

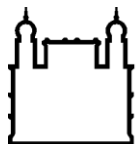
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM
AMOSTRAS DE CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS DE DOIS
DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE

DEONILDE DEOLINDA SARMENTO

MAPUTO
JULHO 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DEONILDE DEOLINDA SARMENTO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS DE DOIS DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre ou Doutor em Medicina Tropical.

Orientador (es): Profa. Dra. Martha Cecilia Suárez Mutis
Profa. Dra. Sónia Enosse

Sarmento, Deonilde Deolinda .

DIVERSIDADE GENÉTICA DE PLASMODIUM FALCIPARUM EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS DE DOIS DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE / Deonilde Deolinda Sarmento. - Maputo, 2017.

74 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Martha Cecilia Suárez Mutis.

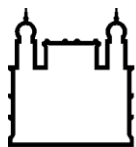
Co-orientadora: Sónia Enosse.

Co-orientador: Nédio Mabunda.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Diversidade Génética . 2. Plasmodium falciparum. 3. Moçambique. I.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: DEONILDE DEOLINDA SARMENTO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS EM DOIS DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Martha Cecilia Suárez Mutis
Prof. Dr. Sónia Enosse**

Aprovada em: 14/ 07/ 2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alda Maria da Cruz - Presidente
Prof. Dr. Jahit Sacarlal
Prof. Dr. Abuchama Saifodine

Maputo, de Julho de 2017

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós- Graduação em Medicina Tropical

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM AMOSTRAS DE
CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS EM DOIS DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE**

DEONILDE DEOLINDA SARMENTO

MAPUTO

2017

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós- Graduação em Medicina Tropical

DEONILDE DEOLINDA SARMENTO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE PLASMODIUM FALCIPARUM EM AMOSTRAS DE
CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS EM DOIS DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE**

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

ORIENTADORES: DRA. MARTHA SUÁREZ-MUTIS
DRA. SÓNIA ENOSSE

Maputo
2017

INDÍCE

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS	ii
ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MARCO TEÓRICO	3
1.2. DESCOBERTA DO PARASITA	4
1.3. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	4
1.4. MALÁRIA EM MOÇAMBIQUE	5
1.5. AGENTES ETIOLÓGICOS E VECTORES	6
1.6. CICLO DE VIDA DO <i>PLASMODIUM</i> SPP.	7
1.7. DIAGNÓSTICO.....	10
1.8. TRATAMENTO DA MALÁRIA.....	11
1.9. IMUNOLOGIA DA MALÁRIA	11
1.10. PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO 1 (MSP 1).....	12
1.11. PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO 2 (MSP 2).....	14
1.12. PROTEÍNA RICA EM GLUTAMATO (GLURP)	14
1.13. DIVERSIDADE GÉNÉTICA DO <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	15
1.14. MULTIPLICIDADE DA INFECÇÃO (MOI).....	17
1.15. JUSTIFICATIVA.....	17
2. OBJECTIVO GERAL	19
2.1. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	19
3. METODOLOGIA E DESENHO EXPERIMENTAL	20
3.1. DESENHO E POPULAÇÃO DE ESTUDO	20
3.2. ÁREA DE ESTUDO	20
3.3. TAMANHO DE AMOSTRA	21
3.4. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS	22
3.5. COLHEITA DE AMOSTRAS	22
3.6. TRANSPORTE DE AMOSTRAS	22
3.7. ANÁLISE LABORATORIAL	23
3.7.1. EXTRAÇÃO DE ADN GENÓMICO	23

3.7.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	23
3.7.3. ANÁLISE DE DADOS.....	26
3.7.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
4. RESULTADOS	27
4.1. DADOS DEMOGRÁFICOS.....	27
4.2. GENOTIPAGEM DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	30
4.2.1. FREQUÊNCIA ALÉLICA DE MSP 1.....	30
4.2.2. FREQUÊNCIA ALÉLICA DE MSP 2.....	32
4.2.3. FREQUÊNCIA ALÉLICA DE GLURP	34
4.3. MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO	35
4.4. HAPLÓTIPOS	37
4.5. CORRELAÇÃO ENTRE MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO E DENSIDADE PARASITÁRIA	38
4.6. RELAÇÃO ENTRE MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO E IDADE	38
5. DISCUSSÃO	40
Multiplicidade da infecção (MOI).....	43
6. CONCLUSÃO.....	47
7. RECOMENDAÇÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Adriano Sarmiento e Deolinda Malawene por terem sido o meu Deus na terra e me guiado pelo caminho certo. Aos meus irmãos Ivan Sarmiento e Edna Sarmiento por me incentivarem e sempre acreditarem em mim. A minha sobrinha Tayra Sarmiento pela alegria e paz que me transmite.

E por último mas não menos importante, ao meu esposo Ângelo Teixeira pela força, amor incondicional, paciência e incentivo durante todo o percurso e em todas as horas e áreas. E a nossa bebê, Nicole MoanaTeixeira!

Conseguimos

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Deus pai todo poderoso, por mais esta benção, por ter me guardado e guiado durante este percurso todo até aqui.

Às minhas orientadoras, Dra. Martha Suarez-Mutis e Dra. Sônia Enosse pela orientação, pela transmissão de conhecimentos, paciência, conselhos, sugestões e críticas nos dois anos de mestrado.

Ao meu co- orientadore Dr. Nédio Mabunda e à Dra. Simone Santos pela grande ajuda na melhoria deste trabalho.

Ao meu colega Crizolgo Salvador pelo pronto apoio na disponibilização e organização das amostras e base de dados laboratorias.

Aos meninos do Laboratorio de Doenças Parasitarias (IOC): Viviane, Tayane, Tamara, Amanda, Verônica, Hermano e especialmente a Jéssica (pelas noites passadas no laboratorio) e a Mônica (pela disponibilização dos artigos e discussões sobre a tese) pelo apoio e aprendizado transmitido durante a temporada no Rio de Janeiro.

Ao pessoal técnico- administrativo de INS e IOC pelo apoio prestado na logística Maputo- Rio de Janeiro e no processo de transporte de amostras.

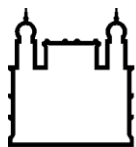
À coordenação do mestrado, na pessoa da Dra. Nilsa de Deus. Aos meus colegas do Mestrado.

A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular do INS pelo apoio.

Aos meus companheiros do alojamento de Curicica, Alcides Munguambe, Isabel Gundane e Adolfo Vubil. A Virginia Lara pela atenção na chegada ao do Rio de Janeiro.

Aos meus familiares todos, a família do meu esposo, aos meus padrinhos e amigos por todo apoio durante este processo.

«E ainda que tivesse o dom de profécia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, se não tivesse **amor**, nada seria.»
I Coríntios 13. 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

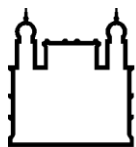
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS EM DOIS DISTRITOS DE MOÇAMBIQUE **RESUMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

