

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde**

**Avaliação de marcadores moleculares na determinação da diversidade
clonal nas infecções causadas por *Plasmodium vivax***

por

Aracele Maria de Souza

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR

A.M. SOUZA

2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação de marcadores moleculares na determinação da diversidade
clonal nas infecções causadas por *Plasmodium vivax***

por

Aracele Maria de Souza

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Biologia Celular e
Molecular.

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves
de Brito

Co-Orientação: Taís Nobrega de Souza

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S719a Souza, Aracele Maria.

2014

Avaliação de marcadores moleculares na determinação da diversidade clonal nas infecções causadas por *Plasmodium vivax* / Aracele Maria de Souza. – Belo Horizonte, 2014.

XX, 72 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 82 - 92

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária Vivax/genética 2. Plasmodium vivax /complicações 3. Proteína 1 de Superfície do Merozoíto/sangue I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação). III. Souza, Taís Nobrega de (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde**

**Avaliação de marcadores moleculares na determinação da diversidade
clonal nas infecções causadas por *Plasmodium vivax***

por

Aracele Maria de Souza

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)

Prof. Dr. Gustavo Campos e Silva Kunh

Profa. Dra. Roberta Lima Caldeira

Suplente: Roney Santos Coimbra

Dissertação defendida e aprovada em: 28 / 02 / 2014

IV

Souza AM

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se eu insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que eu acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se eu tenho convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tinha no começo.”

(Gandhi)

*Ao meu lindo filho que apesar da tenra idade,
um dia vai entender que todo meu esforço
foi em prol de um futuro melhor para ele.*

*Aos meus pais que não compreendem o porquê de tanto estudo,
Mas estão sempre ao meu lado me preenchendo com muito amor e carinho...
Peço desculpas por eu não estar por perto às vezes,
e obrigado por nunca terem me abandonado...*

*As minhas irmãs, Luci e Neiva, que apesar de pouco conhecimento em biologia
molecular tem grande contribuição para desfecho deste trabalho, pois elas me
ensinaram a gostar de aprender...*

*Ao marido Bruno por suportar nos meus momentos de estresse e angustias,
Mas que não me deixa desistir...*

*A Deus,
pelos instantes de inspiração, pela luz, pela perseverança...*

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, pela proposta de realização deste estudo, pelo privilégio deste aprendizado e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Dra. Taís Nobrega de Souza, pela sua disponibilidade, contribuição e orientação desde a concepção do projeto, por acreditar e confiar em mim!

Às doutoras Luzia Carvalho e Flora Kano, pelo apoio técnico, científico e profissional.

À minha amiga Sarah Stela os meus mais sinceros agradecimentos pela sua manifesta disponibilidade e valiosa contribuição na execução dos experimentos, na discussão dos resultados e na leitura do manuscrito.

À Flávia Caroline que contribuiu na execução dos experimentos e por ter cedido algumas amostras para enriquecer este trabalho.

Ao Antônio Mauro pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Às Denise Anete e Marina Lima que estão fazendo parte desse momento maravilhoso da minha formação, pelas ajudas incondicionais, por saber que posso contar com vocês e com quem compartilho diariamente os estresses, as conquistas, as alegrias. A minha eterna e infinita amizade.

À Alice Sabatino pela boa vontade em organizar os pedidos, os reagentes e o laboratório.

Ao Geraldo pela disposição diária nos pedidos de xerox, na preparação dos materiais e ajudas constantes no que for preciso.

À toda a equipe do laboratório de Malaria (LAMAL).

Às Elisângela e Mariana pela imensa ajuda na realização das genotipagens.

À minha querida amiga Flávia Rocha pela sua disponibilidade e boa vontade, na formatação e paginação do manuscrito, por cuidar tão bem do meu filho e por estar sempre ao meu lado.

À minha amiga Kátia, que me acolheu no primeiro laboratório de fiz iniciação científica, e com quem eu sempre tive apoio, amizade, companheirismo. Obrigada

pela paciência, pelos conselhos, por enfrentar comigo obstáculos e comemorar as vitórias.

Ao meu marido Bruno, um grande incentivador para realização deste trabalho, agradeço pelo apoio, por estar comigo e pelo nosso lindo filho.

Aos meus pais, Hélio e Maria Rita, pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

Às minhas irmãs Luci e Neiva, pelos apoios constantes e por estarem sempre ao meu lado.

À Dalva, Jack e Kaique, por me receberem tão bem em sua família e cuidar tão bem do meu filho.

Aos membros da banca examinadora, Gustavo Kuhn, Roberta Caldeira e Roney Coimbra, por estarem dispostos a ajudar e contribuir para o crescimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Malária (LAMAL) pelo apoio e desenvolvimento do projeto.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou pelo oferecimento deste curso de mestrado com ênfase em Biologia Molecular e Celular.

A todos que me apoiaram, incentivaram e ajudaram na minha formação como pessoa e profissional, e que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À todas agências de fomento pelo apoio financeiro: CAPES, FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 MALÁRIA: A DOENÇA NO MUNDO.....	21
1.2 CICLO BIOLÓGICO DO <i>PLASMODIUM SPP.</i>	25
1.3 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>P. VIVAX</i>	28
1.4 MARCADORES MOLECULARES DE <i>P. VIVAX</i>	30
1.4.1 <i>Microssatélites</i>	31
1.4.2 <i>Tandem repeats – TRs</i>	32
1.4.3 <i>Polimorfismos em antígenos</i>	33
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 ÁREAS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	37
4.2 AMOSTRAS DE SANGUE.....	37
4.3 AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES	38
4.4 CLONAGEM DE FRAGMENTO DE DNA EM PLASMÍDEO E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	41
4.5 GENOTIPAGEM DOS FRAGMENTOS NO SEGUENCIADOR AUTOMÁTICO <i>MEGABACE</i>	42
4.6 PREPARAÇÃO DAS MISTURAS ARTIFICIAIS	44
4.6.1 <i>Misturas artificiais de DNAs plasmidiais</i>	44
4.6.2 <i>Misturas artificiais de produtos da PCR de pacientes</i>	44
4.7 GENOTIPAGEM DE PACIENTES.....	45
<i>Souza AM</i>	XI

5 RESULTADOS.....	46
5.1 IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO DE TAMANHO.....	46
5.2 MISTURAS ARTIFICIAIS DE DIFERENTES VARIANTES CLONADAS NOS PLASMÍDEOS PCR2.1-TOPO E PGEM-T	47
5.2.1 <i>Clonagem dos fragmentos referentes a um locus em um mesmo plasmídeo.....</i>	54
5.3 DETECÇÃO DOS ALELOS NAS MISTURAS ARTIFICIAIS CONSIDERANDO A PROPORÇÃO DE 1/3 E 1/4	55
5.4 INFECÇÃO MÚLTIPLA ARTIFICIAL DE ISOLADOS DE <i>P. VIVAX</i>	59
5.5 GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE <i>P. VIVAX</i>	62
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	75
8 ANEXOS	77
9 REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da malária. Fonte: Modificado de WHO, 2011	22
Figura 2. Distribuição geográfica da malária no Brasil (WHO 2013).	23
Figura 3. Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor Anopheles. Fonte: Modificado de Mueller <i>et al.</i> , 2009	27
Figura 4. Exemplo de um processo de mutação “slippage” para um locus de microsatélite. Fonte: Adaptado Eisen, J. (1999).....	32
Figura 5. Representação esquemática da Proteína 1 de Superfície do Merozoite de <i>P. vivax</i> (PvMSP-1). Fonte: Brito; Ferreira (2011).....	34
Figura 6. Representação esquemática da Proteína 3 de Superfície do Merozoite de <i>P. vivax</i> (PvMSP-3 α) Fonte: Brito; Ferreira (2011).....	34
Figura 7. Diagrama esquemático da abordagem metodológica seguida no presente estudo.	38
Figura 8. Representação do resultado da eletroforese capilar no sequenciador automático MegaBACE.	43
Figura 9. Resolução em gel de agarose 2% dos produtos amplificados por PCR (MS06).	46
Figura 10. Determinação da eficiência de detecção de ambos os alelos nas misturas artificiais de clones para o marcador MSP-1B2.....	52
Figura 11. Determinação da eficiência de detecção de ambos os alelos nas misturas artificiais de clones para o marcador MS06.....	53

Figura 12. Eficiência de detecção de múltiplos clones por marcadores moleculares considerando as proporções 1/3 e 1/4 para os valores normalizados.....57

Figura 13. Frequência de detecção de alelos nas misturas artificiais pelos marcadores moleculares utilizados neste estudo considerando as proporções 1/3 e 1/4 para os valores normalizados.....58

Figura 14. Frequência de detecção de alelos nas misturas artificiais por todos os marcadores moleculares nas diversas diluições, considerando as proporções 1/3 e 1/4 para os valores normalizados.....59

Figura 15. Frequência de infecções múltiplas detectadas por cada marcador molecular considerando os diferentes critérios de detecção para o alelo menos abundante.62

Figura 16. Aumento na porcentagem de detecção considerando diferentes combinações dos marcadores avaliados neste estudo.....64

Figura 17. Identificação das infecções múltiplas pelos seis marcadores moleculares em amostras cuja multiplicidade de infecção já foi previamente identificada (realizada por dois estudos do nosso grupo de pesquisa).64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores e condições da PCR utilizados na amplificação dos marcadores moleculares de <i>P. vivax</i>	40
Tabela 2. Tamanho dos fragmentos (pb) amplificados por PCR e selecionados para clonagem em plasmídeos.....	47
Tabela 3. Valores das proporções de fluorescência observados e normalizados para os seis marcadores deste estudo apresentando as médias de 2 experimentos para cada marcador.	49
Tabela 3. Valores das proporções de fluorescência observados e normalizados para os seis marcadores deste estudo apresentando as médias de 2 experimentos para cada marcador (continuação).....	50
Tabela 3. Valores das proporções de fluorescência observados e normalizados para os seis marcadores deste estudo apresentando as médias de 2 experimentos para cada marcador (continuação).....	51
Tabela 4. Proporções de fluorescência observadas e normalizadas para o MS07, com ambos os fragmentos clonados no mesmo plasmídeo (pGEM-T).....	55
Tabela 5. Mistura artificial de isolados de campo para dois marcadores moleculares	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL – Microlitros

AM – Amazônia

AP – Amapá

CR – Regiões Conservadas

CSP – Proteína de Superfície do Circunsporozoito

dATP – desoxiAdenosina Trifosfatada

dCTP – desoxiCitidina Trifosfatada

dGTP – desoxiGuanosina Trifosfatada

DNA – *desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dTTP – desoxiTimidina Trifosfatada

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

g – Grama

H – horas

IPTG – isopropiltiogalactosídeo

Kb – Kilobases

LB – Luria-Bertani

M – Molar

Mg – Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – MiliMolar

MN21 – Minissatélite 21

MS – Microsatélites

MS07 – Microsatélite 6

MS6 – Microsatélite 7

MSP – Proteína de superfície do Merozoíto

MSP -1B10 – Proteína de superfície do Merozoíto 1 Bloco 10

MSP-1B2 – Proteína de superfície do Merozoíto 1 Bloco 2

MSP-3α – Proteína de superfície do Merozoíto 3 alfa

MT – Mato Grosso

NaCl – Cloreto de Sódio
Ng – Nanograma
°C – Grau Celsius
PA – Pará
PB – Pares de base
PCN – Número de cópias plasmideais
PCR-RFLP Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de Fragmentos
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial Hidrogenionico
PM – Peso Molecular
PvMSP – Proteína de superfície do Merozoíto do *Plasmódium vivax* repetições de tetranucleotídeos (CCACT).
RO – Rondônia
RPM – Rotações por minuto
SC – Semi-conservadas
SNPs – polimorfismos de base única
SOC Líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, 1,0g/L de SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária
TAA – Repetições de trinucleotídeos
Taq – *Thermus aquaticus*
TGA – repetições de trinucleotídeos (TGA)
Tm – Temperatura Média
TRs – *Tandem repeats*
U - Unidades
X-gal – Bromo-4-Cloro-3indolil- β -galactopiranosídeo
WHO – World Health Organization

RESUMO

A malária é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo *P. vivax* a espécie mais amplamente distribuída no mundo. Em áreas endêmicas, é frequente a co-infecção em um mesmo indivíduo por diferentes variantes de *P. vivax*, caracterizando uma infecção múltipla. Nestas infecções, diferentes proporções das variantes podem ser relevantes na competição entre elas, na virulência e na resistência às drogas. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a eficiência dos marcadores moleculares na identificação de infecções múltiplas por *P. vivax*. Desta forma, foram selecionados seis marcadores (MS06, MS07, MSP-3 α , MSP-1B2, MSP-1B10 e MN21) caracterizados por polimorfismos de tamanho analisados por eletroforese capilar. Para cumprir este objetivo foram usadas três estratégias metodológicas. Inicialmente dois diferentes alelos amplificados de cada loci foram clonados em plasmídeos para o estabelecimento de infecções múltiplas artificiais. Na segunda estratégia foram realizadas misturas artificiais de DNAs de pacientes com parasitemia e níveis de leucócitos semelhantes. E por fim, realizou-se a genotipagem de isolados de *P. vivax* de 47 pacientes da Amazônia Brasileira, sendo 22 pacientes com infecção múltipla previamente identificada. Ao simularmos infecções múltiplas artificiais com diferentes proporções de cada clone ou DNA de paciente verificamos que: (1) para os MS e TR, alelos menores foram preferencialmente amplificados por PCR; (2) para ambos os blocos da MSP-1, ocorreu titulação nos resultados; (3) para MSP-3 α não houve amplificação preferencial do alelo menor; (4) a utilização do critério de altura mínima de $\frac{1}{4}$ da do pico predominante para a detecção dos alelos raros foi mais eficiente na detecção da multiplicidade de infecção. Na genotipagem de isolados de campo os marcadores MS06, MS07, MSP-1B10, MSP-3 α e MN21 foram suficientes para detecção de 100% das infecções múltiplas em pacientes. Assim, estamos propondo um painel de marcadores neutros (MS06, MS07 e MN21) e não neutros (MSP-3 α e MSP-1B10) na detecção de infecções múltiplas utilizando o critério menos estrigente para detecção dos alelos raros.

ABSTRACT

Plasmodium vivax infection is often characterized by the presence of two or more genetically distinct variants co-infecting the same human host (multiple-clone infection). Competition between co-infecting parasite clones is a major factor in the evolution of phenotypes such as virulence, transmissibility and drug resistance. Thus, accurate detection of multiple-clone *P. vivax* infections is very important for malaria control. The accuracy of *P. vivax* genotyping and multiple-clone infections characterization depend on several factors, such as the methods and the molecular markers of choice used in genotyping, the number of markers assessed, and the population diversity of the markers. Thus, the present study sought to evaluate the efficiency of different molecular markers – antigen-coding genes (MSP-1B2 , MSP-1B10), tandem repeat (MN21) and microsatellites (MS06 and MS07) – to detect multiple-clone *P. vivax* infections. In addition, this study enabled us to compare the efficiency of molecular markers to detect multiple-clone infections with well known proportions of clones. These six markers are characterized by size polymorphisms, being amplified by PCR and analyzed by capillary electrophoresis. Three methodological strategies were used. Initially, two different fragments for each *locus* were cloned into plasmids for the establishment of artificial multiple-clone infections. In the second strategy, artificial mixtures of DNA from patients with similar levels of parasitemia and leukocytes were performed. Finally, we genotyped 47 isolates of *P. vivax* from patients living in the Brazilian Amazon, being 22 patients with previously identified multiple-clone infections. From the artificial multiple-clone infections, the most important data were: (1) for microsatellites and the tandem repeat, the minor alleles were preferentially amplified by PCR; (2) for both blocks of the MSP-1, reliable estimates were obtained of the relative abundance of alleles present in clone mixtures; (3) for MSP-3 α , no preferential amplification of the minor allele occurred, and (4) a minimum value of $\frac{1}{4}$ of the predominant peak for detection of rare alleles was more efficient in detecting the multiplicity of infection. For field isolate genotyping, a relevant result was that five markers - MS06, MS07, MSP-1B10, MSP-3 α and MN21 - were sufficient for detection of 100% of multiple infections in patients. Considering all these findings, we were able to define a panel of markers to be used in determining multiple-clone infections in epidemiological studies composed by.

neutral (MS06, MS07 and MN21) and non neutral (MSP-3 α and MSP-1B10) markers using the less stringent criteria for detection of rare alleles.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: A doença no mundo

Os parasitos causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium* que infectam alternadamente um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária que podem infectar aves, répteis, roedores e primatas (MOORE *et al.*, 2002), sendo que apenas cinco espécies habitualmente parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium ovale*. *P. ovale* é geralmente considerado como tendo uma distribuição limitada, ocorrendo em regiões da África e em algumas ilhas do Pacífico (COLLINS e JEFFERY, 2005). Os casos de *P. knowlesi* infectando humanos foram relatados apenas recentemente (COX-SINGH *et al.*, 2008; ONG *et al.*, 2009; WHITE, 2008), *P. falciparum* e *P. vivax* causam a maioria de casos de malária em todo mundo, sendo o *P. falciparum* é responsável pelas formas mais graves da doença e está associado a um alto índice de mortalidade. *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo, sendo comum em áreas tropicais e subtropicais fora do continente africano (GREENWOOD *et al.* 2005; MENDIS *et al.* 2001). Apesar da grande incidência do *P. vivax*, pouco investimento em pesquisas de vacinas e novas drogas têm sido observados para este parasito. Isso se deve, principalmente, a menor mortalidade associada à infecção causada por *P. vivax* e à ausência de um sistema eficiente de cultivo contínuo desse parasito (UDOMSANGPETCH *et al.* 2008).

A malária é uma das mais importantes doenças infecciosas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, ocorrendo em mais de 104 países e territórios (WHO, 2013) (Figura 1). *Plasmodium vivax* é mais comum na América central e Ásia, já *P. falciparum* é predominante na África, Nova Guiné (parte da Indonésia e Papua Nova Guiné) e Haiti. A malária aumentou nos países tropicais na

década de 1970 até a década de 1990 principalmente por causa do aumento da resistência do parasito aos antimaláricos e da resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas (SHANKS, *et al.*, 2013). A estimativa atual é de que 207 milhões de pessoas foram acometidas em 2012 pela doença, nos quais 80% desses casos ocorreram no continente africano e os demais estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, sudeste asiático e ilhas da Oceania (WHO, 2013). Aproximadamente 600 mil mortes por malária são registradas por ano, a grande maioria, de crianças menores de 5 anos na África Sub-Saariana (WHO, 2011).

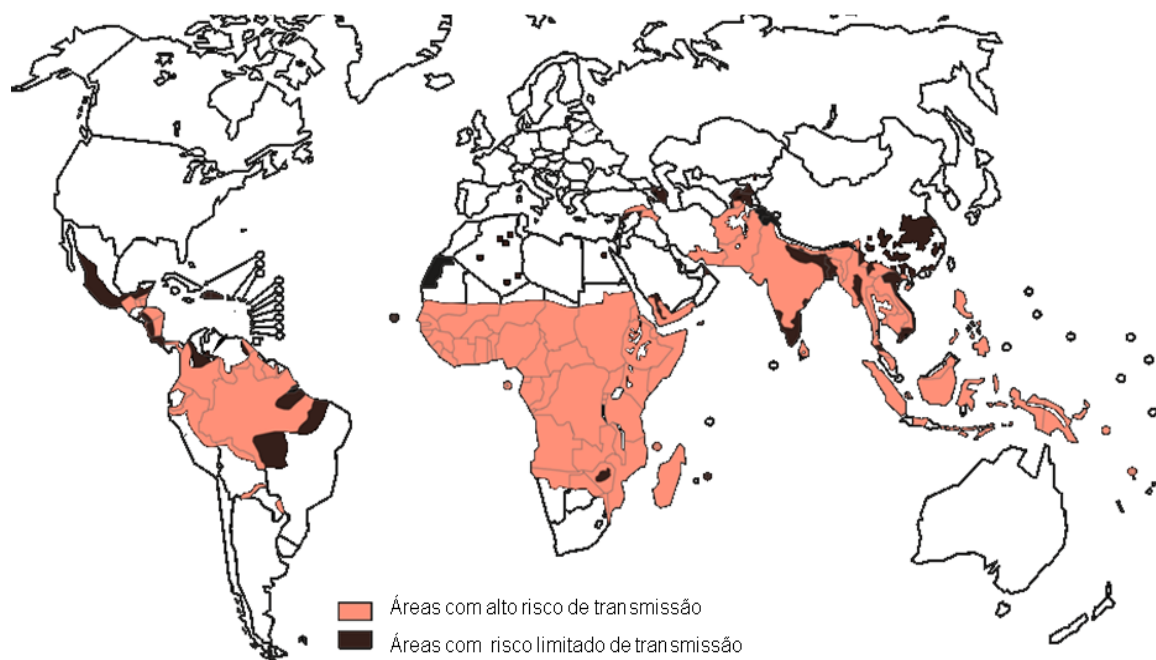


Figura 1. Distribuição mundial da malária. Fonte: Modificado de WHO, 2011

No Brasil, a principal região onde ocorre a transmissão da malária é a Amazônia Legal, correspondendo a 99,8% das ocorrências da doença no país, cujo número de casos em 2012 foi de 240 mil (SVS, 2013) (Figura 2).

Na Amazônia legal, as condições ambientais e socioeconômicas contribuem para a transmissão da malária. Sendo importante considerar que a ocupação intensa e desordenada das áreas peri-urbanas, o desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos não oficiais contribuem para o agravamento e manutenção da transmissão de malária nessa região (MARQUES *et*

al., 1986; SVS, 2007; SVS, 2008). Dessa forma, nesta região a malária ainda é um grave problema de saúde e a grande incidência desta doença deve-se a múltiplos fatores, entre eles, biológicos, ecológicos, geográficos e sociais (SVS, 2009).

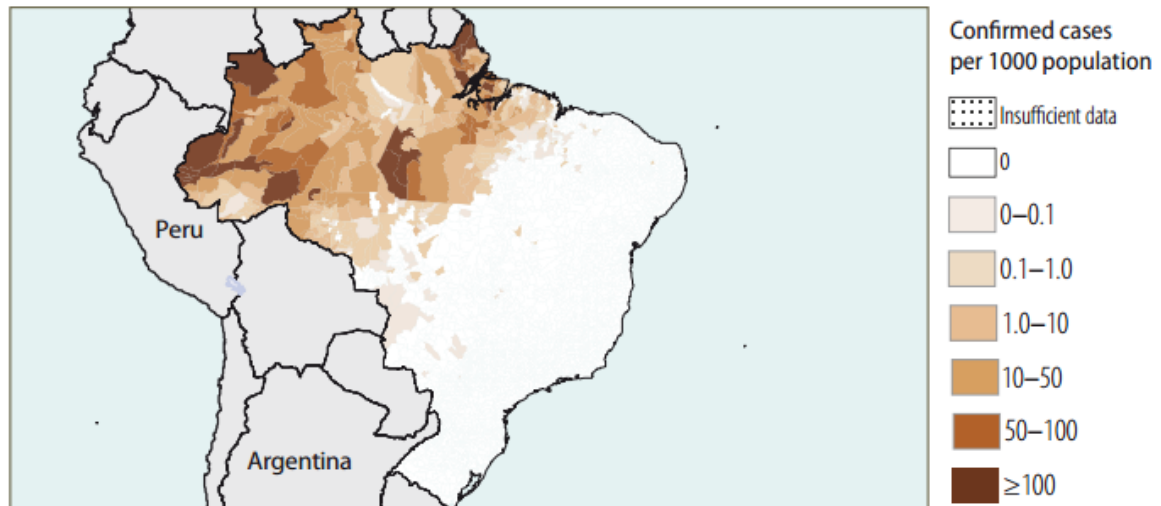


Figura 2. Distribuição geográfica da malária no Brasil (WHO 2013).

O diagnóstico de malária é um dos pilares do Programa de Prevenção e Controle da doença no país e no mundo. Até muito recentemente os epidemiologistas tinham poucas ferramentas para, além do microscópio, os ajudar no estudo e na compreensão da complexa epidemiologia da infecção malárica. Um bom diagnóstico propicia a identificação precoce dos casos de malária e permite a caracterização da espécie, o que é importante para a definição do esquema terapêutico (SVS, 2003; WHO, 2009a). Os exames parasitológicos permitem evidenciar os parasitos ou as hemácias parasitadas. Métodos indiretos também são usados e estão ligados à imunologia (detecção de antígenos plasmodial ou de anticorpos) ou à biologia molecular (sondas genômicas) (MOODY, 2002; HÄNSCHEID, 2003; MOUCHET *et al.*, 2004). Entre os exames parasitológicos destacamos a gota espessa e o esfregaço – estes dois métodos são complementares (WHO, 1999a; MOUCHET *et al.*, 2004). O esfregaço permite a identificação isolada de cada espécie (WHO, 1999a; MOODY & CHIODINI, 2000; HÄNSCHEID, 2003). A gota espessa é o melhor método para a detecção da parasitemia. A microscopia convencional permite a identificação das espécies de *Plasmodium* presentes na infecção e uma estimativa da densidade parasitária.

