beck HP, Enwezor F, Oettli A, Felger I. Analysis of *Plasmodium falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of msp2 genotypes and parasite-specific IgG responses. *Acta Trop.* 2000;74(1):63–71.
115. Bendixen M, Msangeni HA, Pedersen BV, Shayo D, Bodker R. Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to transmission intensity and host age: a study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(2):143–8.
116. 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. *Malar J.* 2008;7:17.
117. Ekala MT, Jouin H, Lekoulou F, Issifou S, Mercereau-Puijalon O, Ntoumi F. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1): genotyping and humoral responses to allele-specific variants. *Acta Trop.* 2002;81(1):33–46.
118. Ofosu-Okyere A, Mackinnon MJ, Sowa MP, Koram KA, Nkrumah F, Osei YD, et al. Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transition into the high transmission season. *Parasitology.* 2001;123(Pt 2):113–23.
119. Bereczky S, Liljander A, Rooth I, Faraja L, Granath F, Montgomery SM, et al. Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. *Microbes Infect.* 2007;9(1):103–10.
120. Mohammed H, Mindaye T, Belayneh M, Kassa M, Assefa A, Tadesse M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on MSP-1

and MSP-2 genes from Kolla-Shele area, Arbaminch Zuria District, southwest Ethiopia. *Malar J.* 2015;14:73.

# 11 Anexos

## Informação ao paciente sujeito da pesquisa

1. A finalidade da pesquisa é verificar se você está doente ou se é portador do parasita da malária, se tem risco de pegar malária, como tratar e prevenir a doença.
2. Devemos fazer uma entrevista, fazer algumas perguntas, um exame clínico e colher sangue para pesquisa do parasita da malária. Na colheita do sangue você sentirá uma picada como se fosse de um mosquito. Não haverá risco para sua saúde.
3. Se você estiver com o parasita da malária no sangue nós vamos trata-lo. Vamos também procurar o mosquito transmissor da malária na sua casa e fora dela. Se ele estiver presente vamos pedir ao agente de saúde ou à FNS para combatê-lo.
4. Não existe outro método no momento para controlar a malária, além do tratamento dos doentes, combate ao mosquito, uso de repelentes e mosquiteiros. Estamos pesquisando outras alternativas.
5. Você será acompanhado de 6 em 6 meses para ver como está. Se tiver algum problema relacionado à malária nesse intervalo ligar pelo rádio para o nosso laboratório, na Paróquia de Barcelos ou para a FNS em Barcelos.
6. Você tem a nossa garantia de ser informado a qualquer momento sobre a pesquisa, de permanecer ou sair dela quando desejar.
7. Você tem a liberdade de recusar a participar da pesquisa ou dela se retirar quando quiser, sem nenhum prejuízo, inclusive a assistência da sua saúde.
8. Os dados desta pesquisa são confidenciais para outras pessoas, mas você receberá todos os resultados do seu interesse. (Resultado dos exames, tratamentos feitos, etc). Os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para preparação de trabalhos científicos, sendo mantido o sigilo da identidade do sujeito da pesquisa.
9. Não haverá pagamento para participar na pesquisa, apenas o acompanhamento das pessoas envolvidas, tratamento e prevenção a nível da comunidade.
10. Qualquer problema de saúde que ocorra com você, decorrente da pesquisa será solucionado pela equipe médica, responsável pelo projeto.

## Consentimento após a informação

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar da pesquisa nos termos do que me foi esclarecido.

Rio Negro, Amazonas, / /

Assinatura do Paciente  
Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2004.

**PARECER**

**Título do Projeto:** "Estudo da malária em áreas de baixa e alta morbidade no médio e alto Rio Negro, estado do Amazonas e novas estratégias de controle"

**Protocolo CEP:** 157/02

**Pesquisador Responsável:** José Rodrigues Coura

**Instituição:** IOC

---

Foi apresentado e submetido a apreciação do CEP/FIOCRUZ o relatório parcial do projeto supra mencionado, sendo o mesmo considerado APROVADO.

José Luiz Telles de Almeida  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
Fundação Oswaldo Cruz