DEONILDE DEOLINDA SARMENTO

A diversidade genética do *Plasmodium falciparum* é um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento da imunidade assim como para a eficácia terapêutica de antimaláricos, pois confere ao parasita habilidade para evadir a resposta imune do hospedeiro, gerando mudanças na sua composição antigênica, favorecendo resistência às drogas antimaláricas; essa diversidade permite estabelecer a intensidade de transmissão da malária numa região. Os genes *msp1*, *msp2*, e *glurp*, que codificam proteínas antigênicas, são altamente polimórficos e por isso são comumente usados como marcadores de diversidade genética do *P. falciparum*. Neste contexto, avaliou-se a diversidade genética do *P. falciparum* usando como alvo os genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 e GLURP de isolados clínicos de crianças menores de 5 anos, da província de Tete e de Gaza. O estudo foi transversal e foram analisadas amostras do estudo sobre “Eficácia e segurança de Artemether- Lumefantrina no tratamento da malária não complicada por *Plasmodium falciparum*”, aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética (115/CNBS/2014). Foram analisadas 163 amostras colhidas em papel de filtro e foi feita a amplificação da região 2 do gene *msp1*, a região central do gene *msp2* e a região R2 do gene *glurp* pela técnica Nested PCR usando os primers e seguindo o protocolo descrito por Snounou et al (1999). Das 163 amostras, 154 (94,5%) amplificaram o gene *msp1*, 153 (93,9%) amplificaram o gene *msp2* e 122 (74,8%) o gene *glurp*. Foram observados 17 genótipos para o gene *msp1*, correspondentes às 3 famílias alélicas (6 para K1, 6 para MAD20 e 5 para RO33). Para o gene *msp2* foram encontrados 27 genótipos das duas famílias (18 para IC/3D7 e 9 para FC27) e 9 genótipos para o gene *glurp*, sendo detectados 17 haplótipos no total. Verificou-se um alto grau de diversidade genética o que sugere um grande tamanho na população de parasitas e alta intensidade de transmissão. Estudar a dinâmica de populações de *P. falciparum* é importante para monitorar a possível surgimento e dissiminação de resistência aos antimaláricos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in sample of children under 5 years of age in two district of Mozambique.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Deonilde Deolinda Sarmento

The genetic diversity of *Plasmodium falciparum* is one of the major obstacles to the development of immunity as well as to the therapeutic efficacy of antimalarials, since it gives the parasite the ability to evade the host immune response, generating changes in their antigenic composition, favoring the drug resistance antimalarial; This diversity allows us to establish the intensity of malária transmission in a region. The *msp1*, *msp2*, and *glurp* genes, which encode antigenic proteins, are highly polymorphic and therefore are commonly used as markers of *P. falciparum* genetic diversity. In this context, the genetic diversity of *P. falciparum* was evaluated using the genes coding for the MSP 1, MSP 2 and GLURP proteins of clinical isolates of children under 5 years of age in the province of Tete and Gaza. The study was cross-sectional and samples from the study "Efficacy and safety of Artemether-Lumefantrine in the treatment of uncomplicated malaria by *Plasmodium falciparum*", approved by the National Bioethics Committee (115 / CNBS / 2014) were analyzed. A total of 163 samples collected on filter paper were analyzed and the *msp1* gene region 2, the central region of the *msp2* gene and the R2 region of the *glurp* gene were amplified using the Nested PCR technique using the primers and following the protocol described by Snounou et al (1999). Of the 163 samples, 154 (94.5%) amplified the *msp 1* gene, 153 (93.9%) amplified the *msp 2* gene and 122 (74.8%) the *glurp* gene. Seventeen genotypes for the *msp1* gene, corresponding to the 3 allelic families (6 for K1, 6 for MAD20 and 5 for RO33) were observed. For the *msp2* gene, 27 genotypes of the two families were found (18 for IC / 3D7 and 9 for FC27) and 9 genotypes for the *glurp* gene, with 17 haplotypes detected in the total. There was a high degree of genetic diversity, suggesting a large size in the parasite population and high intensity of transmission. Studying the dynamics of populations of *P. falciparum* is important for the monitoring of possible emergence and spread of resistance to antimalarial drugs.

ABREVIATURAS

ACT	Artemisinin Combination Therapy (Terapia combinada baseada em derivados de artemisinina)
AE	<i>Buffer Ellution (tampão de eluição)</i>
AL	<i>Buffer Lysis (tampão de lise)</i>
ATL	<i>Animal Tissue Lysis buffer (Tampão de lise de tecido de animal)</i>
AW1	<i>Wash buffer 1 (Tampão de lavagem 1)</i>
AW2	<i>Wash buffer 2 (Tampão de lavagem 2)</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (Traduzido de Inglês)
GLURP	Proteína Rica em Glutamato (Traduzido de Inglês)
<i>glurp</i>	Gene que codifica a proteína rica em glutamato
INS	Instituto Nacional de Saúde
LNRM	Laboratório Nacional de Referência da Malária
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MISAU	Ministério da Saúde de Moçambique
MOI	Multiplicidade de infecção (traduzido do inglês)
MSP1	Proteína de Superfície de Merozoíto 1 (Traduzido de Inglês)
<i>mSP1</i>	Gene que codifica a proteína de superfície do merozoíto 1
MSP2	Proteína de Superfície de Merozoíto 2 (Traduzido de Inglês)
<i>mSP2</i>	Gene que codifica a proteína de superfície do merozoíto 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PNCM	Programa Nacional de Controlo da Malária
pb	Pares de bases
PIDOM	Pulverização Intra- Domiciliar
REMTI	Redes mosquiteiras Tratadas com insecticidas de longa duração
TDR	Teste de diagnóstico rápido
TIP	Tratamento intermitente presuntivo
WHO	World Health Organization
µl	Microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estimativa de mortes por malária no mundo.
- Figura 2:** Ciclo de vida do *Plasmodium sp.* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.
- Figura 3:** Esquema do gene *msp1* e suas famílias alélicas, MAD 20, K1 e RO33.
- Figura 4:** Esquema da estrutura das famílias alélicas do gene *msp2*, Fc 27 e 3D7.
- Figura 5:** Esquema da região II, da proteína que codifica GLURP.
- Figura 6:** Mapa de Moçambique com destaque os locais de estudo (Chókwè e Moatize).
- Figura 7:** Electroforese de gel de agarose à 2% do diagnóstico molecular de *Plasmodium falciparum* por PCR.
- Figura 8:** Electroforese em gel de agarose à 2% da genotipagem do gene *msp1*, e discriminação das três famílias alélicas.
- Figura 9:** Frequência alélica das 3 famílias do gene *msp 1*.
- Figura 10:** Electroforese em gel de agarose 2% da genotipagem do gene *msp2* e discriminação das famílias alélicas.
- Figura 11:** Frequência alélica das duas famílias FC27 e IC/3D7 do gene *msp 2*.
- Figura 12:** Electroforese em gel de agarose à 2% da genotipagem do gene GLURP de *P. falciparum*.
- Figura 13:** Frequências dos alelos da região II dos gene *glurp*.
- Figura 14:** Comparação entre a multiplicidade de infecção (MOI) dos genes *msp 1*, *msp 2* e *glurp* nas duas regiões (Moatize e Chókwè) de Moçambique.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Iniciadores para amplificação por PCR dos genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 e GLURP.
- Tabela 2:** Características demográficas e laboratoriais dos pacientes do estudo.
- Tabela 3:** Número de amostras encontradas para diferentes números de alelos detectados para cada família alélica.
- Tabela 4:** Pares de haplótipos.
- Tabela 5:** Média de multiplicidade de infecção de MSP 1, MSP 2 e GLURP estratificada por idade.

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário do género *Plasmodium*. O *Plasmodium falciparum* é uma das cinco espécies de *Plasmodium* que afectam humanos, sendo responsável por cerca de 90% de todas as infeções e é o parasita mais predominante em África (1,2). A malária é transmitida pela picada da fêmea do mosquito do género *Anopheles* e a intensidade de transmissão depende de factores relacionados ao parasita, ao vector, ao hospedeiro humano e ao meio ambiente (3). Globalmente, existem aproximadamente 214 milhões de casos de malária por *P. falciparum* e um número estimado de 438.000 mortes, sendo que a maioria das mortes ocorre em crianças com menos de 5 anos que vivem na África Sub-Sahariana onde uma criança morre a cada 2 minutos devido a malária. A taxa de mortalidade por malária apresentou um declínio de 77% em crianças menores de 5 anos, sendo que no entanto esta passou de primeiro lugar para quarto em casos de mortes em todo o mundo (WHO, 2015b).