O advento da biologia e da genética molecular trouxeram consigo algumas perspectivas com implicações no diagnóstico e terapêutica. A técnica de PCR (SNOUNOU *et al.*, 1993; MOODY & CHIODINI, 2000; ZAMAN *et al.*, 2001) permite, quando utilizada em grandes amostras, a identificação das variações do parasita da malária e a detecção de populações parasitárias mistas, sobretudo quando existentes em níveis muito baixos (SNOUNOU *et al.*, 1993; ZAMAN *et al.*, 2001; MOODY, 2002; GREENWOOD, 2002; HÄNSCHEID, 2003). As técnicas de PCR são bastante sensíveis, permitem o reconhecimento de parasitemias muito baixas e são capazes de detectar menos de um parasita/microlitro (<1 parasita/ μ l) (SNOUNOU *et al.*, 1993; ZAMAN *et al.*, 2001; GREENWOOD, 2002; MOODY, 2002); isto contrasta com uma boa microscopia que detecta por volta de 10-50 parasitas por microlitro (MOODY, 2002; GREENWOOD, 2002). Os custos e a complexidade das técnicas ligadas à imunologia ou à biologia molecular não permitem a sua utilização de rotina sobretudo na África, mantendo-se a expectativa do baixo custo e aperfeiçoamento dos testes rápidos de diagnóstico (*Rapid Diagnostic Test - RDT*) (WHO, 1999a; MOODY, 2002; MOUCHET *et al.*, 2004). Os RDTs são comercialmente disponíveis em kits, que incluem os reagentes necessários e não requerem treinamento intenso ou equipamentos para realizá-los e interpretá-los. O princípio deste método é baseado em uma imunocromatografia em membrana de nitrocelulose, onde a captura de antígenos circulantes do parasita é realizada por meio de anticorpos monoclonais, sendo a presença do antígeno indicada por uma mudança de coloração na fita de nitrocelulose (MOODY & CHIODINI, 2002).

O tratamento adequado tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, a morte por malária, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (SVS, 2001). O tratamento de pacientes infectados com *P. vivax* com primaquina recomendado pela OMS dura 14 dias, por causa de sua baixa meia-vida, na dose de 0,25 mg/kg associada a uma droga esquizotóxica e gametocitocida no caso, a Cloroquina, por três dias em uma dose total de 25 mg de base/kg. Entretanto, no Brasil, para facilitar a adesão do paciente ao tratamento é recomendado o uso da primaquina por apenas 7 dias com uma dose de 0,5 mg/kg. Uma falha do tratamento (recrudescência) é caracterizada pelo aparecimento de parasitemia até o dia 28 após o início do tratamento (SVS, 2001).

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium spp.*

O ciclo biológico do *Plasmodium* é constituído por: (1) uma fase sexual exógena (esporogônica), que ocorre no hospedeiro invertebrado e (2) uma fase assexuada endógena (esquizogônica), onde ocorre a multiplicação no hospedeiro vertebrado em células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exoeritrocítica) ou repetidas multiplicações nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica) (ÁVILA, 1996; SINNIS; COPPI, 2007) (Figura 3). Essa dinâmica do ciclo demonstra sua grande complexidade que está relacionada à habilidade do parasito em alterar suas características para desenvolverem-se nos ambientes intra e extracelulares, tanto do hospedeiro vertebrado quanto do mosquito vetor.

Após repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* transferem dezenas de esporozoítos acumulados nas glândulas salivares para a derme do hospedeiro vertebrado (MOTA; RODRIGUEZ, 2001). Estes podem permanecer na derme por um longo período de tempo (YAMAUCHI *et al.*, 2007). Ao vencerem a barreira epitelial, cerca de 30% dos esporozoítos invadem os vasos linfáticos. No entanto, estas formas provavelmente não serão capazes de avançar no ciclo, parando sua jornada no nódulo linfático mais próximo ao sítio da inoculação (AMINO *et al.*, 2006). Os restantes destas formas móveis do parasito invadem os vasos sanguíneos e através da corrente sanguínea, chegam aos capilares sinusóides do fígado (AMINO *et al.*, 2006). A invasão do hepatócito pelo esporozoíto é complexa e envolve várias interações entre o parasito e a célula hospedeira. Em resumo, o parasito possui a capacidade de interagir com as células do fígado e migrar através dos hepatócitos antes da invasão do hepatócito final (MOTA *et al.*, 2001; CHEN; WANG, 2008), iniciando o ciclo exoeritrocítico (MEIS; VERHAVE, 1988). A passagem transversal por vários hepatócitos parece ser um processo obrigatório para tornar os esporozoítos capazes de estabelecer a infecção em um hepatócito-alvo, culminando com a formação de um vacúolo dentro do qual os parasitos irão se replicar e desenvolver. (MOTA; HAFALLA; RODRIGUEZ, 2002). Algumas espécies como, o *P. vivax* e o *P. ovale* podem se desenvolver em formas dormentes do parasito no fígado, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis

pelas recaídas que ocorrem meses ou anos após a infecção inicial (KROTOSKI, 1985; (BARNWELL & GALINSKI, 1998).

Dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes multinucleados, que podem produzir de 10 mil ou até mais de 30 mil merozoítos, as formas invasivas de eritrócitos. E para garantir a segurança da chegada dos merozoítos na corrente sanguínea, estes ficam protegidos dentro de vesículas denominadas merossomos, capazes de transportar centenas de merozoítos para a corrente sanguínea e de protegê-los do sistema imune (STURM *et al.*, 2006). Além disso, este parasito também é capaz de induzir a expressão de marcadores de células viáveis nas células infectadas e nos merossomos, de modo a adiar a morte celular.

Após a liberação destas formas sanguíneas ocorre o encontro e aderência do parasito ao eritrócito via receptores na membrana destas células, em seguida os parasitos sofrem reorientação apical e ocorre a formação da junção irreversível entre as membranas (DVORAK *et al.*, 1975; AIKAWA *et al.*, 1978; MILLER *et al.*, 1976). Os parasitos então induzem a formação de um vacúolo derivado da membrana celular do eritrócito (vacúolo parasitóforo) dentro do qual o parasito se desenvolve. Inicia-se então a fase eritrocítica do ciclo, no qual os merozoítos se desenvolvem e se multiplicam, produzindo merozoítos capazes de invadir novas hemácias (MEIS; VERHAVE, 1988; AMINO *et al.*, 2006, VLACHOU *et al.* 2006). A ruptura dos eritrócitos está associada ao aparecimento dos sintomas característicos da doença, como febre e calafrios.

Uma pequena proporção destes parasitos se diferencia nas formas sexuais do parasito, os macrogametócitos (femininos) e os microgametócitos (masculinos) (VLACHOU *et al.* 2004; ALANO, 2007). Estas formas sexuais ao serem ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dão início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado.

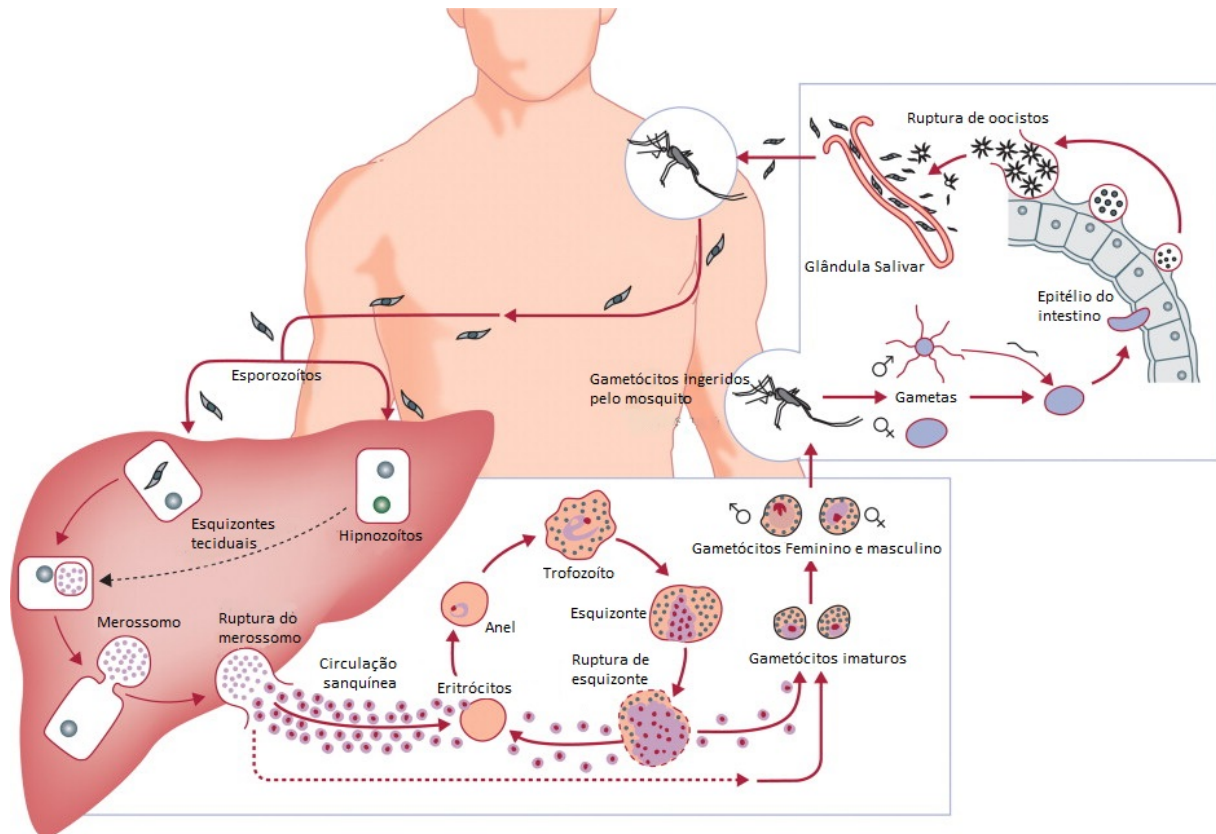


Figura 3. Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. No hospedeiro humano, a infecção pelo *Plasmodium* inicia-se com a picada de fêmeas de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*. Os esporozoítos invadem os vasos sanguíneos e através da corrente sanguínea chegam ao fígado. Dentro do hepatócito, o esporozoítos diferencia-se em esquizonte multinucleado, o qual gera vários merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, e dentro do eritrócito, o merozoítos inicia a fase eritrocítica do ciclo sofrendo esquizogonia dentro da célula e produzindo novos merozoítos, capazes de invadir novas hemácias. Uma pequena proporção dos parasitos assexuados transforma-se em gametócitos, e durante o repasto sanguíneo serão ingeridas pelo mosquito, onde ocorrerá a fecundação, dando origem ao zigoto. Estes sofrem esquizogonia resultando em centenas de células infectantes, os esporozoítos, que migra para as glândulas salivares do inseto, as quais poderão, no momento da picada, ser inoculados no hospedeiro vertebrado. Fonte: Modificado de Mueller *et al.*, 2009

No mosquito vetor, após a fertilização dos gametócitos, o zigoto se transforma em oocineto, que ao atravessar a parede do intestino, transforma-se em oocistos no espaço basal subepitelial. Em cada oocisto é ativada a maquinaria de replicação de DNA e de síntese de proteínas para a multiplicação assexuada dos parasitos, o que gera a produção de milhares de esporozoítos. Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto se rompe liberando os esporozoítos, que por sua vez invadem a

hemolinfa do inseto. Estes então poderão infectar um novo hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo do vetor, fechando assim o ciclo de vida do parasito (VLACHOU *et al.* 2004). Esta fase sexuada do ciclo possui uma grande importância evolutiva para o parasito, pois é neste momento em que ocorrem recombinações meióticas, podendo haver geração de isolados com diferentes perfis haplotípicos, o que pode ter reflexo no fenótipo do parasito (Figura 3).

1.3 Infecções causadas por *P. vivax*

Plasmodium vivax constitui a espécie mais amplamente distribuída geograficamente e é um dos mais importantes desafios para a Saúde Pública nas Américas do Sul e Central, Ásia Central, Sul e Sudeste Asiáticos, (MEDIS *et al.* 2001; LACERDA *et al.* 2012). No mundo cerca de 70-80 milhões de casos clínicos são relatados anualmente (MUELLER *et al.* 2009; GUERRA *et al.*, 2010). O controle deste parasito é potencialmente mais difícil do que o das outras espécies, o que pode ser explicado em parte por quatro principais características biológicas do *P. vivax*. A primeira é o aparecimento precoce de gametócitos no sangue do hospedeiro vertebrado (três dias após a infecção em *P. vivax*, enquanto em *P. falciparum* são de 8 a 10 dias), o que torna possível a transmissão antes mesmo dos sintomas aparecerem (SINNIS & SIM, 1997; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). A segunda é a alta frequência de indivíduos com baixas parasitemias e de infecções assintomáticas em área endêmicas favorecendo o grande número de reservatórios da infecção (COLEMAN *et al.*, 2002). A terceira é a capacidade de manter formas latentes no fígado, os hipnozoítos, que permanecem dormentes por intervalos variáveis de tempo e podem levar a episódios de recaída da doença, culminando no reaparecimento dos sintomas (MUELLER *et al.*, 2009). O amplo entendimento da diversidade genética das cepas e isolados de *P. vivax* em cada área endêmica é essencial para a implementação de estratégias eficazes de controle da malária (ARNOTT *et al.* 2012). Isso por que, a compreensão da variabilidade genética da malária vivax é essencial para identificar fenótipos de interesse, tais como, novas variantes antigênicas, resistência às drogas ou aumento da virulência, e prever sua origem e distribuição na população (GREENHOUSE *et al.*, 2007).

As infecções por *P. vivax* são frequentemente caracterizadas pela presença de dois ou mais parasitos geneticamente distintos no mesmo indivíduo, caracterizando uma infecção múltipla. Esta alta frequência pode ser explicada pela característica deste parasito de apresentar recaídas durante uma infecção. Dessa forma, a partir da ativação de hipnozoítos no fígado pode-se detectar isolados geneticamente distintos na corrente sanguínea. As taxas de infecção múltipla variam entre as regiões do mundo estudadas. Para *P. falciparum*, sabe-se que em regiões de intensa transmissão as infecções múltiplas são comuns (JOSHI *et al.* 2008). Para *P. vivax* não existe uma correlação direta entre multiplicidade de infecção e endemicidade da doença, uma vez que áreas de baixa endemicidade apresentam altas taxas de infecção múltipla (FERREIRA *et al.* 2007; REZENDE 2010; GUNAWARDENA *et al.*, 2010; VAN DEN EEDE *et al.*, 2010). Em geral, para os parasitos da malária esse tipo de infecção é comum por dois motivos: (1) podem existir muitos vetores picando um mesmo hospedeiro (VARDO & SCHALL, 2007); ou (2) esporozoítos geneticamente distintos podem ser inoculados pelo inseto-vetor no momento do repasto sanguíneo (ANDERSON *et al.*, 2000). No Brasil, taxas variando entre 11-72% foram identificadas em indivíduos infectados por *P. vivax* utilizando diferentes microssatélites polimórficos (FERREIRA *et al.* 2007; REZENDE 2010).

A diversidade clonal das infecções por *P. vivax* fornecem conhecimentos sobre a estrutura da população e da dinâmica de transmissão levando a um melhor conhecimento sobre a ecologia destes diversos parasitos (VARDO & SCHALL, 2007). Sugere-se que, quando dois ou mais isolados geneticamente distintos estão presentes no mesmo hospedeiro, a competição intra-hospedeiro por recursos limitados pode selecionar as características do parasito que representam grandes desafios para a saúde pública, como o aumento de virulência, o aumento da transmissibilidade e resistência aos antimaláricos (HAVRYLIUK, FERREIRA, 2009). Experimentos de manipulação utilizando um modelo de malária de roedores co-infectados com diferentes cepas de laboratório de *Plasmodium chabaudi* encontraram que a diversidade genética resultou na competição entre clones, mudança na dinâmica de infecção e aumento de virulência (TAYLOR *et al.* 1998; MACKINNON *et al.* 2002). Similarmente, experimentos realizados por de Roode e colaboradores (2005) mostraram que a competição entre diferentes cepas de *P.*

chabaudi favorece a cepa de maior virulência. Além disso, uma maior produção de gametócitos foi observada durante a infecção, o que potencialmente aumentou a transmissibilidade aos mosquitos (DE ROODE *et al.* 2005).

Assim, esse modelo usando roedores permitiu a caracterização de clones do parasito dentro do hospedeiro vertebrado, mostrando os diversos fenótipos que podem ser gerados durante uma infecção contendo múltiplos isolados em comparação com infecções geneticamente simples (TAYLOR *et al.* 1998; READ e TAYLOR, 2001; DE ROODE *et al.* 2005).

Vários estudos têm demonstrado que a caracterização da infecção por *Plasmodium* depende tanto da acurácia do método de genotipagem, quanto do tipo de marcador molecular e número de *loci* analisados (GREENHOUSE *et al.* 2006; HAVRYLIUK *et al.* 2008). Marcadores moleculares confiáveis são essenciais para uma melhor compreensão da epidemiologia molecular de *P. vivax*. A eficácia de um marcador genético em termos da sua capacidade para caracterizar a diversidade genética existente em uma população é de grande importância. Existe uma necessidade para desenvolvimento de marcadores moleculares que sejam mais adequados para a determinação das infecções múltiplas. Contudo, é desconhecido o número mínimo e quais os melhores marcadores para identificação de todas as infecções múltiplas em uma população. Em um estudo com isolados de *P. vivax* no Brasil, Havryliuk e Ferreira (2009) evidenciaram que utilizando um número mínimo de onze microssatélites foram identificadas cem por cento das infecções múltiplas. Nesse estudo é sugerido que um número limitado de marcadores deva ser suficiente para a identificação de diferentes isolados em uma infecção pelo *P. vivax* (HAVRYLIUK; FERREIRA, 2009). Em outro estudo este número foi reduzido para quatro microssatélites (DE ARAUJO *et al.*, 2012).

1.4 Marcadores moleculares de *P. vivax*

Nas análises sobre evolução molecular, variabilidade genética e estrutura das populações de *P. vivax* tem sido utilizados vários marcadores moleculares, tais como

os microssatélites, os *tandem repeats* - TRs e os polimorfismos de base única (SNPs) em genes ortólogos previamente identificados em *P. falciparum*, como na Proteína de Superfície do Merozoito (MSP) e na Proteína de Superfície do Circunsporozoito (CSP) (FENG *et al.*, 2003). Em geral, os antígenos de superfície estão sob forte pressão seletiva positiva do sistema imune do hospedeiro, sendo dessa forma considerados marcadores não neutros e, por isso, não ideais para estudos evolutivos. Os marcadores mais comumente utilizados em estudos de genética de população são os neutros ou quase neutros que estão distribuídos preferencialmente nas regiões não codificadoras e apresentam alto grau de polimorfismos (SHLOTTER, 2004).

1.4.1 Microssatélites

Microssatélites (MS) são amplamente utilizados para estudar a diversidade genética dos parasitos da malária, devido a sua abundância, alta taxa de mutação e provável evolução neutra. Os MS consistem em repetições curtas em série que variam de 1 a 6 nucleotídeos, altamente polimórficos e presentes em regiões codificadoras e não codificadoras do DNA. A diversidade dos microssatélites é gerada através de um processo denominado “*slippage*” da DNA polimerase ou derrapagem das fitas que gera perda e ganho de repetições, sendo que os diferentes alelos correspondem aos diferentes números de repetições (Figura 4). Estas variações genéticas ocorrem primariamente através de um processo onde as fitas complementares de DNA se pareiam de modo errado ocorrendo um subsequente erro durante a replicação (LEVINSON & GUTMAN, 1987). Pelo fato de que estes marcadores normalmente apresentam uma evolução neutra, estas adições ou deleções de unidades repetitivas não são selecionadas, proporcionando alta variabilidade entre os alelos. Estas sequências de microssatélites são classificadas como: perfeitas, quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo; imperfeitas, quando existem bases diferentes intercaladas na sequência que se repete; compostos, quando uma repetição perfeita ou imperfeita está associada à outra repetição com motivo diferente (WEBER *et al.*, 1990).

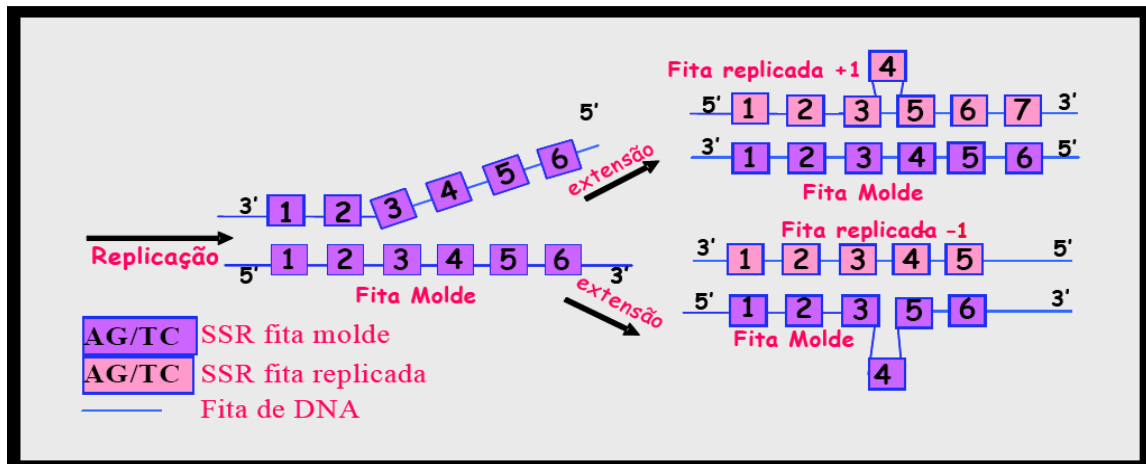


Figura 4. Exemplo de um processo de mutação “slippage” para um locus de microssatélite. A linha azul representa a fita dupla de DNA. Os blocos representam as repetições nucleotídicas do microssatélite e as setas indicam a direção da replicação da fita molde do DNA. Em um processo normal de replicação pode ocorrer a derrapagem da DNA polimerase para trás, o que leva ao surgimento de inserções (parte superior da figura) ou a derrapagem da DNA polimerase para frente, o que origina deleções (parte inferior). Fonte: Adaptado Eisen, J. (1999)

1.4.2 Tandem repeats – TRs

Os *tandem repeats* (TRs) consistem em unidades de repetição de cinco nucleotídeos ou mais que se repetem espaçadamente entre outras sequências no genoma e estas repetições estão presentes em alta frequência no genoma de *P. vivax* (FENG *et al.*, 2003). Até o presente momento, foram pouco utilizados para estudos populacionais em *P. vivax*. Descritos em *P. vivax* primeiramente por Feng e colaboradores (2003), no qual eles encontraram algumas destas repetições em cinco isolados de campo. Dando continuidade aos estudos destes marcadores em 2004, Leclerc e colaboradores selecionaram oito destes TRs, para análise populacional de noventa e duas amostras de *P. vivax* provenientes de cinco diferentes regiões do mundo. Cada região apresentou uma variabilidade de 2 a 10 alelos. Mais recentemente, Rezende e colaboradores (2009) utilizaram os cinco mais polimórficos destes marcadores para caracterização genética de amostras de quatro regiões da Amazônia brasileira, apresentando uma variabilidade de 2 a 9 alelos por *locus*.

1.4.3 Polimorfismos em antígenos

A maioria dos marcadores disponíveis para caracterização das populações de *P. vivax* estão focados nos estudos de moléculas que estão sob pressão seletiva pelo sistema imune, particularmente polimorfismos de base única em antígenos ortólogos de *P. falciparum*, como as MSPs.

A família das proteínas de superfície do merozoíto de *P. vivax* é constituída de dez proteínas: MSP-1, MSP-3 α , MSP-3 β , MSP-3 γ , MSP-4, MSP-5, MSP-6, MSP-7, MSP-8 e MSP-9 que estão envolvidas na interação inicial entre os parasitos e as células vermelhas do sangue (ESPINOSA *et al.*, 2003; CARLTON *et al.* 2008). Os genes codificadores da MSP-1 e MSP-3 α são altamente polimórficos e são usados para genotipagem de isolados de campo de *P. vivax* (DEL PORTILO *et al.*, 1991). As outras mostram variabilidade limitada, como MSP-4, MSP-7 e MSP-10 (BRITO; FERREIRA, 2011).

A proteína 1 de superfície do merozoíto está presente na superfície dos merozoítos de todas as espécies de *Plasmodium* (PIZARRO *et al.*, 2003). A estrutura primária da MSP-1 de *P. vivax* (PvMSP-1) exhibe regiões conservadas, semiconservadas e regiões polimórficas (CUI *et al.*, 2003). Esta proteína possui seis domínios altamente polimórficos flanqueados por sete domínios conservados (Figura 5). Em estudos de polimorfismos genéticos em isolados de *P. vivax* foi demonstrado que os domínios 1, 3 e 5, ao nível protéico, são conservados com poucas substituições, enquanto os domínios 2, 4, 6 e 10 são altamente variáveis (KOLAKOVICH *et al.* 1996, FIGTREE *et al.* 2000, HOFFMANN *et al.* 2003, FAROOQ *et al.* 2009, KIM *et al.* 2009, VERON *et al.* 2009, ZAKERI *et al.* 2010; BRITO; FERREIRA, 2011). Essa alta diversidade pode ser resultado de recombinações intragênicas nas regiões polimórficas entre os tipos de alelos dimórficos ou por seleção positiva do sistema imune (BRITO; FERREIRA, 2011).



Figura 5. Representação esquemática da Proteína 1 de Superfície do Merozoite de *P. vivax* (PvMSP-1): As regiões em cinza claro correspondem aos sete domínios conservados da sequência; e as regiões em preto correspondem aos seis domínios variáveis. Fonte: Brito; Ferreira (2011)

O gene que codifica a proteína MSP-3 α é altamente polimórfico, apresentando regiões de inserção e deleção entre os diferentes isolados de *P. vivax*. O gene codifica uma proteína que contém um domínio central rico em alanina que é predito formar uma estrutura terciária em espiral enrolada (GALINSKI *et al.* 1999) (Figura 6). A natureza polimórfica da MSP-3 α a torna um bom marcador para distinguir diferentes infecções em estudos epidemiológicos, como demonstrado em estudos realizados na Papua Nova Guiné, Tailândia e em alguns países da América Latina (BRUCE *et al.*, 1999; RAYNER *et al.*, 2002; CRISTIANO *et al.*, 2008). Contudo, no Brasil, a escassez de estudos que utilizam este marcador em estudos epidemiológicos dificulta uma avaliação da sua adequação como marcador genético para estudos populacionais (Ribeiro *et al.*, 2011).



Figura 6. Representação esquemática da Proteína 3 de Superfície do Merozoite de *P. vivax* (PvMSP-3 α): As regiões em cinza escuro correspondem a regiões semi-conservadas (SC) que flaqueiam uma região central polimórfica, rica em alanina (região em branco); as regiões em cinza claro correspondem a regiões conservadas (CR). Fonte: Brito; Ferreira (2011)

2 JUSTIFICATIVA

A malária causada por *P. vivax* atinge milhões de pessoas no mundo, resultando em importantes perdas sociais e econômicas. No Brasil, essa é a espécie mais prevalente, tendo sido responsável por cerca de 240 mil casos da doença em 2013 (SVS 2013). A infecção por *P. vivax* é frequentemente caracterizada pela presença de parasitos geneticamente distintos em um mesmo hospedeiro. Uma vez que esses parasitos podem competir por recursos limitados dentro do hospedeiro, há a possibilidade de evolução de fenótipos distintos quanto a virulência, transmissibilidade e resistência a drogas que serão responsáveis por determinar o curso da infecção (HAVRYLIUK; FERREIRA, 2009). Além disso, a identificação e caracterização genética dos isolados de *P. vivax* circulando nas populações são importantes para a definição das medidas de controle e tratamento a serem adotadas. Em adição, a identificação das infecções múltiplas tem claras implicações nas análises filogenéticas e de genética de população, como estimativa do desequilíbrio de ligação e taxa de recombinação. Para essas análises é fundamental a correta determinação dos haplótipos (combinação única dos alelos presentes nos loci analisados) presentes na infecção por *Plasmodium*. Por fim, com o desenvolvimento de técnicas de genotipagem, tornou-se cada vez mais importante a definição de um número mínimo de marcadores moleculares para determinação das infecções múltiplas a fim de evitar custos desnecessários. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes marcadores moleculares na identificação de parasitos geneticamente distintos em uma infecção múltipla pelo *P. vivax*. No nosso entendimento, esse foi o primeiro estudo com essa abordagem, comparando vários marcadores potencialmente neutros e não neutros do genoma de *P. vivax* e considerando proporções distintas e bem definidas entre as variantes desse parasito presente em cada indivíduo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de diferentes marcadores moleculares (blocos 2 e 10 de MSP-1, MSP-3 α , microssatélites e *Tandem repeats*) na identificação de parasitos geneticamente distintos em uma infecção por *P. vivax* num mesmo indivíduo.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer infecções múltiplas artificiais por meio de clonagem de duas variantes referentes a cada um dos *loci* de *P. vivax* selecionados.
- Estabelecer infecções múltiplas artificiais utilizando DNAs de pacientes infectados
- Genotipar os *loci* selecionados nas diferentes misturas artificiais através de eletroforese capilar.
- Determinar a eficiência de detecção de diferentes alelos nos *loci* de *P. vivax* nas infecções múltiplas artificiais.
- Determinar a eficiência de detecção de diferentes alelos nos *loci* de *P. vivax* em isolados de campo de *P. vivax*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Áreas de Coleta das Amostras de Sangue

As amostras foram provenientes de cinco diferentes regiões da Amazônia Brasileira: 17 amostras de Cuiabá (MT), 5 amostras de Macapá (AP), 13 amostras de Porto Velho (RO), 7 amostras de Augusto Corrêa (PA) e 5 amostras de Manaus (AM). As amostras foram coletadas nas diferentes regiões em: AM, maio de 2003; AP, Novembro de 2004; PA, Outubro de 2005; RO, outubro a dezembro de 2004; e MT, de Julho de 2003 a julho de 2004.

4.2 Amostras de Sangue

Após o consentimento por escrito dos voluntários selecionados para o estudo, foram coletados cerca de 5 mL de sangue por punção venosa na presença de (EDTA) utilizando o sistema *Vacurette (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Áustria)*. Os seguintes critérios foram considerados para inclusão no estudo: (1) infecção por *P. vivax*; (2) ausência de sinais ou sintomas relacionados à malária grave; (3) idade igual ou superior a 15 anos; e, para o sexo feminino, (4) ausência de gravidez. A identificação da infecção por *P. vivax* foi feita por exame microscópico de gota espessa de sangue corada pelo Giemsa por técnicos treinados das Unidades de Saúde das cidades de coleta. A figura 7 ilustra o diagrama esquemático da abordagem metodológica seguida nesse estudo.

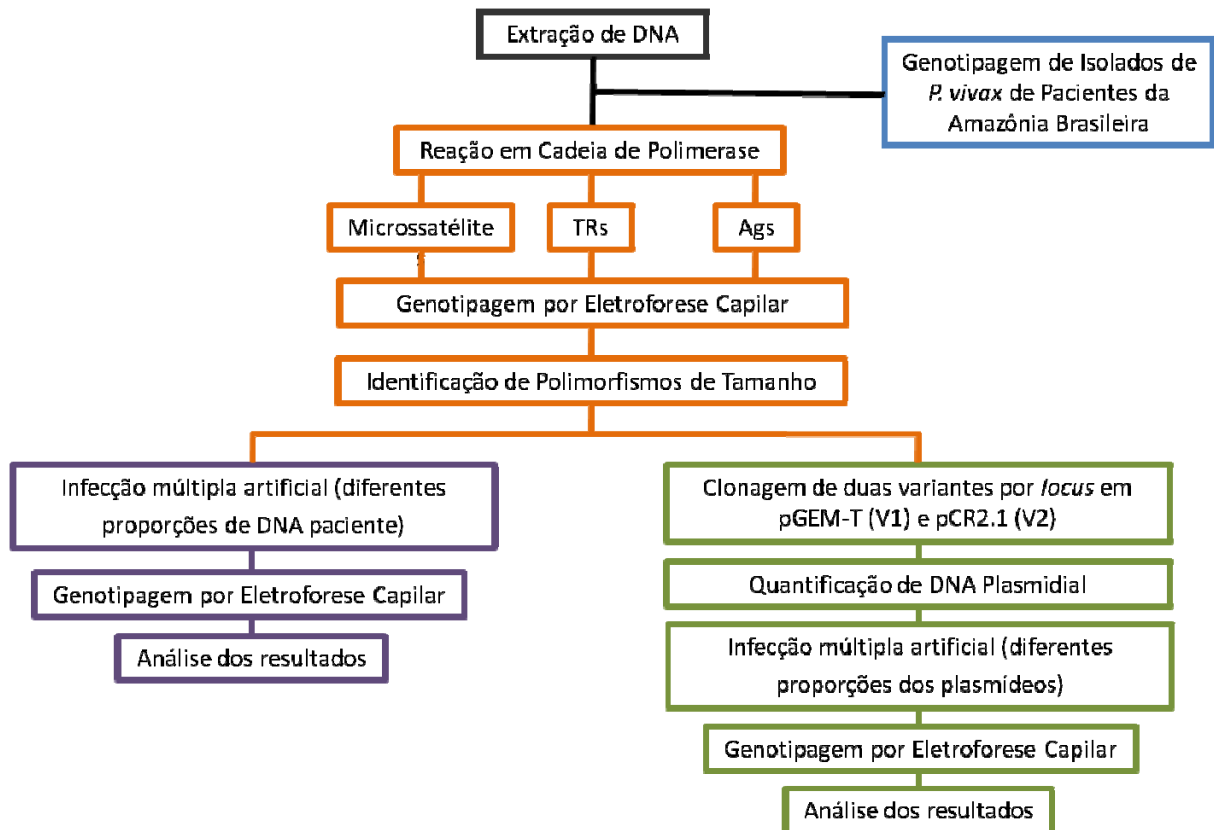


Figura 7. Diagrama esquemático da abordagem metodológica seguida no presente estudo.

O projeto foi realizado em quatro etapas, representadas por cores distintas na figura. Na primeira etapa, representada pela cor laranja, foram selecionadas duas amostras diferentes de DNA de *P. vivax* para cada um dos *loci* indicados na figura a partir da genotipagem por eletroforese capilar. Na segunda etapa (em roxo), amostras clínicas com diferentes tamanhos de fragmentos foram misturadas em diferentes proporções. Na terceira etapa (em verde), estas sequências de DNA foram clonadas em vetores, quantificadas e misturadas em diferentes proporções seguida da genotipagem por eletroforese capilar para determinar a eficiência destes marcadores na detecção de infecções múltiplas. Na quarta etapa (em azul), amostras clínicas de *P. vivax* foram genotipadas.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (Protocolo Nº 20/2009).

4.3 Amplificação dos Marcadores Moleculares

As ampliações pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos microssatélites e dos *Tandem repeats* foram padronizadas usando o termociclador

Eppendorf Gradient (Eppendorf). Ao passo que as amplificações por PCR dos genes que codificam Proteínas de Superfície do Merozoita foram padronizadas usando o termociclador PTC-100™ Version 7.0. (MJ Research).

Para os blocos 2 e 10 da MSP-1 e para a MSP-3 α foram utilizados as mesmas condições de amplificação e iniciadores descritos por Koepfli e colaboradores (2009), com exceção dos iniciadores internos para o do domínio 2 da MSP-1 e MSP3 α que foram desenhados para este estudo. A reação de amplificação foi feita em duas etapas (*semi-nested* PCR), sendo que somente o iniciador senso da segunda reação foi marcado com fluoresceína para a genotipagem dos produtos amplificados por eletroforese capilar.

Na amplificação dos *loci* para clonagem em plasmídeo foram utilizados iniciadores não marcados.

As temperaturas de anelamento dos iniciadores e a concentração de cloreto de magnésio variaram de 56°C a 63°C e de 1,0 mM a 3,0 mM, respectivamente (Tabela 1).

Todas as reações de amplificação tiveram um volume final de 20 μ L, compreendendo: 20 pmoles de cada iniciador (senso e antisenso), 0,125 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 μ L tampão da Taq DNA polimerase 10X, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA), cloreto de magnésio conforme Tabela 1 e 50-100 ng de DNA. Para os domínios 2 e 10 da MSP-1 e para a MSP-3 α as segundas reações das *semi-nested* PCR, os DNA amplificados da primeira reação foram diluídos 1000 vezes.

Os ciclos para as reações de amplificação foram padronizados do seguinte modo: 94°C por 2 minutos, 35 ou 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores entre 56°C a 63°C (ver Tabela 1) por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. Após estes ciclos um passo de extensão final foi realizado a 72°C por 2 minutos.

Após a reação de amplificação, as amostras de DNAs foram visualizadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio com concentração final de 0,5 μ g/mL. Assim, foi possível identificar as diferentes variantes de cada *locus* amplificado. Dessa forma, para cada *locus* foram selecionadas duas variantes para realização das clonagens.

Tabela 1 – Iniciadores e condições da PCR utilizados na amplificação dos marcadores moleculares de *P. vivax*.

Locus	Iniciador Senso (5' → 3')	Iniciador Anti-senso (5' → 3')	Nº de Ciclos de amplificação	Tm	[Mg⁺²]
PvMS06	ACACATTTGACACAGTTCC	ATGCCCTGGTCCCTACAA	35	58,6°C	1,5 mM
PvMS07	GTATTCCCCGTCTTGTC	CTTTCTCCGTTCTTATTTCT	35	56°C	1,5 mM
PvMN21	TGCCACGATGAAAGGCCCTT	TTTGAGGTGGCACTGCTATA	35	60°C	1 mM
PvMSP-1 Bloco 2	Externo TATGATTTGTTGAGGGCGAAGC	Externo TGCTTTCCATCATCTGGATTTTGC	30	63°C	3 mM
	Interno GACGATATTGGAAAATTGGA	Interno CTCCTTCAGCACTTTCACGCGCTT	25		
PvMSP-1 Bloco 10	Externo GGAGAACATAAGCTACCTGTCC	Externo GTTGTTACTTGGTCTTCCTCCC	30	60°C	3 mM
	Interno CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCAA	Interno ATTACTTTGTCGTAGTCCTCGGCGTAGTCC	25		
PvMSP-3α	Externo GAAAGAACGACTCCCTCCC	Externo CTTTTGCCTTCGCCACTTCG	30	60°C	3 mM
	Interno CCCGCATGAGGAGCCAAACAATT	Interno CCTTTGCATTTTTTGGCCGAG	25		

4.4 Clonagem de Fragmento de DNA em Plasmídeo e Extração de DNA plasmidial

As clonagens dos produtos da PCR representando duas variantes de cada *locus* foram feitas em pCR2.1-TOPO e pGEM-T e foram realizadas utilizando os sistemas *TOPO TA Cloning KIT for Sequencing* (Invitrogen, California, USA) e *pGEM-T Vector* (Promega, Madison, USA), respectivamente, conforme instruções dos fabricantes. Em resumo, *Escherichia coli* da linhagem TOP 10 quimicamente competentes (Nishimura *et al.* 1993) foram transformadas com o plasmídeo recombinante por choque térmico. Em um tubo de microcentrífuga, foram incubados 2 µL do produto da reação de ligação com 50 µL de células competentes por 20 minutos no gelo. Rapidamente o tubo foi transferido para o banho-maria a 42°C por 45 segundos e imediatamente recolocado no gelo por 3 minutos. Foram adicionados 250 µL de meio SOC líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, 1,0g/L de MgCl₂) ao tubo contendo as células, que foi incubado a 37°C, sob forte agitação por 1 hora. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, Ágar 20 g/L pH 7,0) com 100 µg/mL de ampicilina usado como marcador de seletividade. A seleção de colônias contendo o plasmídeo e o inserto de interesse também foi realizada a partir da incubação com X-gal 50 µL/mL e IPTG (0,1M a 37°C durante o período de 12-16 h. As colônias brancas foram repicadas com o auxílio de palitos autoclavados e incubadas individualmente em 2 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L) com 100 µg/mL de ampicilina a 37°C, sob forte agitação por 12-16 hs (cultura saturada).

A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 1 mL de cada cultura saturada foi centrifugado por 10 minutos a 9000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 250 µL de tampão P1 (tampão P1 + RNase). Posteriormente, 250 µL de tampão P2 foram adicionados e os tubos homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. O tampão N3 foi acrescentado à mistura e imediatamente os tubos foram homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. Após a homogeneização, os tubos

foram centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. O sedimento foi descartado e o sobrenadante aplicado em colunas oferecidas pelo kit. Após centrifugação das colunas por 1 minuto a 13000 rpm, o conteúdo do tubo foi descartado. A coluna foi lavada com 500 µL de tampão PB e novamente centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm e ao final, o conteúdo do tubo foi descartado. Foram adicionados 750 µL de tampão PE (tampão PE + etanol 96%), seguido por centrifugação durante 1 minuto a 13000 rpm e descarte do conteúdo do tubo no final. A coluna foi colocada em tubo de microcentrífuga e o plasmídeo foi eluído com 50 µL de água destilada e deionizada esterilizada.

4.5 Genotipagem dos Fragmentos no Sequenciador Automático *MegaBace*

Foram genotipados dois microssatélites, MS06 e MS07, e o *Tandem Repeat* MN21, selecionados por serem os mais polimórficos entre isolados de *P. vivax* do Brasil (REZENDE *et al.*, 2009; REZENDE *et al.* 2010). Os blocos 2 e 10 da MSP-1 de *P. vivax* descritos por Putaporntip e colaboradores (2002) e o gene MSP-3α também foram estudados, totalizando seis marcadores moleculares.

Os microssatélites foram usados nas condições de amplificação descritas por Rezende e colaboradores (2010). O MS06 está localizado no cromossomo 14 do *P. vivax* em uma região codificadora, possui repetições de trinucleotídeos (TGA) e uma variação no tamanho do fragmento amplificado de 200 a 305pb. Já o MS07 está no cromossomo 2 em uma região não codificadora, também com repetições de trinucleotídeos (TAA) e uma variação no tamanho do fragmento de 347-362 pb (REZENDE, 2009; REZENDE *et al.* 2010).

O único *Tandem Repeat* usado neste trabalho, o MN21, está localizado em uma região não codificadora localizada no cromossomo 8 do *P. vivax* e possui repetições de cinco nucleotídeos (CCACT).

A genotipagem foi realizada em placa de 96 poços, sendo que em cada poço da placa foram colocados 7,75 µL de Tween-20 a 0,1%, 0,25 µL do padrão de tamanho molecular MegaBACE™ ET550-R Size Standard (GEHealthcare), para os marcadores MS06, MS07, MN21 e para os blocos 2 e 10 da MSP-1. Para o marcador MSP3α foi usado o padrão MegaBACE™ ET900-R Size Standard

(GEHealthcare). Para todos os marcadores foram usados 2 μ L do produto amplificado e para os produtos da semi-nested PCR o produto final da amplificação foi diluído 20X. As amostras foram homogeneizadas na placa, em seguida a placa foi rapidamente centrifugada. A placa foi armazenada a 4°C até que fosse analisada no sequenciador automático. Antes das amostras serem lidas no aparelho, elas foram desnaturadas a 94°C por 1 minuto.

Após a separação e a captação das amostras por eletroforese capilar, os produtos foram analisados utilizando o programa *MegaBACE Fragment Profiler versão 1.2* (Amershan Biosciences), o qual possibilita a determinação do tamanho exato dos fragmentos previamente amplificados. Pelo fato do parasito ser haplóide na fase sanguínea do ciclo, a presença de dois picos numa mesma amostra, era uma evidência de infecção múltipla (Figura 8).

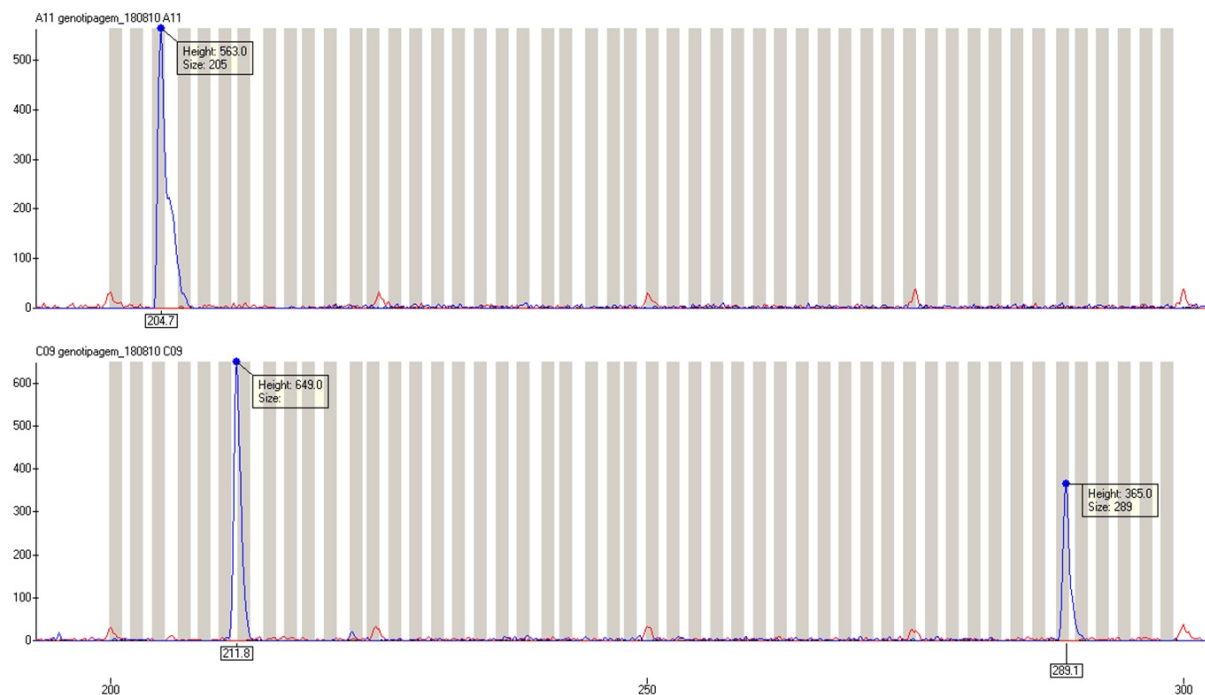


Figura 8. Representação do resultado da eletroforese capilar no sequenciador automático MegaBACE. Os picos em vermelho representam o padrão de tamanho molecular e o pico em azul representa a amostra genotipada. As barras em cinza representam os possíveis alelos para o marcador genotipado e o número abaixo dos picos azuis é o tamanho do alelo. A presença de dois picos em (B) corresponde a dois fragmentos de tamanhos distintos na mesma amostra evidenciando a presença de infecção múltipla.

4.6 Preparação das Misturas Artificiais

4.6.1 Misturas artificiais de DNAs plasmidiais

Dois fragmentos de tamanhos distintos correspondentes a cada um dos *locus* foram clonados em dois diferentes plasmídeos, pCR2.1-TOPO e pGEM-T. O DNA plasmidial contendo os fragmentos de interesse foram quantificados no espectrofotômetro (Nanodrop, *Thermo Scientific 2000*) e foi convertido para o número de cópias plasmidiais correspondente, utilizando a fórmula:

$$\text{PCN (Número de cópias plasmídeos)} = \frac{[(6,02 \times 10^{23} \text{ cópias/mol}) \times \text{DNA quantidade (g)}]}{[\text{DNA comprimento (bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}]}$$

Para as misturas artificiais, os vetores contendo os insertos de interesse de cada *locus* foram misturados nas proporções (pGEM-T/TOPO2.1) 1:1, 1:0,5 1:0,25, 1:0,125, 1:0,0625, 1:0,0313, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1, 0,0625:1, 0,0313:1. Após as misturas artificiais, os DNAs clonados foram amplificados e posteriormente genotipados conforme o item 4.6.

4.6.2 Misturas artificiais de produtos da PCR de pacientes

Nessa etapa foram selecionados dois pacientes infectados por *P. vivax* que apresentavam entre si polimorfismo de tamanho em cada um dos *loci* estudados. O polimorfismo foi identificado inicialmente a partir da resolução da PCR em gel de agarose e confirmado por genotipagem por eletroforese capilar. Os seguintes critérios adicionais foram considerados na seleção das amostras: ausência de infecção múltipla e similaridade no número de leucócitos e parasitemia.

Após a escolha das amostras foi realizada a quantificação por espectroscopia de absorção na ultravioleta (Nanodrop, *Thermo Scientific 2000*) e uma curva foi construída por diluição seriada conforme diluições do item 4.8.1 somente para os marcadores MS06 e MSP-1B2. Após as misturas artificiais, os DNAs foram amplificados e posteriormente genotipados conforme o item 4.5.