Em Moçambique a malária é endémica e é a principal causa de morbilidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos, sendo responsável por cerca de 45% de todos casos de consultas externas (4). Vários esforços têm sido levados a cabo com vista ao controlo e erradicação de casos de malária mundialmente e, felizmente, de acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), verificou-se uma redução significativa da carga global da malária, do ano 2000 a 2015 atingindo deste modo os objectivos do Milénio (WHO,2015b). Apesar dos esforços realizados, vários factores tais como, resistência dos mosquitos vectores aos insecticidas, a falta de vacinas eficazes, o surgimento e disseminação de resistência dos parasitas aos medicamentos têm contribuído para que não se atinja resultados mais satisfatórios no controlo ou na eliminação da malária em várias regiões do planeta (5). Para o controlo da doença torna-se necessária a implementação simultânea de várias estratégias eficazes, dentre várias, a administração de fármacos para o tratamento adequado e oportuno, o diagnóstico laboratorial precoce, e acções de combate aos vectores (WHO, 2014). Segundo a OMS, o sucesso na redução da carga da malária deveu-se a introdução massiva das medidas de controlo tais com rede mosquiteira tratadas com insecticidas e a introdução do ACT como primeira linha de tratamento para a malária (WHO, 2015a).

Contudo, a resistência aos anti- maláricos é um dos maiores obstáculos para o controlo e a eliminação da malária no mundo, especialmente para o *P. falciparum*; por esta razão, essa resistência precisa ser cuidadosamente monitorada seja pela avaliação de eficácia terapêutica, a análise *in vitro* da susceptibilidade ou pelo uso de marcadores moleculares associados á resistência do parasita às drogas (6). Não obstante, os parasitas da malária apresentam uma grande diversidade genética, conferido- lhes capacidade para evadir a resposta imune do hospedeiro e produzir variantes resistentes aos medicamentos e às vacinas que estão sendo desenvolvidas e limitando a imunidade protectora adquirida levando deste modo ao fracasso das medidas de controlo e eliminação da malária no mundo (7,8).

Os genes *msp1*, *msp2* e *glurp* do *P. falciparum* que codificam antígenos são altamente polimórficos e a maior parte das infecções são múltiplas isto é, com mais do que um genótipo do parasita simultaneamente, resultando em um alto nível de multiplicidade de infecção (MOI). Os marcadores moleculares de diversidade genética comumente usados são os genes *msp1*, *msp2* e *glurp*, que codificam proteínas antigénicas, nomeadamente as proteínas 1 e 2 da superfície de merozoítos (MSP 1 e MSP 2) e a proteína rica em glutamato (GLURP). A utilização simultânea destes três marcadores é recomendável pois permite a identificação de um elevado número de genótipos e um adequado nível de diferenciação dos parasitas (9–11).

Na África sub-sahariana, foi observado, que a maioria dos pacientes no momento do diagnóstico já se encontravam infectados com mais do que um genótipo do parasita (12).

Alguns autores associam frequentemente a alta transmissão da malária numa determinada região ao alto nível de diversidade genética e a multiplicidade da infecção (13). A variabilidade do *P.falciparum* pode acarretar consequências nas medidas de controlo e favorecer o surgimento de resistência aos anti- maláricos, pois um alto grau de MOI sugere efectiva recombinação genética dos parasitas e contínua manutenção da diversidade genética numa determinada população (8).

A diversidade genética do parasita varia de acordo com as características epidemiológicas de uma determinada região (14). Num estudo realizado em quatro localidades da Colômbia verificou-se que numa das localidades foi encontrado um maior

número de genótipos comparativamente às outras três localidades e isto pode estar relacionado com a alta incidência de malária nessa região (7).

Os métodos moleculares baseados em ADN, tais como a reacção em cadeia da polimerase (PCR), fornecem uma descrição sobre a população de parasitas e a sua diversidade permitindo precisar diferenças genéticas dentro da mesma espécie e classificar as variantes alélicas (14,15). Para este estudo será feita a amplificação da região 2 do gene *msp 1*, região central do gene *msp 2* e a região R2 do gene *glurp* pela técnica *Nested PCR*.

Em Moçambique, a malária continua sendo um grave problema de saúde pública e pouca ou nenhuma informação sobre a diversidade genética dos parasitas da malária usando simultaneamente os genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 e GLURP é até então conhecida. Deste modo as informações sobre a diversidade genética dos parasitas da malária em circulação no país são essenciais, não só para a compreensão dos mecanismos relativos a patologia da malária e aquisição de imunidade como também para estabelecer uma estratégia adequada para o controlo dessa doença no país, incluindo a produção de uma vacina eficaz, assim como para prever o quão rápido pode surgir e disseminar-se, por exemplo, a resistência ao antimalárico em uso (16).

Assim, o presente estudo foi realizado com o objectivo de avaliar a diversidade genética do *P. falciparum* usando os genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 e GLURP em crianças menores de 5 anos em duas regiões de Moçambique, aplicando técnicas de genotipagem, num estudo de carácter descritivo transversal.

1.1. MARCO TEÓRICO

Malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário do género *Plasmodium*, transmitido de pessoa a pessoa através da picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. Existem cinco espécies de *Plasmodium* que afectam humanos nomeadamente: *P. falciparum* (Welch 1897), *P. vivax* (Grassi & Filetti 1890), *P. malariae* (Grassi & Filetti 1890), *P. ovale* (Stephens 1922), e *P. knowlesi* (Knowles & Gupta 1931) pertencentes ao filo *Apicomplexa* e família *Plasmodidae*, constituídas de várias

características morfológicas comuns (17,18). Vários critérios morfológicos, moleculares e epidemiológicos permitem fazer a diferenciação destas espécies (19).

1.2. DESCOBERTA DO PARASITA

O *Plasmodium* spp., agente causador da malária foi originalmente descoberto em novembro de 1880 pelo cirurgião Alphonse Laveran (1845-1922), quando observou o parasita ao microscópio no sangue de um soldado com malária da Argélia, país em que se encontrava para servir o exército. Foram vistas formas filamentosas finas que se moviam activamente (gametócito macho exflagelando). Este evento marcou a descoberta de *Plasmodium* spp. como agente causador da malária. Após estes achados, Ronald Ross (1857-1932) na Índia executou um trabalho árduo e identificou oocistos nos intestinos do mosquito, considerando deste modo, o mosquito como sendo o vector do *Plasmodium* spp. e desvendou o ciclo da malária aviária, o que veio contribuir para a descoberta feita por Painstakingly em 1898 ao dissecar mosquitos e encontrar esporozoítos do parasita. Por fim William George Mc-Callum em 1897, confirmou que o processo de exflagelação é uma fase do ciclo de reprodução sexual do *Plasmodium* spp. e Batista Grassi confirmou que os mosquitos anófeles eram os vectores da malária humana em 1900 (20).

1.3. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária é uma doença endémica em 91 países do mundo (21). Globalmente, estima-se que ocorreram 214 (149-303) milhões de casos de malária e 429.000 (236.000-635.000) mortes por malária anualmente, sendo que 80% dos casos e 90% das mortes ocorrem no continente africano (**Figura 1**). Segundo a OMS, cerca de 303.000 (165.000-450.000) das mortes ocorrem em crianças menores de 5 anos (3).

Na África Sub-Sahariana, 840 milhões de pessoas vivem sobre o risco de contrair malária e 128 milhões de pessoas são infectadas por malária, a todo o momento (22). Em relação as infecções subpatentes de baixa densidade, estes números podem ser relativamente mais altos do que os relatados. A prevalência da malária em crianças com idade compreendida entre 2 a 10 anos diminuiu nos últimos anos, de 26% em 2000 para 14% em 2013 (22).

Cerca de 10% de todas as mortes em crianças menores de cinco anos, na África Sub-Sahariana são causadas por malária (3).