4.7 Genotipagem de pacientes

Amostras de DNA de 47 pacientes foram selecionadas entre cerca de 200 amostras de isolados de campo de *P. vivax* presentes no laboratório. As condições de genotipagem foram realizadas de acordo com o item 4.6. Dentre as 47 amostras selecionadas neste estudo, 22 cuja multiplicidade de infecção já foi previamente identificada por pelo menos um marcador molecular (ANEXO 5), foram escolhidas para verificar a eficiência de detecção de infecções múltiplas de cada um dos marcadores selecionados neste estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de polimorfismo de tamanho

Foram selecionados dois fragmentos com diferentes tamanhos (em pb) de cada marcador molecular usados nesse estudo (MS06, MS07, MSP-3 α , MSP-1B2, MSP-1B10 e MN21) para estabelecimento de infecções múltiplas artificiais. A amplificação dos diferentes marcadores foi realizada utilizando 20 amostras de indivíduos infectados por *P. vivax* e foram escolhidos os dois fragmentos que apresentaram maior diferença de tamanho em gel de agarose (um exemplo pode ser visto na Figura 9). Em seguida, realizou-se a genotipagem por eletroforese capilar para a determinação exata do tamanho dos fragmentos (Tabela 2).

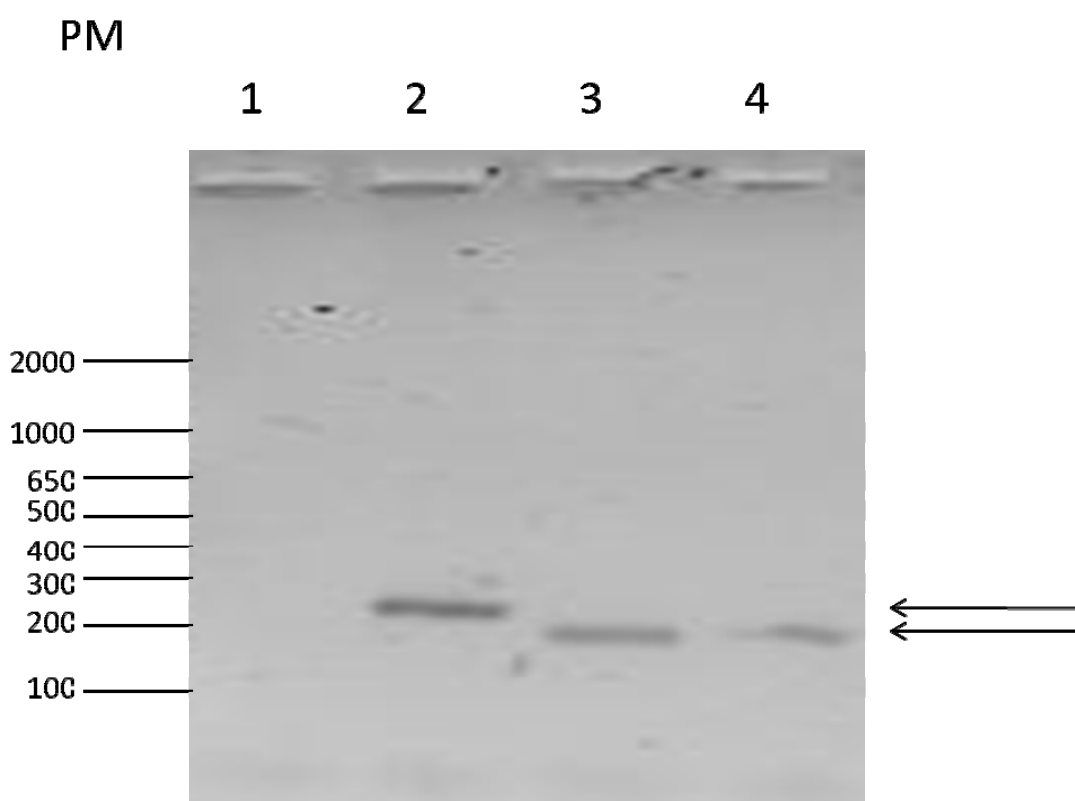


Figura 9. Resolução em gel de agarose 2% dos produtos amplificados por PCR (MS06). Os produtos das ampliações visualizadas nas canaletas 2 e 3 foram os escolhidos para a realização da etapa de clonagem. PM – Peso Molecular 1kb plus (Invitrogen); canaleta 1 – Controle negativo da PCR (sem DNA); canaletas 2 a 4 – produtos amplificados por PCR a partir de diferentes amostras de DNA de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Tabela 2. Tamanho dos fragmentos (pb) amplificados por PCR e selecionados para clonagem em plasmídeos.

LOCUS	MS06	MS07	MN21	MSP-1B2	MSP-1B10	MSP-3α	Plasmídeo
Alelo A	305	362	293	402	252	638	pGEM-T
Alelo B	200	347	257	429	258	692	pCR2.1-TOPO

5.2 Misturas artificiais de diferentes variantes clonadas nos plasmídeos pCR2.1-TOPO e pGEM-T

Os dois fragmentos referentes aos diferentes *loci* foram clonados nos plasmídeos pCR2.1-TOPO e pGEM-T (Tabela 2) para serem utilizados na simulação de infecções artificiais. A clonagem em dois vetores distintos foi feita com o propósito de realizar uma quantificação mais precisa do DNA plasmidial pela reação de PCR em Tempo Real. Para isso, foi desenhado um único par de iniciador capaz de amplificar os fragmentos de ambos os vetores. Portanto, a quantificação seria realizada separadamente para cada construção. No entanto, a amplificação ocorreu de forma inespecífica, provavelmente devido à utilização de um iniciador universal, inviabilizando a continuidade dos experimentos de quantificação da maneira originalmente proposta. Por este motivo, a quantificação de DNA plasmidial contendo os fragmentos de interesse foi realizada no espectrofotômetro.

Após a clonagem de ambas as variantes de cada marcador, a concentração foi determinada e convertida para o número de cópias plasmidiais (PCN). Seguiu-se a realização das misturas artificiais, que foram estabelecidas entre as construções (pGEM-T / pCR2.1-TOPO) para cada *locus* em proporções definidas: 1:1; 1:0,5; 1:0,25; 1:0,125; 1:0,0625; 1:0,0313; 0,5:1; 0,25:1; 0,125:1; 0,0625:1; 0,0313:1. Em seguida, para certificar que a PCR havia funcionado as misturas foram analisadas em gel de agarose 2% e, enfim genotipadas por eletroforese capilar.

As proporções dos fragmentos amplificados de cada *locus* na genotipagem por eletroforese capilar destes clones foram variáveis. Na Tabela 3 estão

apresentados os resultados da média de dois experimentos independentes. Em proporções iguais dos dois alelos (1:1) observamos que para alguns marcadores estudados foi amplificado, preferencialmente, o fragmento menor, como para os microssatélites 6 e 7, e MN21 (Tabela 3). Os alelos clonados em pCR2.1-TOPO foram preferencialmente amplificados para 5 dos 6 marcadores, apenas para MSP-1B2 a amplificação do alelo clonado em pCR2.1 foi ligeiramente menor. Nas diferentes proporções dos plasmídeos foi observada uma titulação quando o alelo A foi mantido constante e o alelo B diluído em todos os marcadores (Tabela 3). Entretanto, quando se inverteu mantendo constante o alelo B e variando o alelo A só foi observada a titulação para os marcadores MSP-1B2, MSP-1B10 e MN21, como exemplificado na figura 10 para MSP-1B2. Para os outros marcadores, como exemplificado na figura 11 para o microssatélite 6, com a manutenção do alelo A e diluição do alelo B este último apresentou níveis baixos de fluorescência para todas as diluições, dificultando sua detecção (Figura 11).

Tabela 3: Valores das proporções de fluorescência observados e normalizados para os seis marcadores deste estudo apresentando as médias de 2 experimentos para cada marcador.

MS06

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado*	
Fragmento A (305)	Fragmento B (200)	Fragmento A (305)	Fragmento B (200)	Fragmento A (305)	Fragmento B (200)
1	1	1	3,9	1	1
1	0,5	1	2,91	1	0,75
1	0,25	1	1,92	1	0,49
1	0,125	1	1,49	1	0,38
1	0,0625	1	0,68	1	0,17
1	0,0313	1	0,43	1	0,11
0,5	1	0,04	1	0,5	1
0,25	1	0,05	1	0,63	1
0,125	1	0,01	1	<u>0,13</u>	1
0,0625	1	0,02	1	<u>0,19</u>	1
0,0313	1	0	1	0	1

MS07

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A (362)	Fragmento B (347)	Fragmento A (362)	Fragmento B (347)	Fragmento A (362)	Fragmento B (347)
1	1	1	3,19	1	1
1	0,5	1	0,82	1	0,26
1	0,25	1	0,38	1	0,12
1	0,125	1	0,18	1	0,06
1	0,0625	1	0,05	1	0,01
1	0,0313	1	0,03	1	0,01
0,5	1	0,09	1	0,5	1
0,25	1	0,01	1	0,06	1
0,125	1	0	1	0	1
0,0625	1	0	1	0	1
0,0313	1	0	1	0	1

*A normalização foi calculada usando como fator de correção as proporções de 1:1 para permitir a comparação direta entre índices esperados e os valores observados. Por exemplo, se a mistura de 1:1, o tamanho do pico correspondente ao fragmento clonado no pGEM-T para um determinado *locus* foi duas vezes maior que o pico correspondente ao fragmento clonado no pCR2.1-TOPO, multiplicou-se por 2 as alturas dos picos obtidos no pCR2.1-TOPO em todas as diluições subsequente da curva.

**Os valores sublinhados referem-se aos valores normalizados que correspondem aos valores esperados, considerando um intervalo de $\pm 30\%$

Tabela 3: Valores das proporções de fluorescência observados e normalizados para os seis marcadores deste estudo apresentando as médias de 2 experimentos para cada marcador (continuação).

MSP-3 α

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A (640)	Fragmento B (692)	Fragmento A (640)	Fragmento B (692)	Fragmento A (640)	Fragmento B (692)
1	1	1	1,8	1	1
1	0,5	1	0,24	1	0,13
1	0,25	1	0,04	1	0,02
1	0,125	1	0,01	1	0,01
1	0,0625	1	0	1	0
1	0,0313	1	0	1	0
0,5	1	0,16	1	0,5	1
0,25	1	0	1	0	1
0,125	1	0	1	0	1
0,0625	1	0	1	0	1
0,0313	1	0	1	0	1

MSP1-B2

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A (402)	Fragmento B (429)	Fragmento A (402)	Fragmento B (429)	Fragmento A (402)	Fragmento B (429)
1	1	1	0,91	1	1
1	0,5	1	0,58	1	<u>0,63</u>
1	0,25	1	0,32	1	0,35
1	0,125	1	0,14	1	<u>0,15</u>
1	0,0625	1	0,03	1	0,03
1	0,0313	1	0,02	1	<u>0,02</u>
0,5	1	0,59	1	0,50	1
0,25	1	0,36	1	<u>0,3</u>	1
0,125	1	0,16	1	<u>0,13</u>	1
0,0625	1	0	1	0	1
0,0313	1	0	1	0	1

*A normalização foi calculada usando como fator de correção as proporções de 1:1 para permitir a comparação direta entre índices esperados e os valores observados. Por exemplo, se a mistura de 1:1, o tamanho do pico correspondente ao fragmento clonado no pGEM-T para um determinado *locus* foi duas vezes maior que o pico correspondente ao fragmento clonado no pCR2.1-TOPO, multiplicou-se por 2 as alturas dos picos obtidos no pCR2.1-TOPO em todas as diluições subseqüente da curva.

**Os valores sublinhados referem-se aos valores normalizados que correspondem aos valores esperados, considerando um intervalo de $\pm 30\%$

Tabela 3: Valores das proporções de fluorescência observados e normalizados para os seis marcadores deste estudo apresentando as médias de 2 experimentos para cada marcador (continuação).

MSP1-B10

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A (252)	Fragmento B (258)	Fragmento A (252)	Fragmento B (258)	Fragmento A (252)	Fragmento B (258)
1	1	1	1,27	1	1
1	0,5	1	0,63	1	<u>0,5</u>
1	0,25	1	0,36	1	<u>0,28</u>
1	0,125	1	0,2	1	<u>0,16</u>
1	0,0625	1	0,09	1	<u>0,07</u>
1	0,0313	1	0,08	1	<u>0,06</u>
0,5	1	0,53	1	0,5	1
0,25	1	0,29	1	<u>0,27</u>	1
0,125	1	0,07	1	<u>0,07</u>	1
0,0625	1	0,03	1	0,03	1
0,0313	1	0	1	0	1

MN21

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A (293)	Fragmento B (257)	Fragmento A (293)	Fragmento B (257)	Fragmento A (293)	Fragmento B (257)
1	1	1	1,74	1	1
1	0,5	1	1,32	1	0,76
1	0,25	1	0,42	1	<u>0,24</u>
1	0,125	1	0,23	1	<u>0,13</u>
1	0,0625	1	0,14	1	<u>0,08</u>
1	0,0313	1	0,07	1	<u>0,04</u>
0,5	1	0,21	1	0,5	1
0,25	1	0,11	1	<u>0,26</u>	1
0,125	1	0,04	1	0,1	1
0,0625	1	0	1	0	1
0,0313	1	0	1	0	1

*A normalização foi calculada usando como fator de correção as proporções de 1:1 para permitir a comparação direta entre índices esperados e os valores observados. Por exemplo, se a mistura de 1:1, o tamanho do pico correspondente ao fragmento clonado no pGEM-t para um determinado *locus* foi duas vezes maior que o pico correspondente ao fragmento clonado no pCR2.1-TOPO, multiplicou-se por 2 as alturas dos picos obtidos no pCR2.1-TOPO em todas as diluições subseqüente da curva.

**Os valores sublinhados referem-se aos valores normalizados que correspondem aos valores esperados, considerando um intervalo de $\pm 30\%$

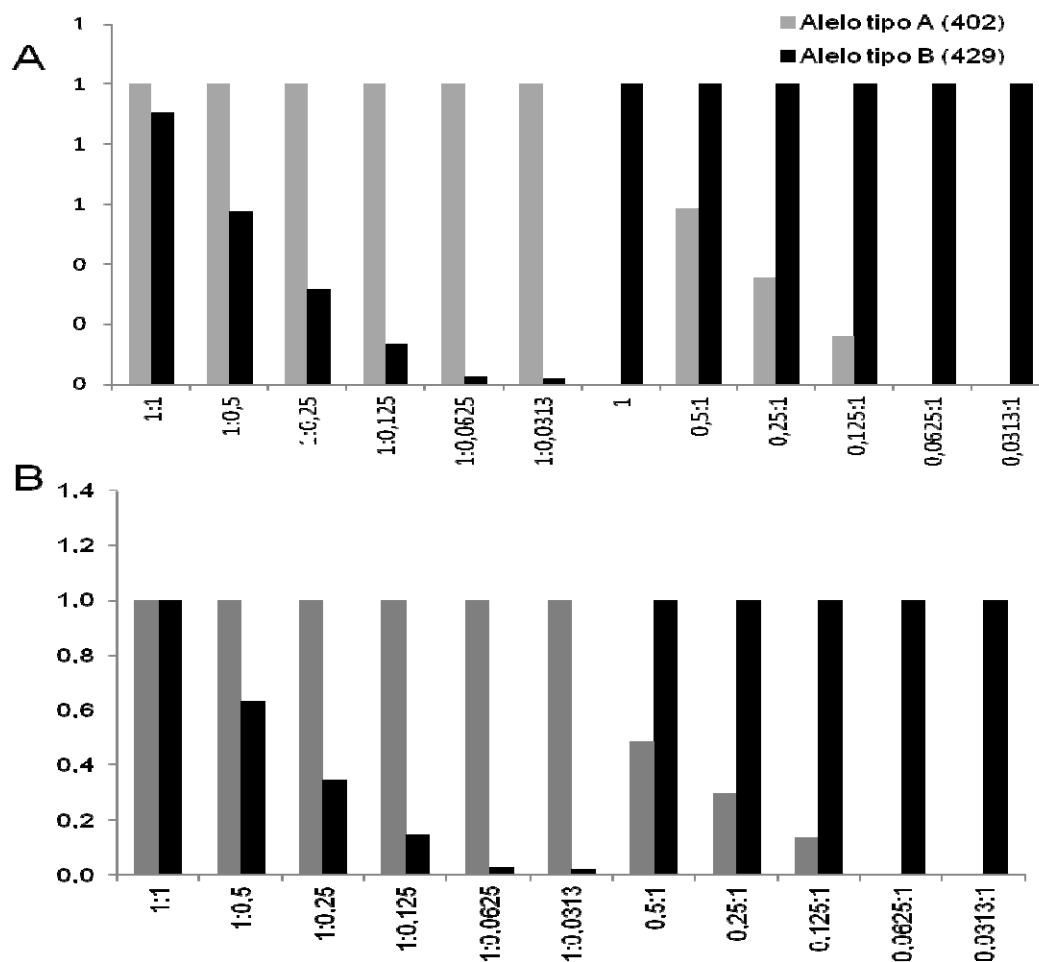


Figura 10. Determinação da eficiência de detecção de ambos os alelos nas misturas artificiais de clones para o marcador MSP-1B2. No eixo X, estão indicadas as proporções esperadas; no eixo Y, está indicada a proporção de intensidade de fluorescência observada. As barras em cinza representam as proporções observadas para o alelo A, e em preto, as proporções observadas para o alelo B. (A) Gráfico não normalizado; (B) Gráfico normalizado.

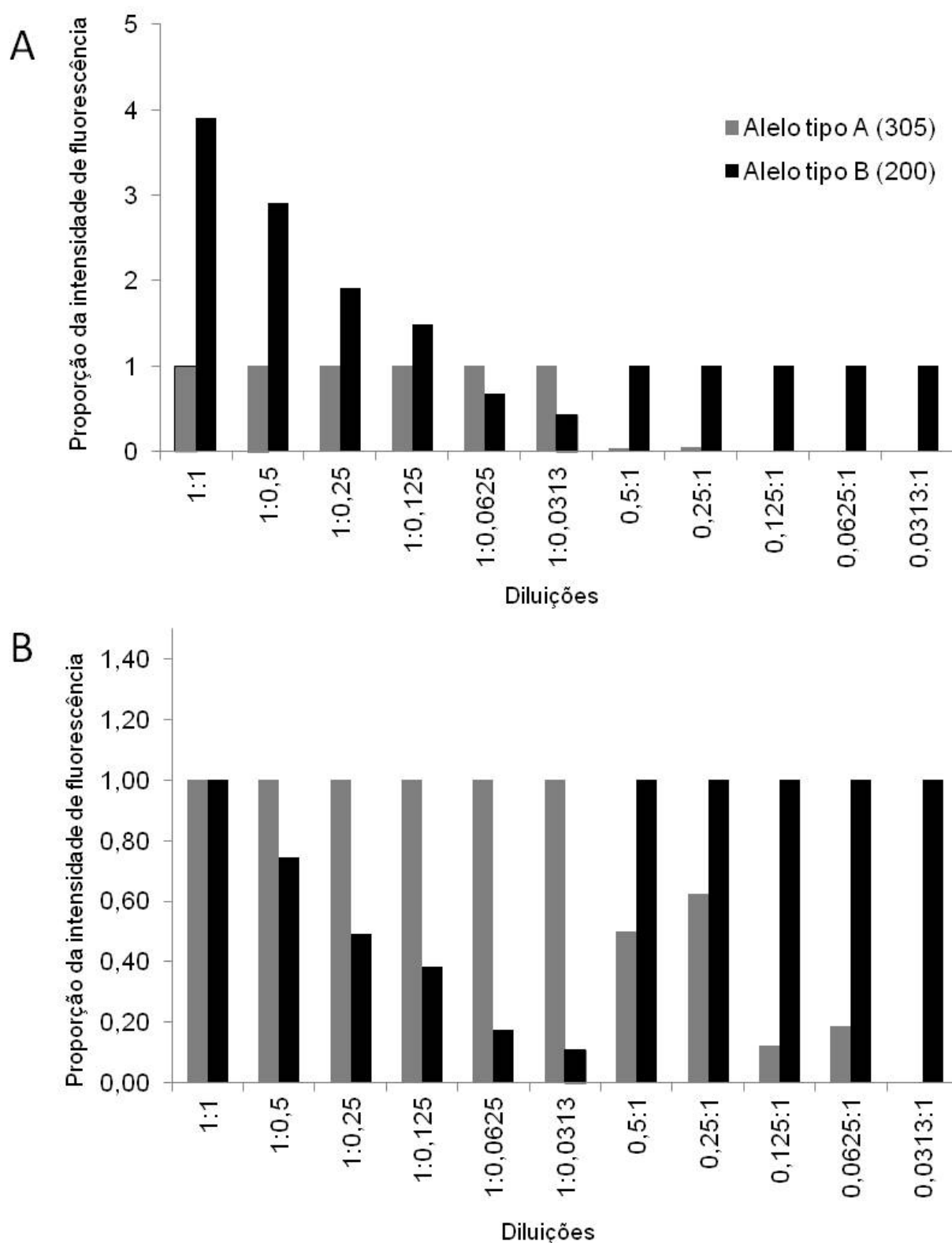


Figura 11. Determinação da eficiência de detecção de ambos os alelos nas misturas artificiais de clones para o marcador MS06. No eixo X, está indicada as proporções esperadas; no eixo Y, está indicada a proporção da intensidade de fluorescência observada. As barras em cinza representam as proporções observadas para o alelo A, e em preto, as proporções observadas para o alelo B. (A) Gráfico não normalizado; (B) Gráfico normalizado.

Para todos os marcadores foi observado que as intensidades de fluorescência determinadas pelas alturas dos picos nas misturas artificiais frequentemente não correspondiam às proporções esperadas. Considerando a possibilidade de erros na determinação do número de cópias plasmidiais e conseqüentemente nas misturas artificiais, os resultados observados foram corrigidos a partir da normalização dos dados usando como base as alturas observadas da proporção 1:1 ou 1:0,5. Assim, a proporção em que a intensidade de fluorescência está aumentada quando se utilizam os dois fragmentos em quantidades equivalentes foi usada para corrigir os valores das intensidades observadas nas diluições subseqüentes do alelo B (Tabela 3, Figura 10B e Figura 11B). Para normalização dos valores quando o alelo A foi diluído foi utilizada a proporção de 1:0,5 para normalização dos valores observados nas diluições subseqüentes. Após a normalização, diversos pontos das diluições ficaram semelhantes às proporções esperadas, como pode ser observado nos valores sublinhados da tabela 3.

Diante da dificuldade de encontrar correspondência entre as proporções esperadas e as alturas observadas dos picos nas misturas artificiais, podemos sugerir que vieses de amplificação podem afetar as estimativas da abundância de cada alelo e conseqüentemente, influenciarem nos resultados referentes à identificação de clones geneticamente distintos em uma infecção múltipla.

5.2.1 Clonagem dos fragmentos referentes a um *locus* em um mesmo plasmídeo

Nas misturas artificiais a amplificação e detecção da genotipagem geralmente foi mais eficiente para o alelo B quando o plasmídeo utilizado foi o pCR2.1-TOPO. Desta forma, para verificar se a amplificação preferencial do alelo B ocorria devido à sua clonagem no plasmídeo pCR2.1-TOPO, a clonagem do alelo B foi realizada no pGEM-T. Este experimento foi realizado apenas com o marcador MS7 e os resultados são provenientes de um único experimento (Tabela 4).

Tabela 4: Proporções de fluorescência observadas e normalizadas para o MS07, com ambos os fragmentos clonados no mesmo plasmídeo (pGEM-T).

Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A (362)	Fragmento B (347)	Fragmento A (362)	Fragmento B (347)	Fragmento A (362)	Fragmento B (347)
1	1	1	5,15	1	1
1	0,5	1	2,21	1	<u>0,42</u>
1	0,25	1	1,16	1	<u>0,22</u>
1	0,125	1	0,58	1	<u>0,11</u>
1	0,0625	1	0,26	1	<u>0,05</u>
1	0,0313	1	0,12	1	<u>0,02</u>
0,5	1	0,05	1	0,5	1
0,25	1	0,03	1	<u>0,3</u>	1
0,125	1	0,02	1	0,2	1
0,0625	1	0	1	0	1
0,0313	1	0	1	0	1

**Os valores sublinhados referem-se aos valores normalizados que correspondem aos valores esperados, considerando um intervalo de $\pm 30\%$

Os valores não normalizados, semelhantemente aos experimentos utilizando fragmentos clonados em diferentes plasmídeos, não apresentaram correspondência entre os valores observados e os esperados. A clonagem dos dois fragmentos em plasmídeos iguais continuou apresentando a amplificação preferencial do alelo B, sugerindo que esta amplificação preferencial é independente do vetor utilizado na clonagem. Para os resultados normalizados quando se utilizou o mesmo plasmídeo, ocorreu uma correspondência entre os valores esperados e os observados.

5.3 Detecção dos alelos nas misturas artificiais considerando a proporção de 1/3 e 1/4

Os resultados de eletroforese capilar analisados no equipamento *MegaBace* nos permitem avaliar as alturas dos picos e a determinar os tamanhos dos fragmentos. Quando há dois ou mais picos em uma mesma amostra esta podem ser considerada uma infecção múltipla, uma vez que o parasito é haplóide.

Na literatura são usados geralmente dois critérios para a detecção dos alelos não predominantes. O primeiro critério (critério 1 – 1/3) considera que o alelo de

menor altura deve apresentar mais de um terço da altura do alelo maior. O segundo critério (critério 2 – 1/4) considera picos com mais de um quarto da altura do pico maior.

Nos experimentos de misturas artificiais de fragmentos clonados, cada fragmento possui um tamanho conhecido para todos os *loci*. Desta forma, todos os picos referentes a estes tamanhos, quando detectados foram incluídos nas análises, mesmo quando as alturas dos picos menores não preencheram os critérios (1/3 e 1/4) sugeridos para a detecção do alelo menos abundante nas infecções múltiplas.

A capacidade de detecção dos marcadores diminuiu rapidamente à medida que as densidades clonais tornaram-se mais discrepantes. Para os marcadores MS07 e MSP-3 α , quando se manteve o alelo A e diluiu-se o alelo B, o alelo raro não foi detectado em nenhum ponto da diluição (Figura 12A). A diferença entre os dois critérios se tornou evidente apenas na diluição 1:0,25 para MSP-1B2 e MSP-1B10. Considerando ambos os critérios, MS06 foi o marcador que detectou os alelos raros no maior número de diluições (até 1:0,125) De modo geral, quando se manteve o alelo B e diluiu-se o alelo A também foi observado uma diminuição na detecção do alelo raro a medida que as diferenças nas densidades clonais se tornaram maiores (Figura 11B). A diferença entre os critérios foi visível também na diluição 1:0,25, na qual os alelos MSP-1B2, MSP-1B10 e MN21 foram detectados considerando apenas o critério 2 (1/4).

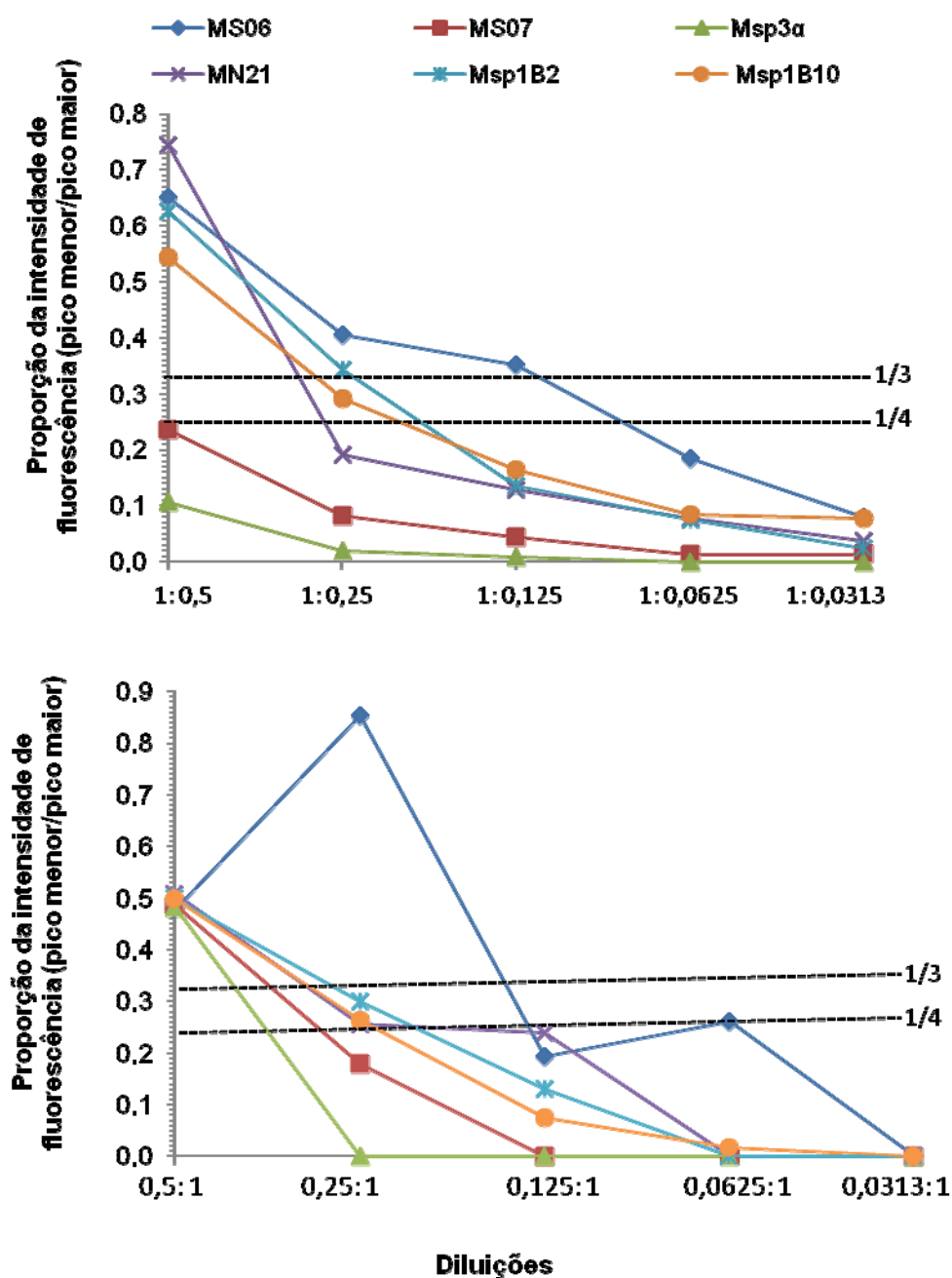


Figura 12. Eficiência de detecção de múltiplos clones por marcadores moleculares considerando as proporções 1/3 e 1/4 para os valores normalizados. No eixo X, está indicada as proporções esperadas; no eixo Y, está indicada a proporção da intensidade de fluorescência observada. (A) Diluições em que o alelo A permanece constante e a concentração do alelo B é alterada; (B) diluições em que a concentração do alelo A é alterada e do alelo B permanece constante.

A figura 12 mostra a eficiência de detecção de cada marcador molecular considerando os critérios 1 (1/3) e 2 (1/4) para discriminação do alelos de menor abundância. Quando se considera uma proporção acima de um quarto nas diferentes diluições realizadas, uma maior eficiência de detecção de infecções

múltiplas foi observada para o *locus* MS06 (64%), seguida por MSP-1B2 e MSP-1B10 (45% para ambos). Ao considerar apenas o critério 1 (1/3), houve uma redução na capacidade de detecção do alelo raro para os marcadores: MSP-1B10 (18%), MSP-1B2 (9%), MN21(9%) e MS06 (9%) (Figura 13).

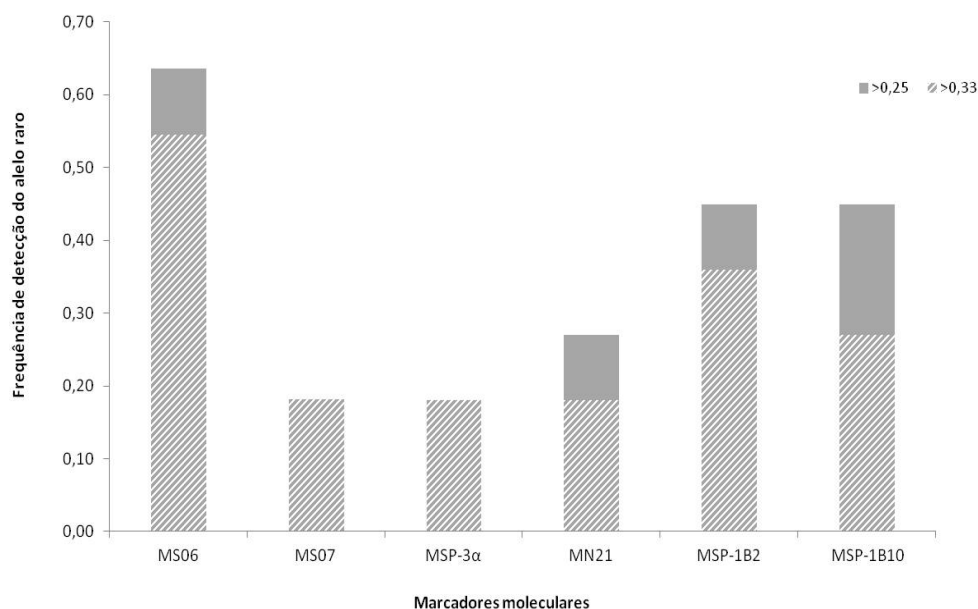


Figura 13. Frequência de detecção de alelos nas misturas artificiais pelos marcadores moleculares utilizados neste estudo considerando as proporções 1/3 e 1/4 para os valores normalizados.

Ao se analisar todos os *loci* em conjunto por diluição é possível observar que em proporções mais concentradas o conjunto de marcadores moleculares apresenta maior eficiência de detecção das infecções múltiplas (Figura 14). Quando a concentração do alelo A é reduzida, a frequência de detecção do alelo raro é maior do que quando se dilui o alelo B. Como demonstrado na figura 12, apenas na diluição 1:0,25, independente do alelo que foi diluído, há diferença entre os critérios 1(1/3) e 2 (1/4) de detecção dos alelos raros.

Ao analisarmos os resultados das misturas artificiais podemos inferir que o microsatélite 6 e ambos domínios da MSP-1 foram os melhores marcadores para detecção de infecção múltipla, pois detectaram a multiplicidade de infecções em densidades clonais mais discrepantes (Figuras 12 e 13).

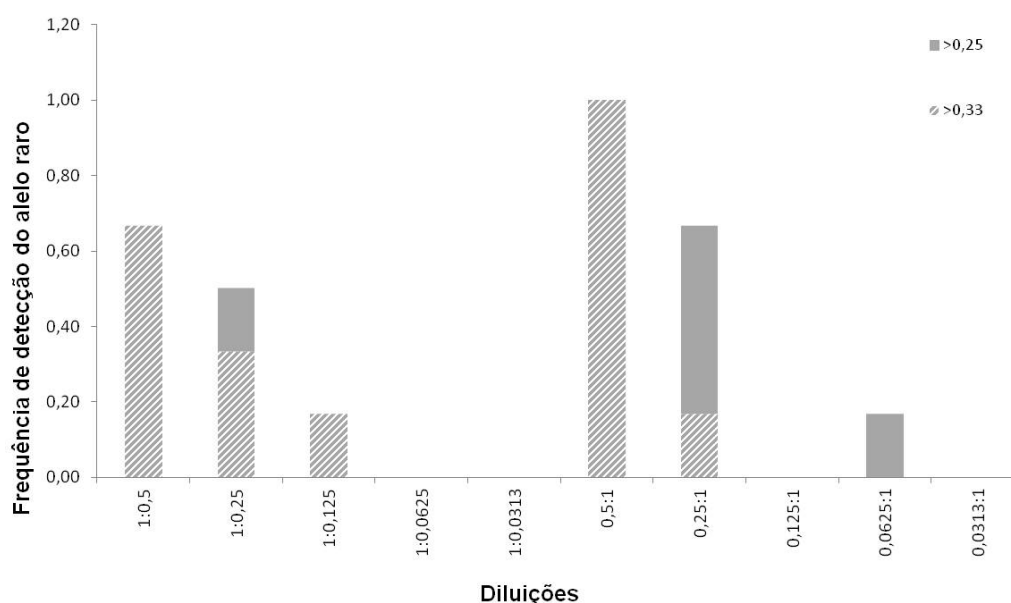


Figura 14. Frequência de detecção de alelos nas misturas artificiais por todos os marcadores moleculares nas diversas diluições, considerando as proporções 1/3 e 1/4 para os valores normalizados. As primeiras cinco diluições correspondem às misturas em que o alelo A permanece constante e a concentração do alelo B é alterada. As demais diluições correspondem as misturas em que a concentração do alelo A é alterada e do alelo B permanece constante.

5.4 Infecção múltipla artificial de isolados de *P. vivax*

Misturas de DNAs genômicos a partir de dois isolados de *P. vivax* geneticamente distintos foram realizadas para estimar precisamente a relação de abundância dos alelos em misturas com diferentes proporções desses DNAs.

Foram selecionadas duas amostras de pacientes infectados por *P. vivax* com parasitemias e número de leucócitos similares para obtenção de quantidades semelhantes de DNA total na mistura final. Em seguida, para simular as infecções mistas, foram realizadas misturas com concentrações conhecidas destes DNAs. Foi realizada a genotipagem dos marcadores MS06 e MSP-1B2, selecionados por representarem dois perfis distintos, como apresentado na tabela 5. As curvas dos demais marcadores (MS07, MSP-1B10 e MSP-3 α) foram feitas utilizando apenas os pontos de maior concentração da curva (ANEXO 4).

Nas várias misturas feitas para cada marcador, as proporções observadas não foram correspondentes às esperadas. Observou-se um perfil semelhante nas

misturas artificiais de fragmentos clonados em plasmídeos. Também foi observada a titulação quando a concentração do alelo A foi mantido constante e o alelo B foi diluído para ambos marcadores. Entretanto, quando a concentração do alelo B foi mantida constante e o alelo A foi diluído, observou-se titulação apenas para MSP-1B2.

A partir das análises dos resultados da tabela 5 é possível inferir que mesmo após normalização prévia (parasitemia e número de leucócitos similares), as alturas observadas dos picos nas misturas artificiais não se assemelham as proporções esperadas. Contudo, quando é feita a normalização dos dados (seção 5.2), uma maior correspondência entre os picos observados e esperados pode ser encontrada.

Tabela 5: Mistura artificial de isolados de campo para dois marcadores moleculares.

Alelo tipo B: Alelo tipo A		MS06				MSP1-B2			
Proporção esperada		Proporção observada		Normalizado		Proporção observada		Normalizado	
Fragmento A	Fragmento B	Fragmento A (247)	Fragmento B (210)	Fragmento A (247)	Fragmento B (210)	Fragmento A (429)	Fragmento B (433)	Fragmento A (429)	Fragmento B (433)
1	1	1	4,87	1	1	1	0,37	1	1
1	0,5	1	2,73	1	<u>0,56</u>	1	0,30	1	0,81
1	0,25	1	1,58	1	<u>0,32</u>	1	0,12	1	<u>0,32</u>
1	0,125	1	1,11	1	0,23	1	0,10	1	0,27
1	0,0625	1	0,51	1	0,1	1	0,04	1	0,11
1	0,0313	1	0,28	1	0,06	1	0,03	1	0,08
0,5	1	0,05	1	0,50	1	1,46	1	0,50	1
0,25	1	0,05	1	0,50	1	0,9	1	<u>0,30</u>	1
0,125	1	0,06	1	0,60	1	0,33	1	<u>0,13</u>	1
0,0625	1	0	1	0	1	0,2	1	0	1
0,0313	1	0	1	0	1	0,13	1	0	1

**Os valores sublinhados referem-se aos valores normalizados que correspondem aos valores esperados, considerando um intervalo de $\pm 30\%$

5.5 Genotipagem de Isolados de *P. vivax*

Amostras de DNA de 47 pacientes foram selecionadas para realizar a detecção de infecções múltiplas em amostras de campo. O MS06 foi o marcador que melhor detectou as infecções múltiplas (30%), seguido dos marcadores MS07 (23%), MSP-1B10 (23%) e MN21(21%) (Figura 15).

Quando utilizamos o critério 1 (1/3) para a detecção do alelo em menor abundância nas infecções múltiplas, há a possibilidade de perdas na detecção destas infecções. Como observado para as misturas artificiais, para o MS06, 11% das infecções de múltiplos clones deixam de ser detectadas. Já para os marcadores MS07 e MSP-3 α a falha de detecção foi de 4%. Para a MSP-1B10 a falha de detecção foi de apenas 2%, enquanto para o MN21 e MSP-1B2 a restrição do critério de detecção não alterou a porcentagem de detecção das infecções múltiplas (Figura 15).

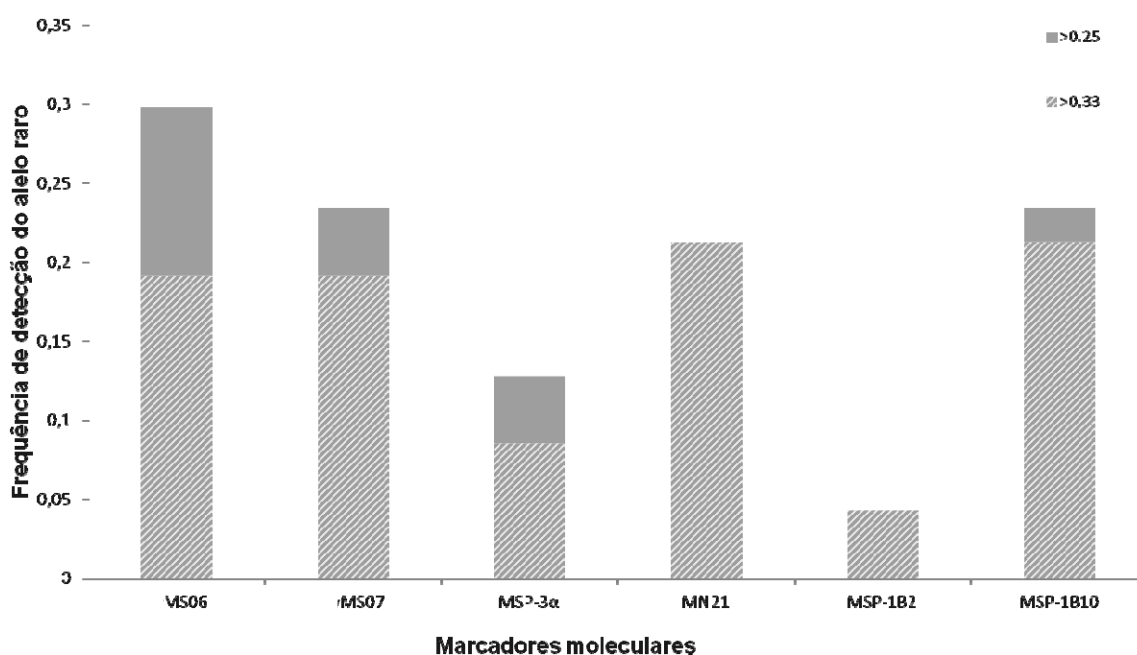


Figura 15. Frequência de infecções múltiplas detectadas por cada marcador molecular considerando os diferentes critérios de detecção para o alelo menos abundante. No eixo X, está indicado os marcadores moleculares; no eixo Y, está indicada a frequência de detecção das infecções múltiplas.

Vinte e duas amostras cuja multiplicidade de infecção já havia sido previamente identificada com pelo menos um marcador molecular (ANEXO 5), foram selecionadas a fim de comparar a eficiência de cada um dos marcadores

selecionados neste estudo na detecção das infecções múltiplas em amostras de campo (Figura 17).

Dentre as 22 amostras selecionadas, 100% das infecções múltiplas foram detectadas por pelo menos um marcador, 55% foram identificadas por 2 marcadores e 23% por três marcadores. Infecções múltiplas de dez pacientes (45%) foram detectadas apenas por um marcador (Figura 17). Considerando os seis marcadores estudados, pode-se ressaltar a importância dos marcadores MS06, MSP-1B10 e MN21 por fornecerem um incremento na detecção das infecções múltiplas de 14%, 14% e 9%, respectivamente. Já os demais marcadores tiveram um aumento de no máximo 5% na detecção deste tipo de infecção.

O microssatélite 6 e MSP-1B10 mostraram-se bons marcadores na genotipagem de isolados de *P. vivax* e sua eficiência de detecção foi consideravelmente aumentada quando o critério menos restrito (critério 2) foi considerado. Já as proteínas de superfície do mesozoíto, MSP-3 α e o bloco 2 da MSP-1, não foram apropriadas para a detecção das infecções múltiplas e apresentaram pouco ou nenhum incremento quando analisadas sozinhas.

Um número distinto de alelos foi identificado para cada um dos seis *loci*: MS06 (17 alelos), MS07 (19), MSP-3 α (13), MSP-1B2 (12), MSP-1B10 (15) e MN21 (11). Assim, se considerarmos os *loci* mais polimórficos, MS06 e MS07, a detecção de infecções múltiplas foi de aproximadamente 70%. Acrescentando o terceiro *locus* mais polimórfico (MSP-1B10) esta porcentagem sobe para 90%. E, finalmente adicionando os *loci* MN21 e MSP-3 α a porcentagem de detecção alcança 100% das infecções, indicando que cinco marcadores deste estudo foram suficientes para a detecção de todas as infecções múltiplas (Figura 16).

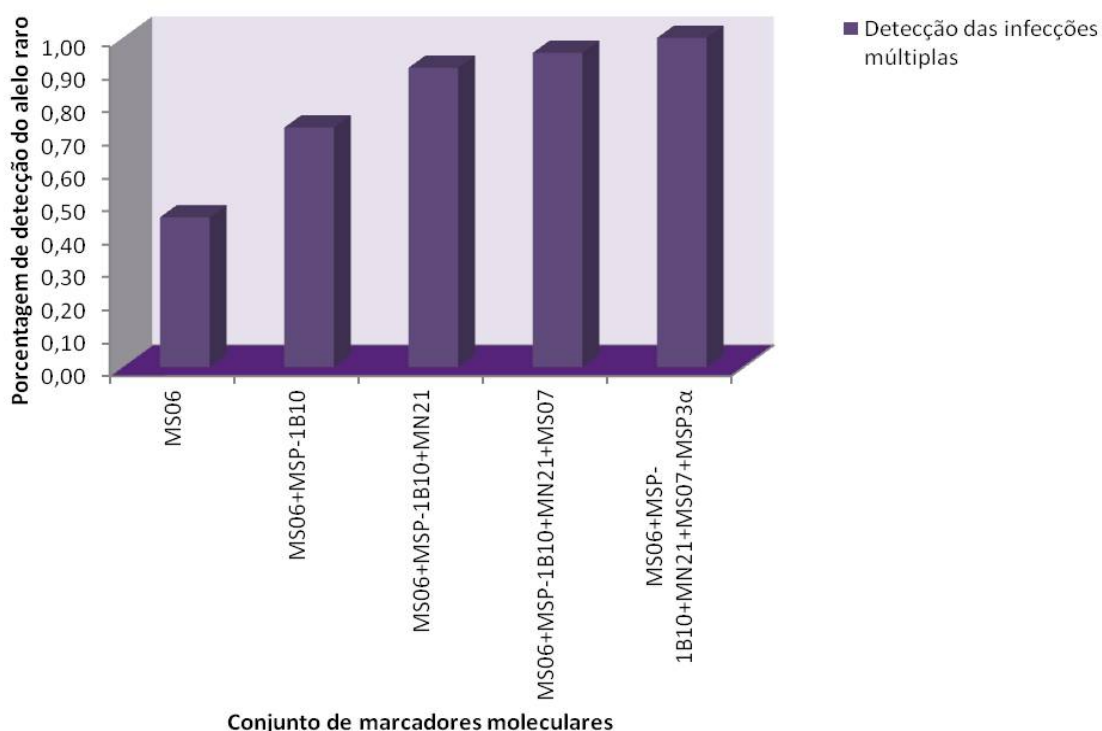


Figura 16. Aumento na percentagem de detecção considerando diferentes combinações dos marcadores avaliados neste estudo.