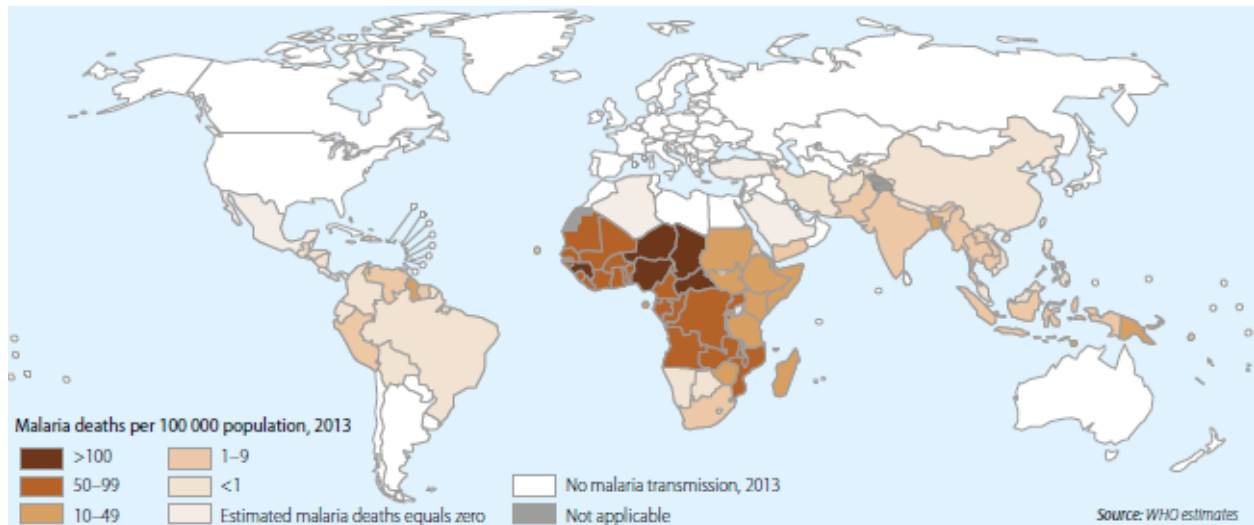


FIGURA 1: Estimativa de mortes por malária no mundo. **Fonte:** WHO world malaria Report, 2014.

1.4. MALÁRIA EM MOÇAMBIQUE

Nos países da África sub-sahariana a malária é a maior causa de internamentos pediátricos e consultas hospitalares (3). Em Moçambique, a infecção por malária é endêmica, e é um dos principais problemas de saúde pública, sendo responsável por cerca de 45% de todos casos de consultas externas, aproximadamente 56% dos internamentos nas pediatrias e cerca de 26% do total de mortes nos hospitais. Na zona rural a prevalência da malária entre crianças menores de cinco anos é de 46,3% em comparação com 16,8% em áreas urbanas (IIM, 2007; WHO, 2015). Nesta zona, crianças com idades compreendidas entre 6 meses a 3 anos estão em alto risco de contrair malária (23).

A taxa de fatalidade varia de 1,8 a 9,6% dependendo da região sendo que o *Plasmodium falciparum* é responsável por 90% de todos os casos e os principais vectores são o *Anopheles funestus*, *A. gambiae* e *A. arabienses* (3,24).

A transmissão da malária no país é sazonal, ocorre ao longo de todo o ano com picos durante e após a época chuvosa que ocorre entre os meses de dezembro e abril. Em Moçambique a intensidade de transmissão da malária é variável, dependendo da precipitação das chuvas e de outras condições ambientais (4). A prevalência encontra-se entre 13,7% e 21,0% e 30,5% e 34,0%, no final da época seca e no final da época chuvosa, respectivamente (24).

Segundo Saúte *et al.* (2003a), mais de 70% de crianças apresentam mais do que um episódio de malária em curto período de tempo. Estima-se que, em média, a taxa de inoculação entomológica chega a ser até 15 picadas efectivas por pessoa por ano

Vários esforços têm sido feitos para o controlo da malária no país tais como o uso de redes mosquiteiras tratadas com insecticidas (REMTI), pulverização intra-domiciliar (PIDOM), tratamento intermitente presuntivo (TIP), diagnóstico e tratamento precoce e produção de uma vacina eficaz (25). Ensaios para produção de uma vacina vêm acontecendo no país, pois seu desenvolvimento é urgentemente necessário.

1.5. AGENTES ETIOLÓGICOS E VECTORES

Entre as cinco espécies que infectam ao ser humano, o *P. falciparum* é a espécie mais predominante em África sendo a principal causa de malária grave e morte por malária (26). A quinta espécie de *Plasmodium spp*, *P. knowles* pensa-se que não é transmitida de pessoa para pessoa, mas sim através de transmissão zoonótica (3). Um indivíduo pode ser infectado simultaneamente por diferentes espécies de plasmódio (infecções mistas), podendo serem encontrados casos não muito frequentes de infecções triplas ou quadruplas; contudo o nível de parasitemia é diferente em cada *Plasmodium spp.* (27). O quadro torna-se mais grave com a presença de variantes genéticas de uma mesma espécie num indivíduo, podendo diferir entre si quanto à sua constituição antigénica, perfil de resistência a anti-maláricos e outros aspectos como também em caso de indivíduos oriundos de regiões não endémicas para a malária (19,27). Os primeiros sintomas da malária tais como dores de cabeça, fadiga, dores abdominais seguidas das

febres, calafrios, vômitos, anorexia e outros, não são específicos e são similares aos de outras doenças (22).

1.6. CICLO DE VIDA DO PLASMODIUM SPP.

O sucesso da infecção pelos plasmódios que causam malária humana depende de dois hospedeiros, o homem (ciclo assexuado) e um mosquito fêmea (ciclo sexuado). O ciclo começa quando uma pessoa infectada pelo *Plasmodium spp.* é picada pelo mosquito fêmea do género *Anopheles* no momento do repasto sanguíneo. Durante a picada, o mosquito injecta saliva que serve de anticoagulante antes de sugar o sangue do indivíduo. De seguida ocorre a injeção de esporozoítos (forma infectante) que se encontra nas glândulas salivares do mosquito para a pele onde podem permanecer até por seis horas e de seguida um terço dos mesmos, os que não foram destruídos pelos macrófagos, entram nos vasos linfáticos e migram para os linfónodos regionais. Após 30 minutos os esporozoítos, invadem as células do fígado (hepatócitos), originando células unicelulares denominadas criptozoítos. Com a divisão nuclear subsequente, esquizogonia tisular, forma-se uma célula multinucleada denominada esquizonte, que dará origem aos merozoítos. O hepatócito parasitado rompe-se, liberando milhares de merozoítos. A esquizogonia que ocorre nos hepatócitos e denominada esquizogonia hepática ou exoeritrocitária ou tisular; nesta fase os sintomas clínicos não se manifestam. Em algumas espécies tais como *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam formas dormentes, denominadas, hipnozoítos, que persistem no fígado e podem com o tempo acordar, resultando nas recaídas tardias.