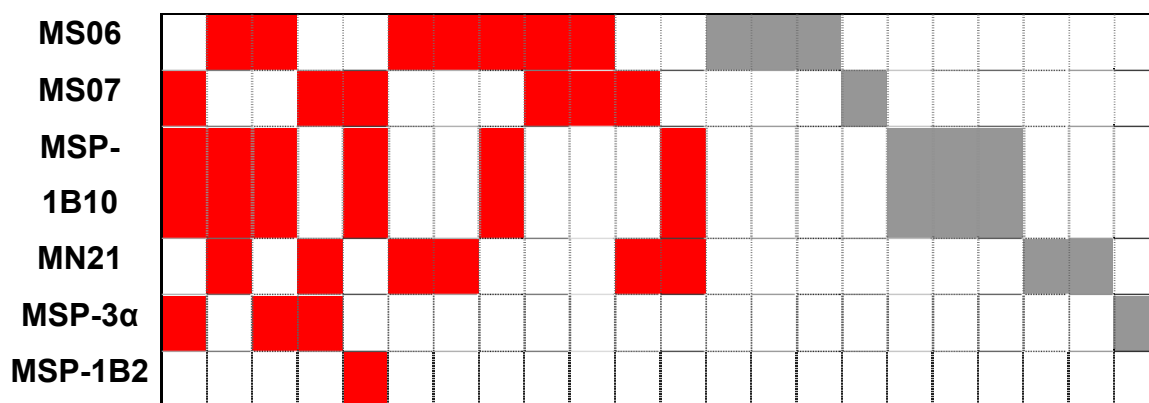


Figura 17. Identificação das infecções múltiplas pelos seis marcadores moleculares em amostras cuja multiplicidade de infecção já foi previamente identificada (realizada por dois estudos do nosso grupo de pesquisa). Cada coluna se refere a uma amostra avaliada pelos seis marcadores. Em vermelho, estão destacadas as amostras cuja multiplicidade foi detectada por pelo menos dois marcadores; em cinza foram destacadas as amostras cuja multiplicidade foi detectada por apenas um marcador.

6 DISCUSSÃO

Os conhecimentos com relação à variabilidade genética, estrutura de população e evolução do *P. vivax* estão atrasados em relação ao *P. falciparum*, devido a sua baixa virulência e a dificuldade de realizar cultivo *in vitro* contínuo deste parasito (LECLERC *et al.*, 2004). As infecções causadas por *P. vivax* são frequentemente caracterizadas pela presença de dois ou mais parasitos geneticamente distintos em um mesmo indivíduo, caracterizando as infecções múltiplas. Estudos sobre taxas de infecções múltiplas têm sido restritos principalmente devido às limitações das ferramentas utilizadas para medir a composição genética destas infecções (AUBURN *et al.*, 2012). Desta forma, este estudo propôs uma análise diferenciada destas infecções ao comparar a eficiência de marcadores genéticos neutros e não neutros em detectar infecções múltiplas naturais e também artificiais com proporções bem definidas de cada variante. Como a mesma metodologia para amplificação e detecção dos fragmentos amplificados – PCR e eletroforese capilar – foi utilizada para os diversos marcadores estudados, as diferenças observadas entre os marcadores ao longo do estudo refletiram, principalmente, diferenças na amplificação pela *Taq* DNA polimerase e nível de variabilidade genética entre os *loci*.

No presente estudo, a partir dos experimentos de detecção de infecções múltiplas artificiais (fragmentos clonados e DNA genômico) verificou-se que para os MS e TR, alelos menores foram preferencialmente amplificados por PCR e detectados por eletroforese capilar. Além disso, para ambos os blocos da MSP-1, as quantidades de DNA utilizadas nas misturas foram similares às detectadas na genotipagem. Já para a MSP-3 α não foi detectada a amplificação preferencial do alelo menor. Na detecção de infecções naturais de isolados de *P. vivax* da população da Amazônia Brasileira, não foi observada a preferência por alelos curtos na detecção do alelo raro (dados não mostrados). Vários estudos na literatura discutem a eficiência de amplificação diferencial de alelos em infecções múltiplas. Greenhouse e colaboradores (2007), ao genotipar diferentes *loci* de *P. falciparum*, demonstrou que alelos de tamanhos menores foram mais eficientemente detectados. Ao contrário, Havryliuk e colaboradores (2008) ao usarem misturas de DNA genômico de pacientes infectados por *P. vivax* para simular infecções múltiplas

observaram uma dificuldade de amplificação de alelos menores nas misturas desproporcionais. Estes autores sugerem que grandes alelos tendem a competir com alelos menores por iniciadores e outros reagentes da PCR (HAVRYLIUK *et al.*, 2008). Em concordância com os resultados do primeiro estudo, VARDOS-ZALIK e colaboradores (2009) mostraram uma baixa eficiência na amplificação dos alelos maiores em misturas artificiais de múltiplos clones para o *Plasmodium mexicanum* infectando lagartos. Assim, baseado nos nossos resultados e dados da literatura sugere-se que de fato para alguns marcadores ocorra uma preferência na amplificação e/ou detecção de alelos com diferentes tamanhos, mas o motivo desta preferência ainda é desconhecido. Vários mecanismos hipotéticos podem explicar a amplificação seletiva de alguns moldes de misturas de genes em produtos finais de PCR. Uma possível explicação seria a composição de bases na sequência de DNA, uma vez que moléculas com altos conteúdos de CG apresentam dificuldades em dissociar em moléculas de fita simples e apresentam menor eficiência de hibridação com iniciadores (SUZUKI *et al.*, 1996; DABNEY *et al.*, 2012). Amplificação por PCR destas sequências ricas em GC e / ou a longas sequências repetitivas é um desafio por causa das estruturas resultantes da desnaturação incompleta, recombinação e auto ligação de sequências alvo. Estas estruturas secundárias são consideradas um grande obstáculo para o bloqueio da DNA polimerase durante a fase de extensão, levando a formação de produtos de extensão incompleta e favorecendo amplificação de produtos não específicos (DABNEY *et al.*, 2012; OPANA *et al.*, 2012). Além disso, instrumentos baseados em eletroforese capilar tendem a detectar os fragmentos mais curtos mais rapidamente, ou seja, o pico mais alto será exibido para o microsatélite que contém o alelo com menor número de repetições.

As análises de polimorfismo e diversidade da população de *P. vivax* tem se concentrado em moléculas dos parasitas que se encontram sob pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro, particularmente antígenos ortólogos aos de *P. falciparum*, tais como a proteína de superfície de merozoíto, proteína de superfície de circunsporozoíto, ou antígenos de ligação aos eritrócitos (CUI *et al.*, 2003a). No entanto, alguns parâmetros populacionais são mais bem investigados utilizando marcadores de DNA que são neutros ou não estão sob forte seleção, como os *loci* de microsatélites (LECLERC *et al.*, 2004). Neste trabalho foram selecionados dois microsatélites (MS), uma repetição em série (TR), os blocos 2 e 10 da MSP-1 e a MSP-3 α para avaliar a eficiência destes marcadores na detecção de infecções

múltiplas causadas por *P. vivax*. Os microssatélites são amplamente utilizados para estudar a diversidade genética dos parasitos da malária, devido a sua abundância, alta taxa de mutação e provável evolução neutra. Leclerc e colaboradores (2004) encontraram uma baixa variabilidade nos microssatélites estudados. Enquanto que Imwong e colaboradores (2006) apresentaram dados de variabilidade de MS sugerindo que *P. vivax* possuía uma substancial diversidade alélica. A explicação dada por Imwong e colaboradores para a diferença encontrada entre os estudos foi que a variação nos microssatélites é dependente do número de repetições, isto é, do tamanho do arranjo. No primeiro estudo, os microssatélites analisados por Leclerc apresentavam uma média de 5,5 unidades repetitivas, ou seja, arranjos muito pequenos, se comparados aos arranjos do segundo estudo, que apresentavam uma média de variação de 16 repetições. Isso mostra que arranjos longos são mais variáveis do que os curtos, pois, mutações se tornam exponencialmente mais comuns com o aumento do arranjo. A partir de então, vários estudos populacionais para *P. vivax* foram publicados utilizando microssatélites como marcadores moleculares, mostrando as diferenças da diversidade destes marcadores no estudo de diferentes populações (FERREIRA *et al.* 2007; IMWONG *et al.*, 2007; JOY *et al.* 2008; KARUNAWEEERAE *et al.* 2008, REZENDE *et al.*, 2010). Os *loci* de microssatélites têm sido propostos como melhores indicadores de diversidade clonal (VARDO e SCHALL, 2007).

Por outro lado, as proteínas de superfície do merozoíto (MSPs) são amplamente utilizadas para os estudos de diversidade clonal de *Plasmodium*, apesar de seu uso ser questionado devido à possibilidade da ação da pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro (ANDERSON *et al.*, 2000). Vários estudos recentes tem mostrado a eficiência destes *loci* na detecção de alelos nas infecções clonais. Por exemplo, a MSP-2 de *P. falciparum* foi utilizada em um estudo de monitoramento de eficácia de antimaláricos com o objetivo de distinguir entre recrudescimento e reinfecção (ROUSE *et al.*, 2008). Outro estudo, utilizando a MSP-2 para *P. falciparum* e MSP-1B2 e um MS para *P. vivax* comparou a taxa de infecção múltipla entre indivíduos infectados por *P. vivax* e *P. falciparum* (KOEPLI *et al.* 2011b). Recentemente, um estudo desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência da multiplicidade de infecção no risco de desenvolver episódios clínicos de malária por *P. falciparum* também utilizou a MSP-2 para caracterização das infecções nas amostras estudadas (MUELLER *et al.*, 2012). Esses e vários outros

estudos sugerem que a MSP-2 é um ótimo marcador para amplificação e detecção de isolados de *P. falciparum*. Assim, para o *P. falciparum*, os critérios de genotipagem são bem definidos, por exemplo, a genotipagem de genes que codificam as proteínas de superfície de merozoíto (MSP-1 e MSP-2) é um método padrão para a avaliação da multiplicidade de infecção (ASSEFA *et al.*, 2014). Inclusive, o bloco 2 da MSP-1 e a MSP-2 correspondem a duas regiões do genoma do *P. falciparum* recomendadas nos protocolos de genotipagem pela Organização Mundial de Saúde -OMS (JULIANO *et al.*, 2010).

Existem poucos estudos sobre a dinâmica das infecções múltiplas e os conhecimentos são limitados devido às dificuldades para se estimar a taxa destas infecções. Assim neste trabalho, variantes referentes a cada um dos *loci* estudados de *P. vivax* foram clonadas em diferentes plasmídeos e a eficiência de detecção de parasitos geneticamente distintos na mesma infecção pelos marcadores moleculares selecionados para o estudo foi comparada. A partir do produto clonado foram feitas misturas artificiais considerando proporções distintas e definidas entre as variantes dos diferentes *loci*. Inicialmente, uma normalização foi feita a partir da dosagem do DNA no espectrofotômetro seguida pelo cálculo do número de cópias do plasmídeo (PCN), que estima as quantidades de moléculas de plasmídeo em cada mistura. No entanto, erros relacionados à dosagem do DNA (por exemplo, a incapacidade de diferenciar entre os ácidos nucleicos, DNA e RNA, no espectrofotômetro, uma vez que ambos absorvem luz UV a 260 nm), que são inerentes ao processo de dosagem no espectrofotômetro, não puderam ser considerados na normalização inicial. Desta forma, para uma análise mais fiel dos dados foi feita uma posterior normalização que foi calculada usando como fator de correção as proporções de 1:1 para permitir a comparação direta entre índices esperados e os valores observados. É conhecido que a detecção de clones individuais é dificultada quando as suas densidades variam em torno do limite de detecção (KROPFLI *et al.*, 2011b). Com a utilização deste método foi possível detectar a multiplicidade alélica até mesmo em baixas densidades clonais. Isso mostra que a técnica utilizada para amplificação e detecção foi capaz de estimar os alelos minoritários nas misturas. A multiplicidade de infecção em densidades clonais baixas foi detectada por quatro (MS06, blocos 2 e 10 das MSP-1 e MN21) dos seis marcadores estudados. No entanto, observou-se que para o MS06 as alturas dos picos nem sempre estimam de forma precisa a predominância clonal. Mas, de maneira interessante, os marcadores nos blocos 2 e

10 das MSP-1 e MN21 conseguiram estimar de forma apurada as proporções entre os clones nas infecções múltiplas.

Quando se aplicam os critérios de detecção na busca dos alelos menos frequentes ($1/3$ e $1/4$) que são comumente usados em estudos populacionais (por exemplo, ANDERSON *et al.* 1999, ANDERSON *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.* 2007; VARDO e SCHALL, 2007; IMWONG *et al.*, 2007; KARUNAWEERA *et al.*, 2008, HAVRYLIUK *et al.* 2008), a eficiência destes marcadores diminui drasticamente à medida que aumentam as discrepâncias clonais. Uma conclusão similar feita por Koepfli (2011) mostrou que em infecções múltiplas, as variantes minoritárias que constituem uma pequena percentagem do total da carga parasitária podem não ser detectadas, devido a ausência de amplificação. Estes autores sugerem que devido a competição por iniciadores ou outros componentes da mistura da reação de PCR, os clones mais abundantes são preferencialmente amplificados (KOEPLI *et al.*, 2011b).

Nas misturas artificiais como o tamanho dos alelos era conhecido, eles foram incluídos desconsiderando os critérios de restrição do alelo raro. Contudo, a aplicação de critérios rigorosos pode diminuir a capacidade de detecção de múltiplos alelos em infecções múltiplas naturais. Por outro lado, a abrangência destes critérios pode estar mais sujeita a detecção de artefatos que são comumente produzidos durante a síntese de DNA pelo deslizamento da DNA polimerase no processo de amplificação (HAVRYLIUK *et al.*, 2008; HAVRYLIUK, FERREIRA, 2009). Assim, para as infecções múltiplas naturais, os alelos frequentemente não detectados podem corresponder a clones de menor densidade (GREENHOUSE *et al.* 2006).

De modo geral, os resultados deste estudo mostraram uma maior amplificação das variantes B clonadas no plasmídeo pCR2.1-TOPO. Desta forma, para verificar se a amplificação preferencial era dependente do plasmídeo usado na clonagem e não do alelo em si, a clonagem do alelo B foi realizada no pGEM-T. Apesar da realização de um único experimento, os resultados mostram que o alelo B continuou sendo preferencialmente amplificado, independentemente do plasmídeo em que estava clonado. Estes dados sugerem que essa amplificação preferencial é inerente a variante e pode ser dependente da sua sequência, como por exemplo, determinada pela presença de mutações na região de ligação dos iniciadores dificultando a amplificação de alguns alelos (HAVRYLIUK *et al.*, 2008).

Em resumo, a partir dos resultados obtidos nessa primeira parte do estudo, em que dois fragmentos foram clonados para cada marcador estudado e a eficiência de amplificação e detecção desses marcadores em misturas simulando infecções múltiplas foi comparado, sugere-se que os marcadores estudados foram capazes de detectar tanto fragmentos menores, quanto maiores, mas alguns marcadores não estimaram as proporções corretas dos fragmentos nas misturas artificiais. Além disso, alguns fragmentos parecem ser amplificados preferencialmente, independentes do seu tamanho. Da primeira parte do trabalho, também se pode inferir que o MS06 e os blocos 2 e 10 da MSP-1 foram os melhores marcadores para detecção de infecção múltipla, pois detectaram a multiplicidade de infecção em densidades clonais mais discrepantes.

Na segunda etapa deste estudo foram feitas misturas de DNAs genômicos a partir de duas amostras de pacientes diferentes. Um estudo com uma abordagem semelhante foi realizado por Havryliuk e colaboradores (2008) utilizando misturas de DNA genômico de dois isolados de *P. vivax* para investigar a diversidade clonal a partir da genotipagem de 12 microssatélites. No entanto, as misturas foram realizadas sem nenhuma quantificação prévia do DNA a ser adicionada às misturas, por exemplo, em relação a parasitemia das amostras, não possuindo, portanto, o conhecimento prévio de qual alelo seria predominante nas misturas de proporção 1:1. No presente estudo, foi realizada uma normalização inicial por meio de dosagens dos DNAs antes das misturas e seleção de amostras com semelhantes parasitemias e número de leucócitos. Essa normalização em relação ao número de parasitos e leucócitos é importante, pois possibilita a mistura de amostras com quantidades similares do DNA do parasito. Mesmo após essa normalização prévia, observou-se proporções muito diferentes entre as proporções esperadas 1:1 e os resultados observados, variando de 1:0,37 para o bloco 2 da MSP-1 até 1:4,47 para o marcador MS06. Portanto, a ausência de equivalência de detecção entre as variantes pode indicar que vieses de amplificação devem estar interferindo na titulação do resultado final. Para corrigir estas diferenças na amplificação, os dados de fluorescência foram normalizados após amplificação e detecção dos fragmentos amplificados. Após normalização, foi observada uma alta correspondência entre os valores observados e os esperados. De maneira geral, tanto para as misturas artificiais de fragmentos clonados quanto para as misturas de DNAs genômicos o mesmo perfil de amplificação e detecção preferencial de alelos de menor tamanho

foi observado para os MS e TR. Além disso, a titulação das misturas foi observada para os dois blocos da MSP-1. Para MSP-3 α , não houve amplificação preferencial do alelo menor ou titulação das misturas. Portanto, a concordância observada entre os experimentos reforça nossas conclusões da primeira parte do trabalho de que o MS06 e os blocos 2 e 10 da MSP-1 são os marcadores mais indicados para detecção de infecções múltiplas.

Para o *locus* MN21 não foi possível realizar os experimentos de misturas artificiais de DNA genômico, porque não foram identificadas, entre os DNAs que apresentavam parasitemia e número de leucócitos similares, amostras que diferissem entre si nesse locus. Esse resultado indica que, se presente, as diferentes cepas que infectavam os pacientes selecionados possivelmente apresentavam o mesmo alelo para o *locus* MN21. Ocorrências como esta podem subestimar as infecções múltiplas, diante da variabilidade genética limitada de certos *loci* nas populações naturais do parasito (KOEPLI *et al.*, 2009; SCHALL e DENIS, 2012). Embora não tenha sido observada variabilidade genética no *locus* MN21 entre as amostras disponíveis para as misturas de DNA genômico, um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando amostras de diferentes regiões do Brasil, mostrou uma alta variabilidade dentro das populações do parasito, com elevados valores de heterozigosidade esperada virtual (H_E) - probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente sejam diferente um do outro - para esse *locus*, que variou entre 0,56 a $0,84 \pm 0,111$ (REZENDE *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que a caracterização da infecção por *Plasmodium* depende da acurácia do método de genotipagem, do tipo de marcador molecular e do número de *loci* analisados (GREENHOUSE *et al.* 2006; HAVRYLIUK *et al.* 2008). Neste estudo foi utilizada a técnica de genotipagem por eletroforese capilar, indicada por ser um método altamente adequado para genotipagem de *P. vivax* (KOEPLI *et al.*, 2011 a e b) se comparado a outras técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de fragmentos (PCR- RFLP) que é uma técnica confiável e barata, mas trabalhosa e demorada (KOEPLI *et al.*, 2009). Além disso, por ser uma técnica de baixa resolução, a PCR-RFLP parece não ser eficiente para detectar infecções múltiplas (KOEPLI *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011). Já o sequenciamento de Sanger, apesar de apresentar uma resolução muito maior que as duas técnicas anteriores, não é apropriado para infecções

múltiplas (KOEPLI *et al.*, 2009). Para *P. falciparum*, a utilização de novas tecnologias de sequenciamento para fazer genotipagem de variantes está mais bem estabelecida. Como exemplo, a técnica de pirosequenciamento mostrou-se eficiente na quantificação de diferentes variantes em infecções múltiplas (JULIANO *et al.*, 2010). O sequenciamento de nova geração também tem mostrado alta resolução para determinação destas infecções, desempenhando um papel importante em estudos de eficácia de drogas, diversidade populacional de parasitas (AUBURN *et al.*, 2012; ASSEFA *et al.*, 2014), dinâmica de infecção, intensidade de transmissão ou patogenia (ASSEFA *et al.*, 2014). Embora aplicáveis estas novas tecnologias podem não ser viáveis pelo elevado custo e falta de recursos humanos para as análises de resultados. Desta forma, pode se inferir que a genotipagem por eletroforese capilar é um método mais adequado e apropriado para a caracterização molecular de *Plasmodium*.

Dois grupos de marcadores moleculares, neutros e não neutros, são comumente usados para analisar populações naturais de *P. vivax*. Para este estudo, foram selecionados seis marcadores moleculares para aumentar a possibilidade de detecção de diferentes variantes do parasito presente em uma infecção num mesmo indivíduo. Tornou-se cada vez mais importante a definição de um número mínimo de marcadores moleculares para determinação das infecções múltiplas já que no estudo anterior (HAVRYLIUK; FERREIRA, 2009) foi mostrado que um número mínimo de onze microssatélites foi capaz de identificar cem por cento das infecções múltiplas. Em um estudo mais recente a quantidade sugerida foi de 4 marcadores para detecção de todas as infecções, dentre os quais dois foram incluídos nesse estudo (DE ARAUJO *et al.*, 2012).

Após a análise da *performance* dos seis marcadores nas misturas artificiais, a eficiência de detecção de infecções múltiplas para os mesmos marcadores foi avaliada em amostras de campo, isto é, em amostras provenientes de indivíduos infectados por *P. vivax* de diferentes áreas endêmicas para malária no Brasil. Para isso, foram realizadas as genotipagens dos seis *loci* de 47 amostras de pacientes. O MS06 mostrou maior capacidade de detecção das infecções, principalmente considerando o critério 2 (1/4) enquanto que a MSP-1B2 foi pouco eficiente em detectar estas infecções. Mostrando, mais uma vez, que critérios rigorosos podem diminuir a detecção de infecções múltiplas. Mas, neste caso como o número de variantes é desconhecido e devido à possibilidade de ocorrência de artefatos na

PCR ou no instrumento de capilaridade, a aplicação de um critério mais rigoroso para detecção do alelo menos abundante pode evitar uma superestimativa do número de alelos nas infecções. Desta forma, deve-se ter cautela na identificação do alelo raro, pois a formação de artefatos é comum principalmente na amplificação de microssatélites (VARDO-ZALIK *et al.*, 2009).

Ao selecionar amostras cuja multiplicidade de infecção já havia sido previamente identificada por algum marcador molecular, cinco marcadores moleculares foram suficientes para detectar todas as infecções múltiplas. Cerca de 45% das infecções múltiplas foram detectadas por apenas um dos marcadores. Os marcadores MS06 e MSP-1B10 juntos detectaram mais de 70% das infecções. Estes dados sugerem que os marcadores selecionados são polimórficos e apropriados para determinação das infecções múltiplas.

Considerando o critério 2 (1/4) de seleção do alelo menos abundante, o MS06 apresentou um aumento de 11% na detecção de infecções múltiplas para os isolados de campo e 9% para as infecções múltiplas artificiais de clones. A partir dos nossos dados, sugere-se que o critério 2 seja o mais adequado para caracterização de infecções múltiplas em amostras clínicas. Entre os métodos utilizados (infecções múltiplas artificiais e genotipagem de isolados de campo), o marcador MS06 apresentou como o melhor marcador na detecção das infecções múltiplas.

A proteína de superfície do merozoito (MSP-3 α) foi imprecisa para determinar infecções múltiplas, tanto nas infecções artificiais quanto nas análises de isolados de campo. Estes resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, pela baixa diversidade genética atribuída a esse *locus* por um estudo anterior com amostras do Brasil. A diversidade genética foi medida com base na hererogozidade virtual esperada (H_E), que variou entre 0,21-0,34 nas populações do parasito de diferentes regiões do país (RIBEIRO *et al.*, 2011). No presente estudo apenas 18% de infecções múltiplas foram detectadas pela MSP-3 α em amostras cuja multiplicidade já havia sido previamente identificada por outros marcadores. Diversos estudos foram realizados avaliando a variabilidade de MSP-3 α em estudos populacionais utilizando isolados de diversas origens geográficas. Um estudo de diversidade alélica de *P. vivax* realizado por Bruce e colaboradores (1999) na Papua Nova Guiné detectou 23% de infecções múltiplas (BRUCE *et al.*, 1999). Em outro estudo realizado por Cui e colaboradores (2003) na Tailândia, em uma área de baixa transmissão, observou 19% dos pacientes com infecções múltiplas (CUI *et al.*

2003b). Veron em 2009 realizou em estudo na Guiana Francesa e detectou uma taxa de 13,8% de infecções mistas (VERON *et al.* 2009). De maneira geral, todos esses estudos encontraram taxas reduzidas de infecção múltipla. Contudo, com base apenas nos dados disponíveis não é possível concluir que estas taxas foram subestimadas devido ao marcador utilizado e/ou o método de genotipagem empregado. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, não se indica o *locus* MSP-3 α em estudos que visam determinar o nível de infecção múltipla.

O bloco 2 da MSP-1 apresentou-se como excelente marcador molecular nas infecções múltiplas artificiais, mas baixa eficiência de detecção do alelo raro nas infecções de amostras de campo. A menor eficiência deste marcador para as amostras clínicas não condiz com o esperado, uma vez que o valor de heterozigidade virtual esperada (H_E) para este marcador para as mesmas regiões estudadas foi elevado (0,813) (DE ARAUJO *et al.*, 2012). Com os dados disponíveis até o momento, não é possível propor uma explicação plausível para o desempenho observado deste marcador na detecção de infecções múltiplas nas amostras de campo. Assim, estudos adicionais serão necessários para esclarecer esta questão.

Bons marcadores moleculares são essenciais para uma melhor compreensão da epidemiologia molecular de *P. vivax*. Para cumprir o objetivo de selecionar marcadores moleculares que sejam mais adequados para a determinação das infecções múltiplas, este estudo propôs três abordagens metodológicas, incluindo misturas artificiais e genotipagens de isolados de campo. Assim, estamos propondo um painel de marcadores considerando aqueles capazes de amplificar e detectar alelos raros nas infecções artificiais, de medir corretamente as proporções definidas nas misturas, além de serem capazes de detectar maior número de infecções múltiplas em amostras de isolados de campo. Este painel é formado por 5 marcadores, sendo 3 neutros (MS06, MS07 e MN21) e dois não neutro (MSP-3 α e MSP-1B10) e deve ser utilizado com critérios menos rígidos para detecção dos alelos raros, como o de $\frac{1}{4}$ da altura do pico predominante.

7 CONCLUSÃO

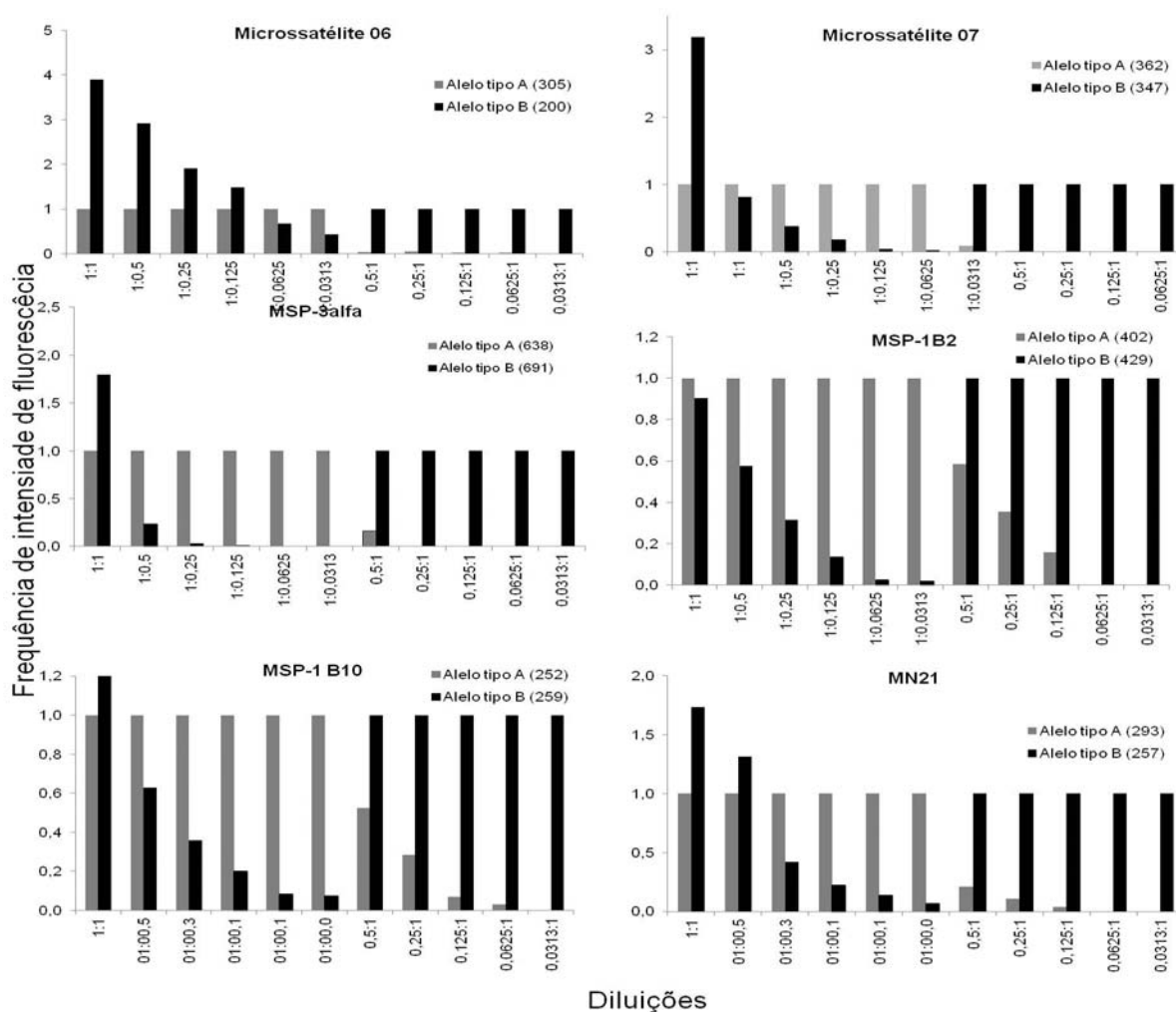
Com este estudo foi possível concluir que:

- ✓ Amplificação preferencial de uma das variantes foi observada, geralmente para as variantes B e parece não ser dependente do plasmídeo no qual a variante foi clonada. Essa amplificação preferencial ocorre de maneira mais intensa para os microssatélites.
- ✓ Na maioria das vezes as proporções observadas foram diferentes das esperadas e após a normalização (baseada na proporção 1:1) a diferença diminuiu, principalmente para os blocos 2 e 10 da MSP-1 e MN21.
- ✓ As titulações das variantes puderam ser observadas quando se diluiu o alelo preferencial para todos os marcadores, mas quando se diluiu o alelo não preferencial a titulação só foi observada para os blocos 2 e 10 da MSP-1 e para MN21.
- ✓ Além disso, ao se aplicar os critérios de restrição para detecção do alelo de menor abundância ($1/3$ e $1/4$) houve perda na detecção de alelos raros. Um incremento de 9 a 18% na capacidade de detecção dos alelos raros foi observado quando se considerou o critério mais flexível ($1/4$). Assim, para todas as abordagens observa-se que ao restringir os critérios de detecção do alelo raro, diminui a eficiência de detecção deste alelo nas infecções múltiplas.
- ✓ Quando se investiga em conjunto todos os *loci* para cada diluição é possível observar que em proporções em que os dois alelos estão em concentrações mais similares os marcadores moleculares apresentam maior eficiência de detecção das infecções múltiplas, ou seja quando o alelo raro é 10 vezes menos concentrado que o alelo predominante ele é dificilmente detectado .
- ✓ Resultados similares foram obtidos com ou sem a clonagem dos fragmentos. Nas misturas artificiais de DNA genômico também se observam que para a maioria dos marcadores ocorreu amplificação e detecção nos pontos de maior concentração das curvas.
- ✓ Nas genotipagens de todas as amostras dos isolados de *P. vivax* dois marcadores não foram eficientes na detecção do alelo raro nas infecções múltiplas. Considerando as 22 amostras cuja multiplicidade de infecção já foi

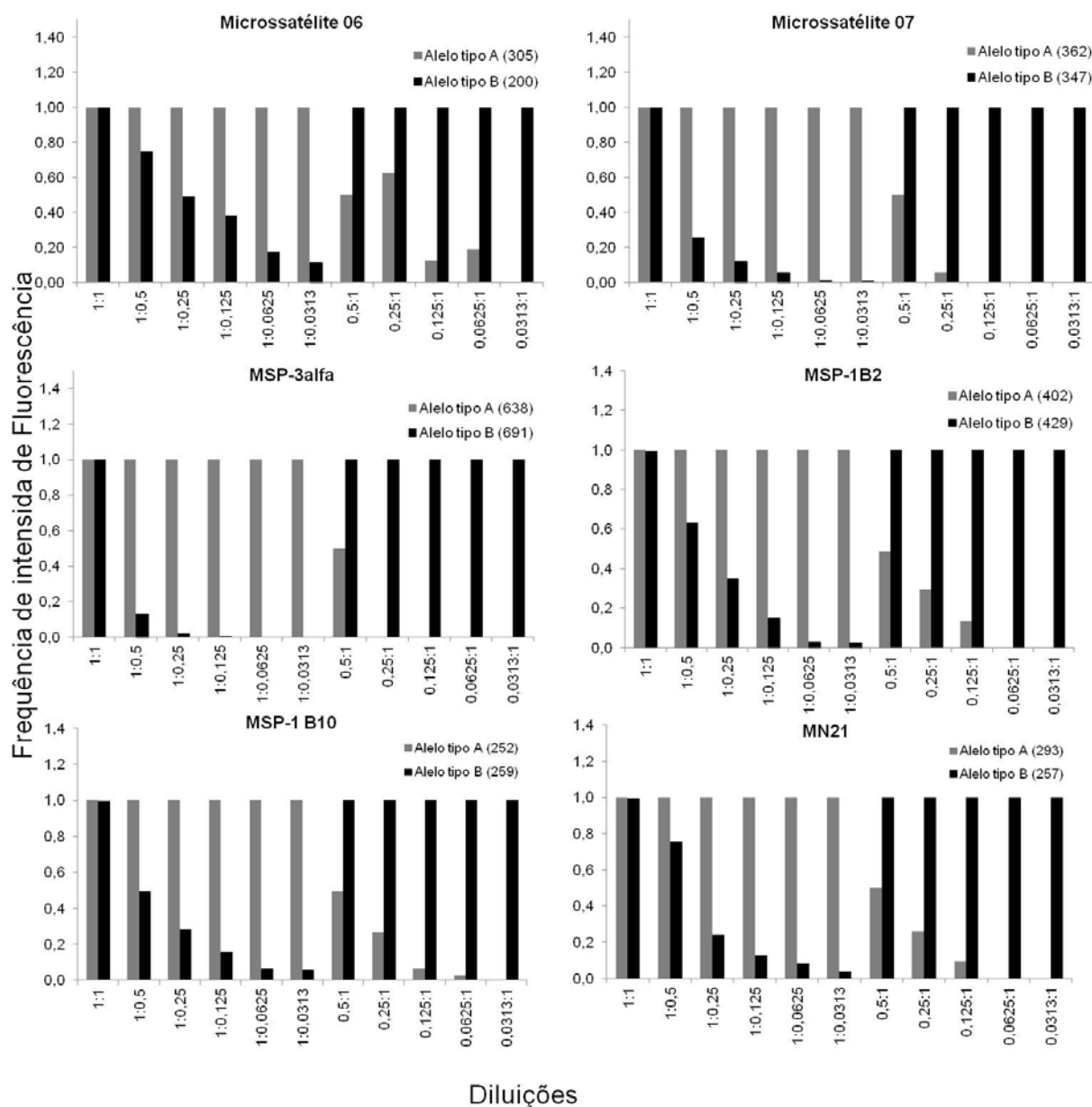
previamente identificada, cinco marcadores foram necessários para detecção de 100% das infecções múltiplas (MS06, MS07, MSP-3 α , MSP-1B10 e MN21).

- ✓ Assim, estamos propondo a utilização de um painel de 5 marcadores moleculares neutros e não neutros para a detecção de infecções múltiplo-clone, considerando critério de $>1/4$ da altura do pico predominante para identificação do alelo raro.

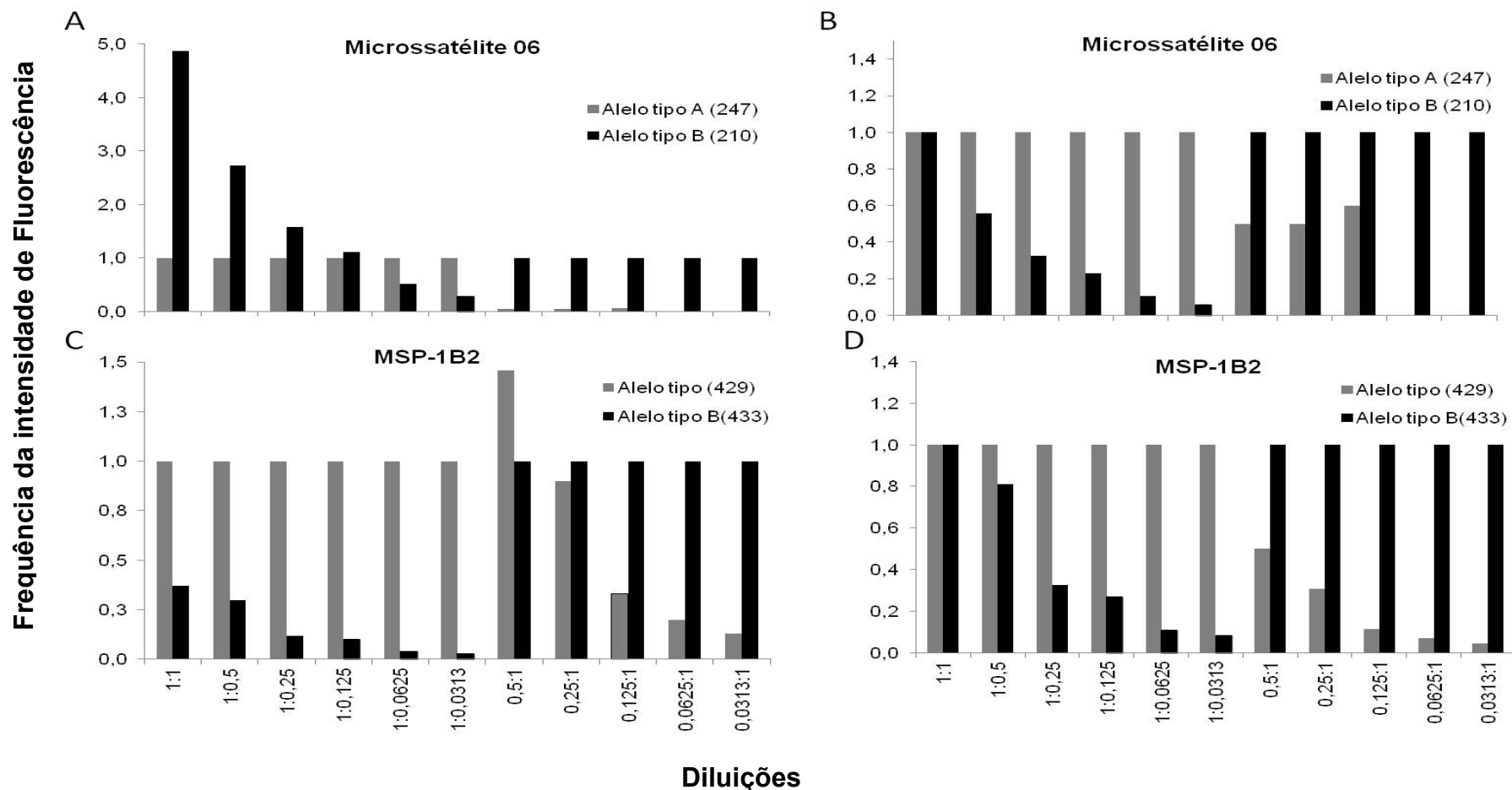
8 Anexos



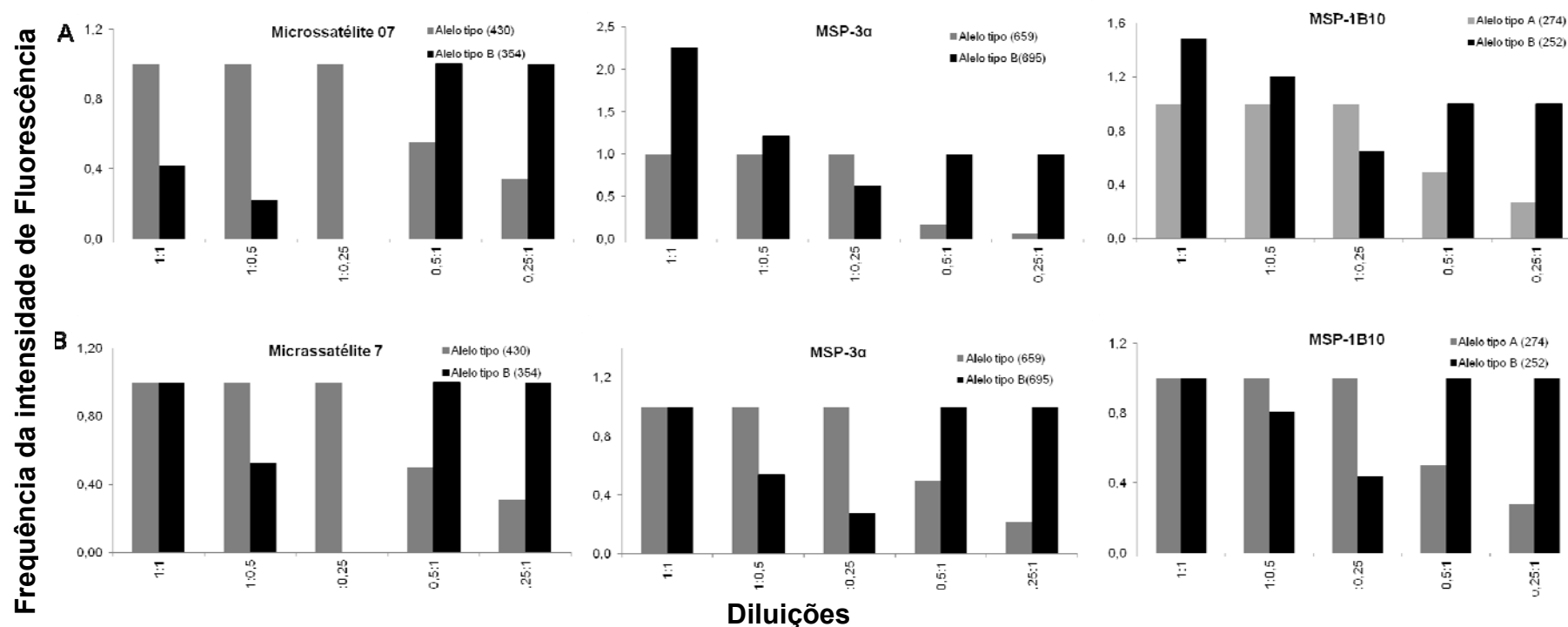
8.1 Anexo 1. Proporções observadas nas misturas artificiais de ambos os alelos para todos os marcadores deste estudo. No eixo X, está indicada as proporções esperadas; no eixo Y, está indicada a proporção de intensidade de fluorescência observada. As barras em cinza representam as proporções observadas para o alelo A, e em preto, as proporções observadas para o alelo B.



8.2 Anexo 2. Proporções normalizadas nas misturas artificiais de ambos os alelos para todos marcadores moleculares. No eixo X, está indicada as proporções esperadas; no eixo Y, está indicada a proporção de intensidade de fluorescência observada. As barras em cinza representam as proporções observadas para o alelo A, e em preto, as proporções observadas para o alelo B.



8.3 Anexo 3. Proporções das misturas artificiais de pacientes para os marcadores moleculares MS06 e MSP-1B2. As barras em cinza representam as proporções observadas para o alelo A, e em preto, as proporções observadas para o alelo B. Os gráficos não normalizados estão representados em A e C e os normalizados em B e D.



8.4 Anexo 4. Proporções das misturas artificiais de pacientes para os marcadores moleculares (MS07, MSP-3α e MSP-1B10) As barras em cinza representam as proporções observadas para o alelo A, e em preto, as proporções observadas para o alelo B. (A) representa os gráficos não normalizados e (B) normalizados. Foram utilizados as diluições de 1:1, 1:0,5, 1:0,25, 0,5:1 e 0,25:1.

Paciente	MS6	MS7	MSP1B10	MN21	MSP3alfa	MSP1B2	Detecção original da infecção múltipla ¹
PA 17	247	118/370/373	246/258	254	659/700	402	MS4, MS1
MT1172	209/305	367	240/289/291	254/290	650	294/460	MS2
AM21	147/203/209	352/355	258/306	290	640/669	399	MS4, MS11, MS9, MS10, MS2, MS3
AM 13	197	352/355	208/244	280/292	694/713	402/429	MS4, MS11
MT 1136	209	358/370	252/258/291	255	628	402/429	MS1, MS4,MS5, MS11
MT1340	203/305	364	226	266/290	669	414	MS1,MS4, MS4
MT1195	209/305	352	246	254/290	640	402	MS1,MS2, MS4, MS5, MS6, MS8, MS11
PA 14	207/211	373	246/258	258	692	400	MS4, MS11
AM22	141/203	436/439	258	290	641	428	MN23
MT1216	203/205	352/355	226/258	254	694	123/414	MS1, MS2, MS8, MS11
MT1201	209	355/388	226	254/290	629	123/460	MS1, MS2,MS8, MS11
MT1169	209	358	237/273	254/290	693	460	MS1, MS8, MS11
AP 16	141/273	355	250	290	650	185/428	MS1, MS11
AM14	243/257	355	208	280	692	402	MS4
MT1138	141/209	358	256	256	600/610/671	416	MS11
Mt101	209	350/375/399	226	254	650	429	MN23
PA15	248	361	208/244	270	650	402	MS1
MT1132	209	352/370	246/291	254	692	429	MS4,MS5
MT1135	209	361/364	224/244/291	268	629	412	MS11,MS8
MT1127	209/305	352	245	225/256/275	669	669	MS4, MS9
AP 17	274/306	355	224	255/292	651	428	MS11, MS1
MT1336	209	349	252/273	255	601/627	123/413	MS1,MS5

8.5 Anexo 5. Identificação das infecções múltiplas pelos seis marcadores moleculares deste estudo em amostra cuja de infecção já foi previamente identificada. Em vermelho mostra quando a multiplicidade foi detectada por pelo menos 2 marcadores em nosso estudo. Em cinza, quando foi detectado por somente um marcador. A última coluna indica por quais marcadores as infecções foram previamente identificadas. As infecções múltiplas não consideradas neste quadro (escrita vermelha), não passaram pelos critérios de corte de ¼. 1- Detecção previa realizada por (REZENDE, 2009; DE ARAUJO, 2012).

9 REFERÊNCIAS

ALANO, P. ***Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life.** Molecular Microbiology. 2007, 66: 291–302.

AMINO, R; THIBERGE, S; MARTIN, B; CELLI, S; SHORTE, S; FRISCHKNECHT, F; MÉNARD, R; **Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal.** Nat Med. 2006 Feb; 12(2):220-4.

ANDERSON, T.J.C., SU, X.Z., BOCKARIE, M., LAGOG, M., DAY, K.P., 1999. **Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples.** Parasitology 119, 113–125.

ANDERSON TJ, SU XZ, RODDAM A, DAY KP. **Complex mutations in a high proportion microsatellite loci from the protozoan parasite *Plasmodium falciparum*.** Mol Ecol. 2000a Oct;9(10):1599-608.

ANDERSON TJ, HAUBOLD B, WILLIAMS JT, ESTRADA-FRANCO JG, RICHARDSON L, MOLLINEDO R, BOCKARIE M, MOKILI J, MHARAKURWA S, FRENCH N, WHITWORTH J, VELEZ ID, BROCKMAN AH, NOSTEN F, FERREIRA MU, DAY KP. **Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** Mol Biol Evol. 2000b Oct;17(10):1467-82.

AIKAWA, M., MILLER, L. H., JOHNSON, J. AND RABBEGE, J. (1978). **Erythrocyte entry by malarial parasites: a moving junction between erythrocyte and parasite.** J. Cell Biol.77, 72-82.

ARNOTT A, BARRY AE, REEDER JC. **Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination.** Malar J. 2012 Jan 10;11:14.

AUBURN S, CAMPINO S, MIOTTO O, DJIMDE AA, ZONGO I, MANSKE M, MASLEN G, MANGANO V, ALCOCK D, MACINNIS B, ROCKETT KA, CLARK TG, DOUMBO OK, OUÉDRAOGO JB, KWIATKOWSKI DP. **Characterization of within-host *Plasmodium falciparum* diversity using next-generation sequence data.** PLoS One. 2012;7(2):e32891.

ÁVILA SLM. **Malária.** In: Ferreira, Antonio Walter (Ed.). Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996:157 - 158.

BARNWELL, JW; GALINSKI, MR; **Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes.** In: IW Sherman, Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington DC: ASM Press: 1998. Cap.7. P. 93-120.

BATTLE, K.E., GETHING, P.W., ELYAZAR, I.R.F., MOYES, C.L., SINKA, M.E., HOWES, R.E., GUERRA, C.A., PRICE, R.N., BAIRD, J.K. AND HAY, S.I. (2012). **The global public health significance of *Plasmodium vivax***. *Advances in Parasitology*, 80:1-111.

BRETSCHER MT, VALSANGIACOMO F, OWUSU-AGYEI S, PENNY MA, FELGER I, SMITH T. **Detectability of *Plasmodium falciparum* clones**. *Malar J*. 2010 Aug 18;9:234.