De seguida os merozoítos invadem exclusivamente as hemácias (fase intra-eritrocitária). O *P. vivax* invade os eritrócitos imaturas (reticulócitos), enquanto o *P. falciparum* invade eritrócitos de todos os estágios com preferência para os jovens. No interior dos eritrócitos ocorre a esquizogonia eritrocitária (divisão celular) onde estes se transformam em trofozoítos. Após esta transformação, de trofozoíto para esquizonte, ocorrem entre 3 a 6 divisões mitóticas. Os esquizontes apresentam entre 6 a 32 núcleos, dependendo da espécie, que se transformarão em merozoítos. Ao final da esquizogonia eritrocitária, os merozoítos são libertados na corrente sanguínea, sendo um período caracterizado por picos de febres periódicos. O intervalo entre os picos febris

corresponde à duração da esquizogonia sanguínea em cada espécie de *Plasmodium* spp. Novas hemácias são invadidas por merozoítos transformando-se em trofozoítos e posteriormente em esquizontes repetindo o ciclo de esquizogonia eritrocitária; devido a factores não muito claros podem se diferenciar em formas sexuadas, os gametócitos, que são as formas infectantes para o mosquito vector. Dentro dos vetores, o gametócito masculino sofre exflagelação que resulta em microgâmetas enquanto o gametócito feminino transforma-se em macrogâmeta. Caso estas formas sejam ingeridas por mosquitos, ocorre de seguida uma fusão entre os microgâmetas e macrogâmetas formando-se um zigoto que em poucas horas transforma-se em um estágio móvel chamado oocineto. Ao penetrar na parede do estômago do mosquito, o oocineto transforma-se em oocisto. Com a ruptura do oocisto, milhares de esporozoítos liberam-se e migram activamente para as glândulas salivares dos mosquitos que a cada repasto sanguíneo são injectados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Esta fase do ciclo é denominada de fase esporogónica e corresponde ao período de incubação extrínseco (19,28,29) (**Figura 2**).

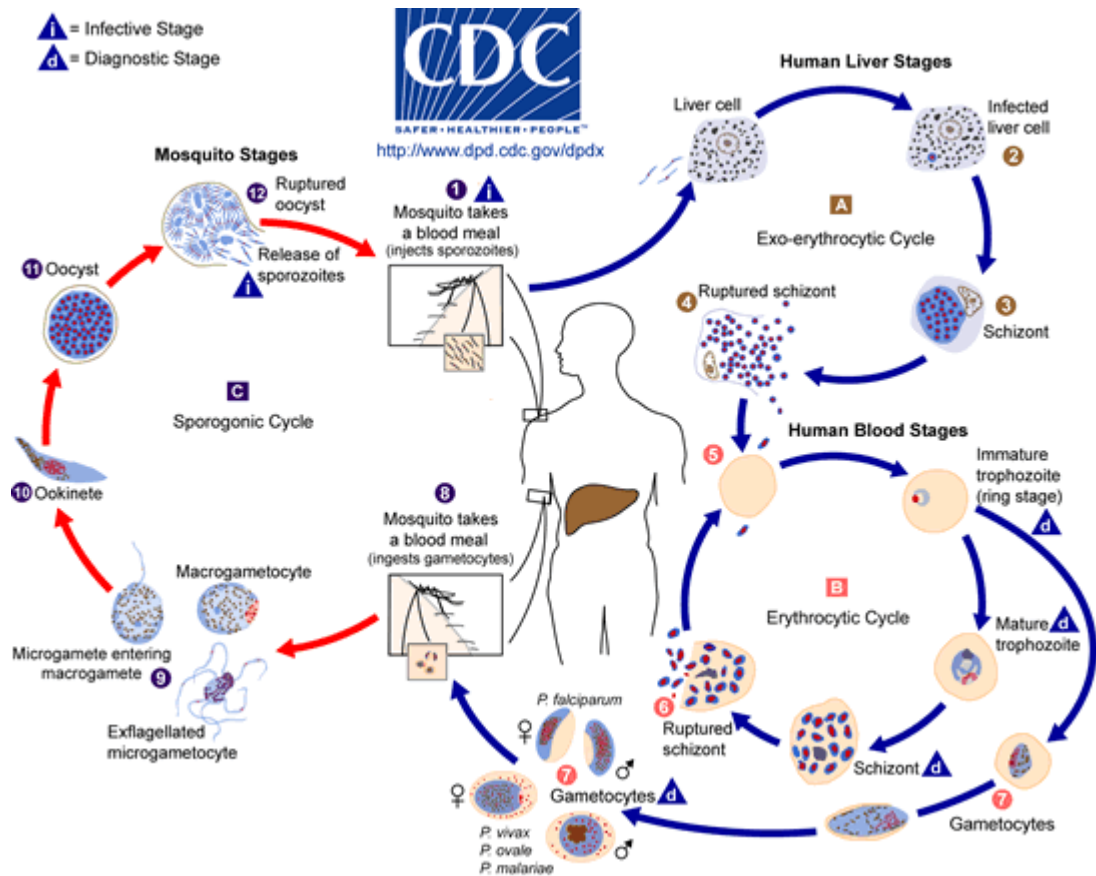


FIGURA 2. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.
 Fonte: <http://dpd.cdc.gov/dpdx>

O desenvolvimento da fase assexuada sanguínea do parasita causador da malária acarreta várias consequências patológicas, tais como elevada morbidade e mortalidade, especialmente quando a infecção é por *P. falciparum* (30). O *P. falciparum* tem características distintas de outros plasmódios relacionadas com a sua maior virulência, pois esse parasita produz maior número de merozóitos e ao facto de ter capacidade de infectar eritrócitos de todas as idades (20). É a única espécie que provoca alterações na microcirculação. Contudo o principal factor que lhe confere maior virulência é a citoaderência isto é, a capacidade de adesão das hemácias parasitadas ao endotélio de pequenos vasos sanguíneos bem como a adesão das hemácias não parasitadas formando “rosetas”. As hemácias infectadas apresentam protrusões eletrodensas em sua superfície que facilitam este processo (19,31).

Os trofozóitos maduros e esquizontes sanguíneos são responsáveis pelo fenómeno de citoaderência pois produzem moléculas chamadas adesinas que migram para a membrana dos eritrócitos parasitados formando os *Knobs* (protuberâncias) (19,31). A principal molécula envolvida nesta aderência aos receptores endoteliais é uma proteína polimórfica, PfEMP-1 (proteína de membrana de eritrócito 1) codificada pela família de genes *var* (19).

1.7. DIAGNÓSTICO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que todos os indivíduos com suspeita de malária sejam examinados para evidenciar a presença de parasitas, ou através da técnica de microscopia ou pelo teste de diagnóstico rápido (TDR) pois os sinais e sintomas clínicos da doença não permitem afirmar com certeza a infecção por malária nem o tipo de espécie parasitária (32).

As quatro espécies de *Plasmodium* spp. que causam malária humana *P.falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* são diferenciadas morfológicamente e a quantificação dos parasitas é feita por microscopia; enquanto que a confirmação diagnóstica da quinta espécie, o *P. knowlesi*, é feita através da PCR devido às semelhanças existentes com o *P. malariae* e o *P. falciparum* (32). Os TDR permitem detectar antígenos parasitarios específicos ou enzimas espécie-específica e podem ser usados na ausência da técnica de microscopia (32).

Métodos de identificação molecular, tais como o *Nested PCR* (variação da PCR), apresentam maior sensibilidade e especificidade, detectando deste modo baixos níveis de parasitemia, fazendo uma melhor identificação de espécies. Entretanto não obstante este não pode ser usado rotineiramente devido ao seu alto custo e complexidade não desempenhando deste modo um papel no manejo clínicos dos casos de malária (32).

Define-se como caso de malária quando há pacientes que apresentem sintomatologia compatível, diagnóstico clínico e parasitas assexuados num número maior que 0 parasitas/ μ l (32,33).

1.8 TRATAMENTO DA MALÁRIA

Vários factores influenciam na tomada de decisão sobre que tratamento seguir; são estes: a severidade da doença, a espécie de *Plasmodium* spp, o estado de gravidez, o local de aquisição da infecção, entre outros (26). A infecção por *P. falciparum* pode ser grave e progredir muito mais rápido que a infecção por outras espécies causando a morte velozmente; neste contexto o início do tratamento tem que ser urgente. Também, o *P. falciparum* é resistente à diferentes medicamentos segundo a região, o que reforça a necessidade da avaliação específica do caso antes da administração do tratamento. Pacientes diagnosticados com malária não complicada receberão um tratamento por via oral e os com malária grave, tratamento parenteral. (26,32). A terapia combinada baseada em derivados de artemisinina (ACT) é recomendada para o tratamento de malária por *P. falciparum* não complicada e a cloroquina para malária por *P. vivax* em crianças e adultos, excepto em mulheres grávidas. Nos países onde se verificou a resistência à cloroquina, o *P. vivax* é tratado com outros derivados de ACT (32). Os ACTs foram adaptados como tratamento de primeira linha para o *P. falciparum* em vários países com relatos de surgimento de resistência à cloroquina, como é o caso de Moçambique (23,32).