BRITO CF, FERREIRA MU. **Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax***. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:12-26.

BRUCE, MC; GALINSKI, MR; BARNWELL, JW; SNOUNOU, G; DAY, KP;. **Polymorphism at the merozoite surface protein-3 alpha locus of *Plasmodium vivax***: Global and local diversity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 61(4):518-25.

BEN-AMI F, ROUTTU J. **The expression and evolution of virulence in multiple infections**: the role of specificity, relative virulence and relative dose. *BMC Evol Biol*. 2013 May 3;13:97. doi: 10.1186/1471-2148-13-97.

BRUCE MC, GALINSKI MR, BARNWELL JW, DONNELLY CA, WALMSLEY M, ALPERS MP, WALLIKER D, DAY KP. **Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea**. *Parasitology*. 2000 Sep;121 (Pt 3):257-72.

CAMARGO, LM.; FERREIRA, UM.; KRIEGER, H.; DE CAMARGO, EP.;, DA SILVA LP. **Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil)**: epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Jul; 51(1):16-25. PubMed PMID: 8059911.

CAMERON A, REECE SE, DREW DR, HAYDON DT, YATES AJ. **Plasticity in transmission strategies of the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi***: environmental and genetic effects. *Evol Appl*. 2013 Feb;6(2):365-76.

CARLTON JM, ADAMS JH, SILVA JC, *et al*. CM 2008. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757-763.

CHEN, Q; WANG, H;. **Implications of imaging malaria sporozoites**. *Trends in Parasitology*. 2008;24(3):106-9.

CRISTIANO, FA.; P/REZ, M.A.; NICHOLLS, RS.; GUERRA, A.P. **Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp3 α gene in field samples from Tierralta, Colombia**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.103, p.493-496, 2008.

COLBORN JM, KOITA OA, CISSÉ O, BAGAYOKO MW, GUTHRIE EJ, KROGSTAD DJ. **Identifying and quantifying genotypes in polyclonal infections due to single species**. *Emerg Infect Dis*. 2006 Mar;12(3):475-82

- COLEMAN RE, MANEECHAI N, RACHAPAEW N, KUMPITAK C, SOYSENG V, MILLER RS, THIMASARN K, SATTABONGKOT J. **Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand.** Am J Trop Med Hyg. 2002 Apr;66(4):379-83. PubMed PMID: 12164291.
- COLLINS WE, Jeffery GM. ***Plasmodium ovale*: parasite and disease.** Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):570-81.
- COX-SINGH J, DAVIS TM, LEE KS, SHAMSUL SS, MATUSOP A, RATNAM S, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** Clin Infect Dis 2008 Jan 15; 46(2): 165-71.
- CUI L, ESCALANTE AA, IMWONG M, SNOUNOU G. **The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations.** Trends Parasitol. 2003a May;19(5):220-6. Review
- CUI, L.; MASCORRO, C. N.; FAN, Q.; RZOMP, K. A.; KHUNTIRAT, B.; ZHOU, G.; CHEN, H.; YAN, G.; SATTABONGKOT, J.; **Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand.** Am J Trop Med Hyg. V. 68 (5): p. 613-619, 2003b.
- DE ARAUJO FC, DE REZENDE AM, FONTES CJ, CARVALHO LH, ALVES DE BRITO CF. **Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection.** PLoS One. 2012;7(11):e49871.
- DE SOUZA-NEIRAS WC, DE MELO LM, MACHADO RL. **The genetic diversity of *Plasmodium vivax*--a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(3):245-54. Review.
- DEL PORTILLO, HA; LONGACRE, S; KHOURI, E; DAVID, PH. 1991. **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 May 1; 88(9): 4030–4034. PMCID: PMC51587
- DE ROODE JC, HELINSKI ME, ANWAR MA, READ AF. **Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections.** Am Nat. 2005 Nov;166(5):531-42.
- DVORAK, J. A., MILLER, L. H., WHITEHOUSE, W. C. AND SHIROISHI, T. (1975). **Invasion of erythrocytes by malaria merozoites.** Science 187, 748-750.
- ESPINOSA AM, SIERRA AY, BARRERO CA, CEPEDA LA, CANTOR EM, LOMBO TB, GUZMÁN F, AVILA SJ, PATARROYO MA. **Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments.** Vaccine. 2003 Mar 7;21(11-12):1033-43.

- FAROOQ U, MALLA N, DUBEY ML 2009. **Polymorphism in merozoite surface protein-1 gene in north and northwest Indian field isolates of *Plasmodium vivax***. *Indian J Med Res* 130: 736-741.
- FENG, XR; CARLTON, JM; JOY, DA; MU, JB; FURUYA, T; SUH, BB; *et al.*; **Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax***. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Jul;100(14):8502-7.
- FERREIRA, UM; KARUNAWEERA, ND; DA SILVA-NUNES, M; DA SILVA, NS; WIRTH, DF; HARTL, DL; **Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural. Amazonia.** *J Infect Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1218-26.
- FIGTREE M, PASAY CJ, SLADE R, CHENG Q, CLOONAN N, WALKER J, SAUL A. ***Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes.** *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Apr 30;108(1):53-66.
- FORD AF, VARDO-ZALIK AM, SCHALL JJ. **Relative clonal density of malaria parasites in mixed-genotype infections: validation of a technique using microsatellite markers for *Plasmodium falciparum* and *P. mexicanum*.** *J Parasitol.* 2010 Oct;96(5):908-13.
- GALINSKI MR, CORREDOR-MEDINA C, POVOA M, CROSBY J, INGRAVALLO P, BARNWELL JW 1999. ***Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain.** *Mol Biochem Parasitol* 1011: 131-147.
- GREENWOOD B. 2002. **The molecular epidemiology of malaria.** *Tropical Medicine and International Health* 7 (12): 1012-1021.
- GREENHOUSE, B., A. MYRICK, C. DOKOMAJILAR, J. WOO, E. CARLSON *et al.*, 2006 **Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections.** *Am J Trop Med Hyg* 75: 836-842.
- GREENHOUSE B, DOKOMAJILAR C, HUBBARD A, ROSENTHAL PJ, DORSEY G. **Impact of transmission intensity on the accuracy of genotyping to distinguish recrudescence from new infection in antimalarial clinical trials.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Sep;51(9):3096-103.
- GREENWOOD, B. M., D. A. FIDOCK, D. E. KYLE, S. H. I. KAPPE, P. L. ALONSO *et al.*, 2008 **Malaria: progress, perils, and prospects for eradication.** *Journal of Clinical Investigation* 118: 1266-1276.
- GREENWOOD, BM; BOJANG, K; WHITTY, CJ; TARGETT, GA;. **Malaria.** *Lancet.* 2005 Apr 23-29;365(9469):1487-98. Review.
- GUERRA CA, HOWES RE, PATIL AP, GETHING PW, VAN BOECKEL TP, TEMPERLEY WH, KABARIA CW, TATEM AJ, MANH BH, ELYAZAR IR, BAIRD JK, SNOW RW, HAY SI. **The international limits and population at risk of**

***Plasmodium vivax* transmission in 2009.** PLoS Negl Trop Dis 2010 Aug 3; 4(8): e774.

GUNAWARDENA S, KARUNAWEERA ND, FERREIRA MU, PHONE-KYAW M, POLLACK RJ, ALIFRANGIS M, RAJAKARUNA RS, KONRADSEN F, AMERASINGHE PH, SCHOUSBOE ML, GALAPPATHTHY GN, ABEYASINGHE RR, HARTL DL, WIRTH DF. **Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia.** Am J Trop Med Hyg. 2010 Feb;82(2):235-42. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0588. PubMed PMID: 20133999; PubMed Central PMCID:PMC2813164.

HÄNSCHEID T. 2003. **Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria.** *Clinical Microbiology and Infection* 9 (6): 497–504. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00640.x.

HAVRYLIUK, T., and M. FERREIRA, 2009 **A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences.** Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 67-73.

HAVRYLIUK, T., P. ORJUELA-SÁNCHEZ and M. FERREIRA, 2008 ***Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of multiple-clone infections.** Exp Parasitol 120: 330-336.

IMWONG, M., S. NAIR, S. PUKRITTAYAKAMEE, D. SUDIMACK, J. T. WILLIAMS *et al.*, 2007 **Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and south America.** International Journal for Parasitology 37: 1013-1022.

HICKS ND, Schall JJ. **Establishment efficiency among clones of the malaria parasite, *Plasmodium mexicanum*, for mixed-clone infections in its natural lizard host.** J Parasitol. 2013 Dec;99(6):1050-5.

HOFFMAN JI, NICHOLS HJ. **A novel approach for mining polymorphic microsatellite markers *in silico*.** PLoS One. 2011;6(8):e23283. doi: 10.1371/journal.pone.0023283. Epub 2011 Aug 10. PubMed PMID: 21853104; PubMed Central PMCID: PMC3154332.

HOLDER AA, BLACKMAN MJ, BURGHAUS PA, CHAPPEL JA, LING IT, MCCALLUM-DEIGHTON N, SHAI S. **A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.87, p.37-42, 1992.

IMWONG, M., S. NAIR, S. PUKRITTAYAKAMEE, D. SUDIMACK, J. T. WILLIAMS *et al.*, 2007 **Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and south America.** International Journal for Parasitology 37: 1013-1022.

JEFFREYS, AJ.; WILSON, V.; THEIN, SL. **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.** Nature. 1985 Mar 7-13;314(6006):67-73. PubMed PMID: 3856104.

JOBIM, L. F.; JOBIM M. R.; BRENNER, C. **Identificação Humana pelo DNA: Investigação de Paternidade e Análise de Casos Forense.** in: Identificação

Humana, Tochetto, D. – coord., Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1999. Parte IV, p.237-303.

JOSHI, H., S. PRAJAPATI, A. VERMA, S. KANG'A and J. CARLTON, 2008 ***Plasmodium vivax* in India**. Trends Parasitol 24: 228-235.

JULIANO JJ, PORTER K, MWAPASA V, SEM R, ROGERS WO, ARIEY F, WONGSRICHANALAI C, READ A, MESHNICK SR. **Exposing malaria in-host diversity and estimating population diversity by capture-recapture using massively parallel pyrosequencing**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 16;107(46):20138-43.

KIM SH, HWANG SY, SHIN JH, MOON CS, KIM DW, KHO WG 2009. **Molecular genetic characterization of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax* from reemerging Korean isolates**. Clin Vaccine Immunol 16: 733-738

KOEPFLI, C., I. MUELLER, J. MARFURT, M. GOROTI, A. SIE *et al.*, 2009 **Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials**. J Infect Dis 199: 1074-1080.

KOEPFLI C, SCHOEPFLIN S, BRETSCHER M, LIN E, KINIBORO B, ZIMMERMAN PA, SIBA P, SMITH TA, MUELLER I, FELGER I. **How much remains undetected? Probability of molecular detection of human Plasmodia in the field**. PLoS One. 2011b Apr 28;6(4):e19010.

KOLAKOVICH KA, SSENGOBA A, WOJCIK K, TSUBOI T, AL-YAMAN F, ALPERS M, ADAMS JH. ***Plasmodium vivax*: favored gene frequencies of the merozoite surface protein-1 and the multiplicity of infection in a malaria endemic region**. Exp Parasitol. 1996 Jun;83(1):11-9.

KROTOSKI, WA;. **Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse**. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(1):1-11.

LACERDA, MV.; MOURÃO, MP.; ALEXANDRE, MA.; SIQUEIRA, AM.; MAGALHÃES, BM.; MARTINEZ-ESPINOSA, FE.; FILHO, F.S.; BRASIL, P.; VENTURA, A.M.; TADA, M.S.; COUTO, V.S.; SILVA, A.R.; SILVA, R.S.; Alecrim MG. **Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature**. Malar J. 2012 Jan 9;11:12. doi: 10.1186/1475-2875-11-12. Review. PubMed PMID: 22230294; PubMed Central PMCID: PMC3268102.

LECLERC MC, DURAND P, GAUTHIER C, PATOT S, BILLOTTE N, MENEGON M, SEVERINI C, AYALA FJ, RENAUD F. **Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax***. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5;101(40):14455-60. Epub 2004 Aug 24. PubMed PMID: 15328406; PubMed Central PMCID: PMC521958.

LEITE, R. M. R. **Resposta de anticorpos IgG contra a região C-terminal da proteína 1 da superfície de merozoítos de *Plasmodium vivax* em indivíduos que**

residem em áreas de transmissão de malária no estado do Pará. 2007 Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

LEVINSON, G; GUTMAN, GA; **Slipped-Strand Mismatching - A Major Mechanism For Dna-Sequence Evolution.** *Molecular Biology and Evolution.* 1987;4(3):203-21.

LILJANDER A, BEJON P, MWACHARO J, KAI O, OGADA E, PESHU N, MARSH K, FÄRNERT A. **Clearance of asymptomatic *P. falciparum* infections interacts with the number of clones to predict the risk of subsequent malaria in Kenyan children.** *PLoS One.* 2011 Feb 24;6(2):e16940.

MACKINNON MJ, Gaffney DJ, Read AF. **Virulence in rodent malaria: host genotype y parasite genotype interactions.** *Infect Genet Evol.* 2002 Jul;1(4):287-96.

MARQUES, AC. **Migration and dissemination of malaria in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986 81(2): 17-30

MEIS JFGM, VERHAVE JP. **Exoerythrocytic development of malaria parasites.** *Advances in Parasitology*, 1988; 27: 1– 61.

MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER, R. **The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, 64:97-106.

MILLER LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. **The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks.** The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 1976 Aug 5;295(6):302-4.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):673-9. Review. PubMed PMID: 11832955.

MOODY A. & CHIODINI P. 2000. **Methods for the detection of blood parasites.** *Clin Lab Haematol.* **22** : 189-201.

MOODY A. 2002. **Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites.** *Clinical Microbiology Reviews:* 66–78. DOI: 10.1128/CMR.15.1.66–78.2002.

MOORE, SA; SURGEY, EG; CADWGAN, AM. **Malaria vaccines: where are we and where are we going?** *Lancet Infect Dis.* 2: 737-743, 2002.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. **Migration through host cells by apicomplexan parasites.** *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 3, n. 13, p. 1123-8, nov. 2001.

MOTA MM, PRADEL G, VANDERBERG JP, HAFALLA JC, FREVERT U, NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V, RODRÍGUEZ A. **Migration of *Plasmodium sporozoites* through cells before infection.** *Science.* 2001 Jan 5;291(5501):141-4.

- MOTA, M. M.; HAFALLA, J. C. R.; RODRIGUEZ, A. **Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection.** Nature medicine, v. 8, n. 11, p. 1318-22, nov. 2002.
- MOUCHET J., PIERRE C., MARC C., JEAN J., SYLVIE M., DOMINIQUE RL., JACQUES S. 2004. **Biodiversité du paludisme dans le monde.** Éditions John Libbey Eurotext: 22-155: ISBN 2-7420-0452-1.
- MUELLER, I; GALINSKI, MR; BAIRD, JK; CARLTON, JM; KOCHAR, DK; ALONSO, PL; DEL PORTILLO, HA; **Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite.** Lancet Infect Dis 2009, 9:555-566.
- MUTIS MCS, MARTINEZ-ESPINOSA FE, ALBUQUERQUE BC, *et al.* **Malária.** In: COURA JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; c2005. p. 833-58 Gomes AP. **Malária grave.** J Bras Med. 2000; 79(5/6):68-76. Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation and malaria. Microcirculation. 2008;15(2):81-107.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J; LACERDA, MV; BRASIL, P; LADISLAU, JL; TAUIL, PL; DANIEL-RIBEIRO, CT.2010. **Malaria in Brazil: an overview.** Malar J 9: 115.
- ONG CW, LEE SY, KOH WH, OOI EE, TAMBYAH PA. **Monkey malaria in humans: a diagnostic dilemma with conflicting laboratory data.** Am J Trop Med Hyg 2009 Jun; 80(6): 927-8.
- PIZARRO JC, CHITARRA V, VERGER D, HOLM I, PTRES S, DARTEVELLE S, NATO F, LONGACRE S, BENTLEY GA. **Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1- 19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate.** Journal of Molecular Biology., v.328, p.1091-1103, 2003.
- PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, SAKIHAMA N, FERREIRA M, KHO W, KANEKO A, KANBARA H, HATTORI T, TANABE K 2002. **Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus.** Proc Natl Acad Sci USA 99: 16348-16353.
- RAYNER, J. C.; CORREDOR, V.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; IDERABDULLAH, F.; GALINSKI, M. R.; BARWELL, F.W. **Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 alpha is limited to specific domins.** Parasitology. V. 125 (5): p. 393-405, 2002.
- RASKIN S. **Investigação de paternidade: manual prático do DNA.** 1ª Edição. Curitiba(PR): Juruá; 1998.
- READ AF, TAYLOR LH. **The ecology of genetically diverse infections.** Science. 2001 May 11;292(5519):1099-102. Review.
- REZENDE, A. M.; E. TARAZONA-SANTOS, A. D.; COUTO, C. J. FONTES, J. M. DE SOUZA *et al.*, 2009 **Analysis of genetic variability of *Plasmodium vivax* isolates**

from different Brazilian Amazon areas using tandem repeats. *Am J Trop Med Hyg* 80: 729-733.

REZENDE, A. M., 2009 **Estudo da variabilidade genética de isolados de *Plasmodium vivax* de áreas endêmicas na Amazônia Brasileira**, pp. in Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências das Saúde. Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte.

REZENDE, A. M. E.; TARAZONA-SANTOS, C. J.; FONTES, J. M.; SOUZA, L. H.; CARVALHO *et al.*, 2010 **Microsatellite loci: Determining the genetic variability of *Plasmodium vivax***. *Tropical medicine and international health* (Print).

RIBEIRO RS, LADEIRA L, REZENDE AM, FONTES CJ, CARVALHO LH, BRITO CF. **Analysis of the genetic variability of PvMSP-3 α among *Plasmodium vivax* in Brazilian field isolates**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:27-33.

ROBINSON T, CAMPINO SG, AUBURN S, *et al.* **Drug-resistant genotypes and multi-clonality in *Plasmodium falciparum* analysed by direct genome sequencing from peripheral blood of malaria patients**. *PLoS One*. 2011;6(8):e23204.

ROUSE P, MKULAMA MA, THUMA PE, MHARAKURWA S. **Distinction of *Plasmodium falciparum* recrudescence and re-infection by MSP2 genotyping: a caution about unstandardized classification criteria**. *Malar J*. 2008 Sep 23;7:185.

SINGH, B., L. KIM SUNG, A. MATUSOP, A. RADHAKRISHNAN, S. S. SHAMSUL *et al.*, 2004 **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings**. *Lancet* 363: 1017-1024.

SHANKS GD, WHITE NJ. **The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases**. *Lancet Infect Dis*. 2013 Oct;13(10):900-6.

SNOUNOU G., VIRIYAKOSOL S., ZHU X., JARRA W., PINHEIRO L., DO ROSARIO V., THAITHONG S. & BROWN K. N. 1993. **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction**. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61: 315- 320.

SHLOTTER C. **The evolution of molecular markers just a matter of fashion?** *Nat Rev Genet*. 2004; 5:63-69.

SINNISS, P., and SIM, B. K. L. 1997. **Cell invasion by the vertebrate, 1154–1165. stages of *Plasmodium***. *Trends in Microbiology* 5, 52–58.

SINNIS, P; COPPI, A;. **A long and winding road: The *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host** *Parasitology International*, 2007; 3: 171-178.

STURM, A; AMINO, R; VAN DE SAND, C; REGEN, T; RETZLAFF, S; RENNENBERG, A; KRUEGER, A; POLLOK, JM; MENARD, R; HEUSSLER, VT. **Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids**. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.

- SVS, Secretaria de Vigilância à Saúde, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2001.
- SVS, Secretaria de Vigilância à Saúde, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2003.
- SVS, Secretaria de Vigilância à Saúde, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2007.
- SVS, Secretaria de Vigilância à Saúde, SVS, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2008.
- SVS, Secretaria de Vigilância à Saúde, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2009.
- SVS, Secretaria de Vigilância à Saúde, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2013.
- SUTTON PL. **A call to arms:** on refining Plasmodium vivax microsatellite marker panels for comparing global diversity. Malar J. 2013 Dec 11;12:447.
- TAYLOR LH, Read AF. **Determinants of transmission success of individual clones from mixed-clone infections of the rodent malaria parasite, Plasmodium chabaudi.** Int J Parasitol. 1998 May;28(5):719-25.
- UDOMSANGPETCH, R., O. KANEKO, K. CHOTIVANICH AND J. SATTABONGKOT, 2008. **Cultivation of Plasmodium vivax.** Trends Parasitol 24: 85-88.
- VAN DEN EEDE P, VAN DER AUWERA G, DELGADO C, HUYSE T, SOTO-CALLE VE, GAMBOA D, GRANDE T, RODRIGUEZ H, LLANOS A, ANNÉ J, ERHART A, D'ALESSANDRO U. **Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the Plasmodium vivax population in the Peruvian Amazon.** Malar J. 2010 Jun 3;9:151.
- VARDO AM, SCHALL JJ. **Clonal diversity of a lizard malaria parasite, Plasmodium mexicanum, in its vertebrate host, the western fence lizard: role of variation in transmission intensity over time and space.** Mol Ecol. 2007 Jul;16(13):2712-20.
- VARDO-ZALIK AM, FORD AF, SCHALL JJ. **Detecting number of clones, and their relative abundance, of a malaria parasite (Plasmodium mexicanum) infecting its vertebrate host.** Parasitol Res. 2009 Jul;105(1):209-15.
- VERON V, LEGRAND E, YRINESI J, VOLNEY B, SIMON S, CARME B 2009. **Genetic diversity of msp3 and msp1_b5 markers of Plasmodium vivax in French Guiana.** Malar J 8: 40.
- VLACHOU, D; ZIMMERMANN, T; CANTERA, R; JANSE, CJ; WATERS, AP; KAFATOS, FC. **Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion.** Cell Microbiol. 2004 Jul;6(7):671-85.

VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; RUNN, E.; MENDES, A.; KAFATOS, FC. **The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes.** *Curr Opin Genet Dev* 2006 Aug; 16(4): 384-91.

WACKER MA, TURNBULL LB, WALKER LA, MOUNT MC, FERDIG MT. **Quantification of multiple infections of *Plasmodium falciparum* in vitro.** *Malar J.* 2012 May30;11:180.

WEBER, JL. **Informativeness Of Human (Dc-Da)N.(Dg-Dt)N Polymorphisms.** *Genomics.* 1990;7(4):524-30.

WHITE NJ. ***Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite.** *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15; 46(2): 172-3.

WHITE, NJ. **Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria.** *Malar J.* 2011 Oct 11;10:297. doi: 10.1186/1475-2875-10-297.

WHITE NJ, PUKRITTAYAKAMEE S, HIEN TT, FAIZ MA, MOKUOLU OA, DONDORP AM. **Malaria.** *Lancet.* 2013 Aug 15. pii: S0140-6736(13)60024-0. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23953767.

WHO. 1999a. **New perspectives malaria diagnosis.** Report of a joint WHO/USAID informal consultation WHO/MAL/2000.1091. *World Health Organization.* Geneva.

WHO. 2009. **World Malaria Report 2009.** WHO Global Malaria Programme. *World Health Organization.* Geneva. ISBN 978 92 4 1564106.

WHO, 2008 **World Health Organization, World Malaria Report 2008,** pp., edited by W. H. O. WHO PRESS, Geneva.

WHO, 2011 **World Health Organization, World Malaria Report 2011,** pp., edited by W. H. O. WHO PRESS, Geneva.

WHO,2012, **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** World Malaria Report 2012.

WHO,2013. **World Malaria Report 2013,** Geneva, World Health Organization.

YAMAUCHI, LM; COPPI, A; SNOUNOU, G; SINNIS, P. ***Plasmodium sporozoites* trickle out of the injection site.** *Cell Microbiol.* 2007 May;9(5):1215-22. Epub 2007 Jan 9. Erratum in: *Cell Microbiol.* 2007 Aug;9(8):2093.

ZAKERI S, RAEISI A, AFSHARPAD M, KAKAR Q, GHASEMI F, ATTA H, ZAMANI G, MEMON MS, SALEHI M, DJADID ND 2010. **Molecular characterization of *Plasmodium vivax* clinical isolates in Pakistan and Iran using PvMSP-1, PvMSP-3 alpha and pvcsp genes as molecular markers.** *Parasitol Int* 591: 15-21.

ZAMAN S., TAN L., CHAN H.H., AZIZ L., ABDUL-SAMAT S., WAHID R., KAMAL A., AHMED M. & ZAMAN V. 2001. **The detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in DNA-extracted blood samples using polymerase chain reaction.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 391-397.