1.9 IMUNOLOGIA DA MALÁRIA

A infecção por malária desencadeia uma resposta regulada pelo sistema imune inato, adquirida assim como por factores ambientais (34). Em países endémicos para malária, como é o caso de Moçambique, crianças nascidas de mães imunes para malária estão protegidas nos primeiros meses de vidas pelos anticorpos maternos transferidos através da placenta, mas após os primeiros seis meses de vida perdem esta imunidade; essas crianças antes da aquisição de imunidade activa ficam susceptíveis à doença grave podendo morrer por malária. Por esta razão crianças menores de cinco anos são o maior grupo de risco e a faixa etária preferencial para as medidas de controlo (29,34). Na malária, a aquisição da imunidade activa e permanência da mesma, é consoante à exposição lenta e repetitiva do indivíduo ao parasita (20). O contacto inicial entre o merozoito e o eritrócito é mediado por estruturas filamentosas que constituem a superfície do merozoito. Várias proteínas da classe glicosilfosfatidilinositol (GPIs) estão envolvidas

no processo de invasão dos eritrócitos; acredita-se que os antígenos de superfície são os principais envolvidos no reconhecimento da superfície do eritrócito e desempenham papéis diferentes no processo da invasão do eritrócito (34,35). Fazem parte deste grupo as proteínas de superfície de merozoito 1 e 2 e a proteína rica em glutamato entre outras (17) .

Quando ocorre a infecção pelo parasita ocorre uma forte activação de imunoglobulinas não específicas, porém sua importância assim como das células B policlonais não está sendo estabelecida. A maior importância do desenvolvimento da imunidade humoral da malária no estágio sanguíneo são os antígenos de parasitas expressos na superfície dos eritrócitos infectados. Estes antígenos são membros de famílias de proteínas altamente variáveis o que favorece ao parasita a invasão da resposta imune e é um importante factor de virulência. Neste contexto anticorpos mediadores da inibição da invasão do merozoito aos eritrócitos são menos eficazes (34).

Os antígenos candidatos à indução dos anticorpos protectores podem se localizar nas organelas apicais ou nas superfícies dos merozoitos (MSP 1 e MSP 2) assim como nas superfícies de eritrócitos (17). Os antígenos de superfície de merozoitos (MSP) do *Plasmodium* spp. são fortemente selecionados pelo sistema imune do hospedeiro provavelmente por estarem presentes em um dos poucos estágios extracelulares do parasita. Bloquear esta fase da invasão dos merozoitos aos eritrócitos impediria o desenvolvimento do parasita; por esta razão os merozoitos são um alvo importante para produção de vacinas (36).

A imunidade para malária é adquirida lentamente; contudo a diversidade genética do parasita influencia neste processo dificultando a aquisição desta imunidade pois a imunidade produzida por uma cepa de *P. falciparum* não serve para uma outra cepa diferente (14).

1.10 PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO 1 (MSP 1)

A proteína de superfície de merozoito 1 (MSP 1) é uma glicoproteína com cerca de 190 kDa de tamanho, encontrada em todas as espécies de *Plasmodium* spp que

causam malária, e é importante na invasão de eritrócitos pelo merozoíto sendo portanto um dos principais alvos da resposta imune do hospedeiro humano (18,37,38). Neste contexto a proteína é uma das principais candidatas a vacina da malária do estágio sanguíneo (39,40).

O gene *m*sp1, que codifica a proteína MSP 1, é um gene de cópia única, altamente polimórfico, localizado no cromossoma 9 contendo 17 blocos variáveis de sequências, podendo ser conservadas ou semi-conservadas. Nos blocos 1, 3, 5, 12 e 17 as sequências são conservadas. Os blocos 2, 4, 6, 8, 10, 14 e 16 as sequências mostram alta diversidade enquanto nos restantes blocos 7, 9, 11, 13 e 15 as sequências são semi-conservadas. O Bloco 2 encontra-se na região próxima da extremidade 5' do gene e é a mais polimórfica do *m*sp1 pois contém estruturas altamente repetitivas (18,38–41). O *m*sp1 está agrupado em três famílias alélicas até, então identificadas, nomeadamente K1, MAD20 (duas diferentes sequências trimétricas repetidas) e RO33 (com escassez de regiões repetitivas) (18,42,43) (**Figura 3**).

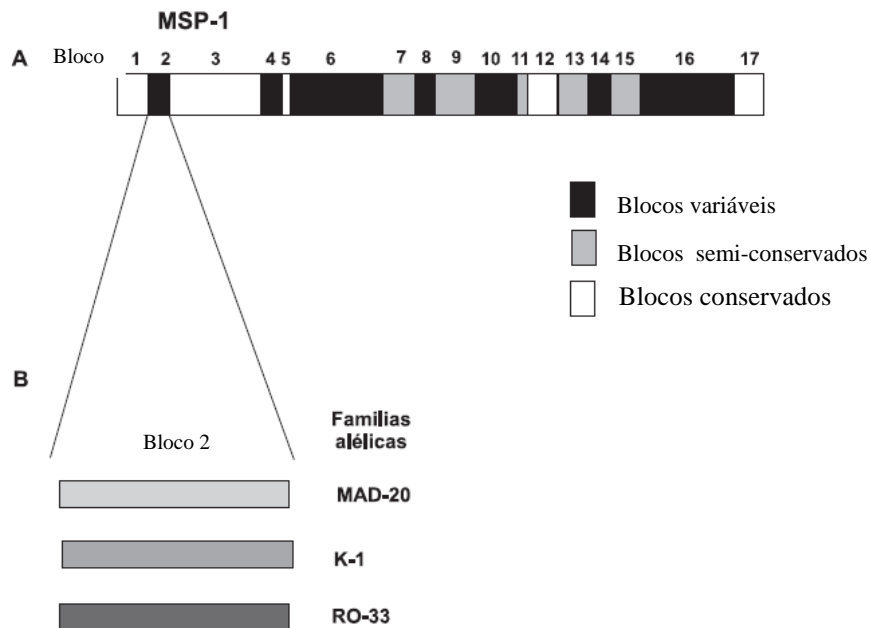


Figura 3: Esquema do gene *m*sp1 e suas famílias alélicas, MAD 20, K1 e RO33. Fonte: Jimenez, *et al.*,2005.

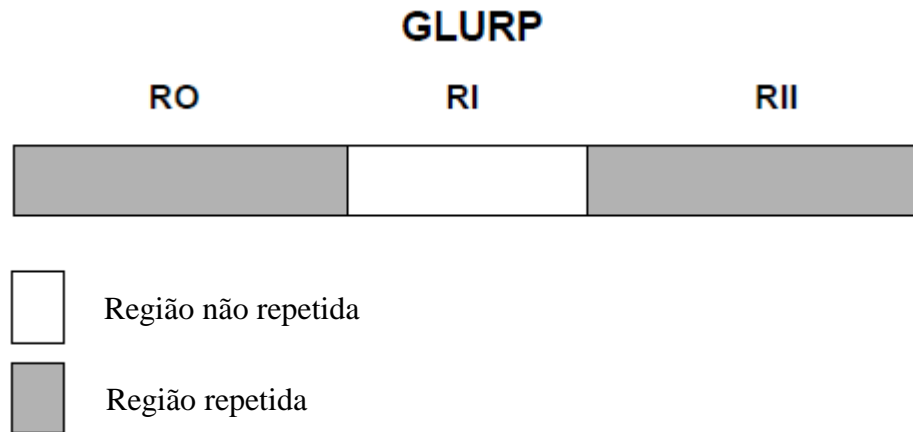


Figura 5: Esquema da região II, da proteína que codifica GLURP.

1.13. DIVERSIDADE GÉNÉTICA DO PLASMODIUM FALCIPARUM

O *P. falciparum* apresenta um enorme polimorfismo genético (12,46). Devido a sua alta capacidade de recombinação, este parasita apresenta uma grande diversidade genotípica e fenotípica (14,47). O polimorfismo alélico e a reprodução sexual obrigatória do ciclo do parasita são responsáveis pela ocorrência de recombinação meiótica clássica e um evento não recíproco de recombinação, contribuindo deste modo para geração de novos genótipos e produção de diversas proteínas. (48,49)(48,49).

Esta diversidade genética confere ao parasita a capacidade de evadir a resposta imune e produzir variantes antigénicas incapazes de serem reconhecidas pelo hospedeiro, tornando-os resistentes a medicamentos e às vacinas, levando também ao insucesso das medidas do controlo vectorial (8,14).

O facto dos genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 (candidatas as vacinas) e GLURP, serem altamente polimórficos é o maior impedimento para produção de vacina contra a malária (8). A diversidade genética do parasita e a multiplicidade da infecção (MOI) estão correlacionados com a intensidade de transmissão (8).

Realizar a genotipagem de amostras usando PCR alelo específico para os genes *msp1*, *msp2* e *glurp* nos permite obter informações sobre a diversidade genética e o grau de multiplicidade de infecção numa área determinada e verificar a intensidade de transmissão do parasita (8). Em um estudo realizado em Myanmar, foi observado que os genes *msp 1* e *msp 2* se mostraram altamente polimórficos e a maior parte das infecções eram múltiplas: foram encontradas 46 amostras pertencentes à família alélica K1, sendo que em 63,5% das amostras, (40/63) foram encontradas infecções mistas com a família MAD20 e 17 amostras foram mono-infecções com MAD20. Para o gene *msp2* foram encontradas, 12,7% (8/63) das amostras pertencentes à família FC27 e 19,0 % (12/63) pertencentes à família 3D7 e 68,3% (43/63) com infecções mistas. A multiplicidade da infecção foi relativamente alta, 2,03 e 2,35 para *msp 1* e *msp 2*, respectivamente (5). Esses antígenos, são directamente acessíveis ao sistema imune por isso são fortes candidatos a vacinas.

Na África subsahariana, nos países onde a malária é endémica, os estudos mostram que em média a maior parte dos pacientes infectados pelo *P. falciparum* apresentam mais do que um genótipo no dia 0 (12). Em zonas endémicas para malária, como é o caso de Moçambique, a principal causa de diversidade genética e multiplicidade de infecção é o número de picadas infectivas a uma pessoa por ano que produz uma constante geração de novos genótipos do parasita, pois um indivíduo pode estar infectado com múltiplos clones de *P. falciparum* (MOI) e o mosquito ingerir gametócitos pertencentes a clones geneticamente distintos, gerando novas combinações genéticas (14).

As proteínas MSP 1 e MSP 2 do *P. falciparum* são os principais antígenos sanguíneos candidatos a vacina e excelentes marcadores genéticos para identificação de subpopulações de parasitas. Em relação ao gene *glurp*, em um estudo feito por Yuan *et al.*, (2013) realizados no nordeste de Myanmar, região endémica, foram identificados cerca de seis alelos deste gene o que torna necessária a introdução deste marcador nos estudos de diversidade genética.

Vários estudos como os de Yuan *et al.* (2013) e Kang *et al.*, (2010), após feita a genotipagem dos alelos específicos de *msp 1*, *msp 2* e *glurp*, revelaram uma extensa diversidade genética e um elevado grau de multiplicidade de infecção (MOI). Especificamente os trabalhos de Yuan *et al.* (2013) ao analisar a diversidade genética de

*m*sp 1 e *m*sp 2 detectaram 30,1% e 21,3%, respectivamente, de infecções com mais de um clone de *P. falciparum* e 1,6 % para *glurp*. O estudo de Atroosh *et al.*, 2011 observou, na Malásia, que a frequência das famílias alélicas *m*sp1 é mais alta que as do gene *m*sp2.

1.14. MULTIPLICIDADE DA INFECÇÃO (MOI)

Neste estudo considerou-se multiplicidade de infecção (MOI), o maior número de alelos num genótipo detectado em uma amostra isto é, número de diferentes genótipos do parasita que infectam simultaneamente o mesmo indivíduo. Denomina-se infecção monoclonal, se cada um dos três genótipos isolados tiver apenas um alelo (50). Um alto grau de MOI sugere uma efectiva recombinação genética dos parasitas e continuidade na manutenção de diversidade genética (8). O estudo realizado por Mwingira *et al.*, (2011) em países da África Subsaariana mostrou uma média de MOI alta, sendo de 2,24 para *m*sp 2, de 1048 para *m*sp 1 e de 1,4 para *glurp*.

1.15. JUSTIFICATIVA

Apesar da importante diminuição no número de casos, entre os anos de 2000 á 2015, a malária continua sendo um importante problema de saúde pública global. No ano 2015 foram estimados 212 milhões de casos novos da doença com 429.000 mortes, sendo que 90% da morbidade e 92% da mortalidade ocorreram no continente Africano. A OMS estima que Moçambique contribuiu com 4% da morbidade e da mortalidade por malária no ano 2015 no planeta (21)). Em Moçambique a malária continua sendo um grave problema de saúde pública com cerca de 22 milhões de pessoas vivendo em áreas de alta transmissão. A malária em crianças menores de cinco anos representa um grande foco de preocupação pois esse grupo ainda não apresenta imunidade adquirida para a doença. Por este motivo, um enorme esforço tem sido feito para o controlo e prevenção da malária no país. Alguns factores como a resistência aos insecticidas, a rápida emergência e disseminação da resistência dos parasitas às drogas anti- maláricas e a falta de uma vacina efectiva são os maiores obstáculos para o sucesso desse combate. Neste contexto uma vacina efectiva contra a infecção pelo *P. falciparum* é de carácter urgente, porém, infelizmente uma das limitações para seu desenvolvimento é a grande diversidade genética observada nas populações de parasitas circulantes no país,

limitando a aquisição da imunidade protectora para a malária por meio de diferentes mecanismos como a evasão à resposta imune do hospedeiro. Além de influenciar para a baixa imunidade protectora, essa diversidade genética tem um impacto na epidemiologia da doença nestas regiões; a multiplicidade de infecção de uma região pode fornecer informação sobre o nível de endemicidade e taxa de transmissão da malária dessas áreas pois quanto maior for a taxa de multiplicidade de infecção maior é a intensidade. O estudo da dinâmica de populações de parasitas circulantes é importante para que sejam tomadas as melhores decisões políticas para o controlo da malária, pois factores como a variabilidade da intensidade de transmissão e a diversidade genética tem consequências na eficiência destas medidas de controlo.

Vários estudos sobre diversidade genética de *P. falciparum* já foram realizados no mundo e na África sub-sahariana; no entanto os dados disponíveis sobre a dinâmica do *P. falciparum* nas crianças em Moçambique são limitados. Estudar a diversidade genética usando crianças é importante pois estas ainda não foram expostas as diferentes populações de parasitas. Estudos realizados por (51) no distrito de Chókwe sobre a diversidade genética de *P. falciparum*, usando como marcador o gene que codifica para a proteína MSP 2 em indivíduos adultos HIV positivos, mostrou uma alta diversidade genética de *P. falciparum* (25 genótipos); outros dois estudos realizados por (52,53) em adultos no distrito de Manhiça também observou alta diversidade genética. Contudo nenhum estudo foi feito até então em crianças menores de cinco anos com malária não complicada em Moçambique.

Por outro lado, com a introdução e expansão da terapia baseada em Artemisinina (ACT) no país, a frequência alélica e a diversidade genética do *P. falciparum* deve ser monitorada regularmente em relação a confiabilidade do resultado e o possível surgimento e disseminação de resistência as drogas anti- maláricas. O *msp 1*, *msp 2* e *glurp* são marcadores que identificam a diversidade genética dos *P. falciparum* numa área determinada (54). São esses marcadores que permitem classificar se uma infecção é nova ou trata-se de uma recrudescencia, informações essenciais para avaliar a presença de genótipos resistentes aos antimaláricos nos estudos clinicos de eficacia terapêutica. Este estudo pretendeu estabelecer a diversidade genética e a multiplicidade da infecção entre crianças menores de cinco ano usando três dos mais importantes marcadores existentes: os gens *msp 1*, *msp 2* e *glurp*.

2. OBJECTIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética de amostras clínicas de *Plasmodium falciparum* isoladas de crianças menores de cinco anos em dois distritos de Moçambique, utilizando como alvos, genes *msp1*, *msp2* que codificam as proteínas de superfície do merozóito MSP 1 e MSP 2 e *gene* *glurp* que codifica para a proteína rica em glutamato GLURP.

2.1. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência alélica dos genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 e GLURP do *Plasmodium falciparum* em crianças menores de 5 anos com malária não complicada;
- Determinar a multiplicidade da infecção por diferentes genótipos do *Plasmodium falciparum* em crianças menores de 5 anos com malária não complicada;
- Comparar a multiplicidade da infecção por diferentes genótipos do *Plasmodium falciparum* nos distritos de Chókwè e Moatize, em Moçambique;
- Relacionar densidade parasitária com multiplicidade da infecção em crianças menores de 5 anos com malária não complicada.
- Relacionar idade com multiplicidade da infecção em crianças menores de 5 anos com malária não complicada.

3. METODOLOGIA E DESENHO EXPERIMENTAL

3.1. DESENHO E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi feito um estudo descritivo transversal no qual foi investigada a diversidade genética do *Plasmodium falciparum* em crianças dos 6 meses a 5 anos de idade com diagnóstico microscópico positivo para malária por *P. falciparum* não complicada que visitaram os postos de sentinela de estudo em busca de cuidados de saúde e preencheram os requisitos para o recrutamento.

3.2. ÁREA DE ESTUDO

As amostras para o presente estudo foram colhidas durante um estudo para 'Eficácia e segurança de Artemether- Lumefantrina no tratamento da malária não complicada por *Plasmodium falciparum* mediante busca passiva, realizado em postos de sentinela montados em 4 distritos de zonas rurais em Moçambique nomeadamente: Região Norte na Província de Cabo-Delgado – Montepuez com 166.227 habitantes, Região Centro nas Províncias de Tete – Moatize com 26 560 habitantes e Província de Sofala – Dondo com 117 719 habitantes e Região Sul na Província de Gaza – Chókwè com 186 597 habitantes (55). Para o presente estudo de diversidade genética foram usadas apenas amostras de dois dos postos de sentinelas, do distrito de Moatize na região centro e Chókwè na região sul, do país.

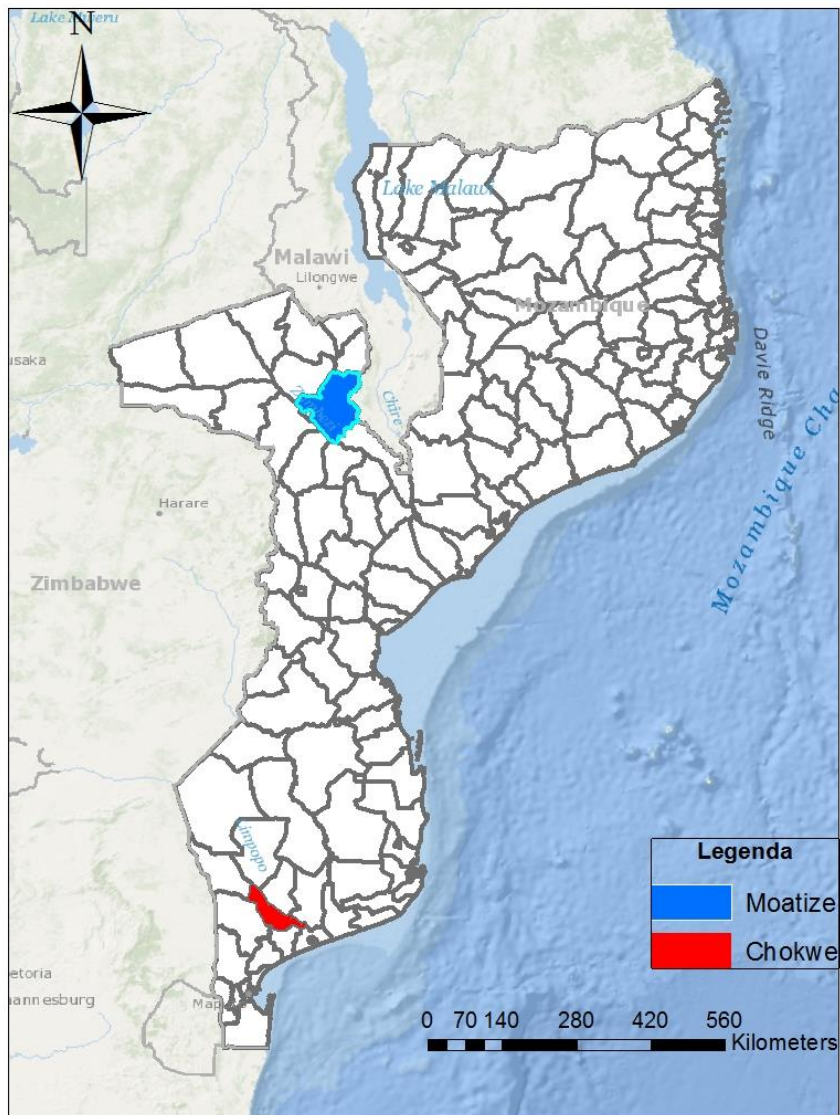


Figura 6: Mapa de Moçambique com destaque os locais de estudo (Chókwè e Moatize).

3.3. TAMANHO DE AMOSTRA

O tamanho mínimo da amostra estimado foi de 113 crianças; este tamanho amostral foi calculado seguindo a fórmula $N = pqz^2/d^2$ usada para estudos transversais, onde **p** é a probabilidade de casos positivos, **q** é a probabilidade de casos negativos, **d** é a precisão absoluta e **z** é o valor correspondente ao intervalo de confiança com uma margem de erro de 5% e com uma correção de 1.2 de acordo com recomendação da OMS. Para o estudo, apesar do cálculo do tamanho de amostra ser de 113, foram usadas 163

amostras, 75 para o posto de sentinela de Moatize e 88 para o posto de sentinela de Chókwè.

3.4. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS

Foram incluídas neste estudo as amostras de pacientes com as seguintes condições:

- Idade entre 6 e 59 meses;
- Mono-infecção por *P. falciparum* confirmada por microscopia;
- Parasitémia entre 2000 – 200000 parasitas assexuados/ μ l de sangue;
- Consentimento informado pelos pais ou responsáveis legais das crianças

Para cada amostra incluída no estudo foram extraídos dos dados do estudo: dados da mãe, informações sobre a proveniência (posto de sentinela, província), data de colheita, idade da criança, sexo, densidade parasitária.

3.5. COLHEITA DE AMOSTRAS

Para todas as crianças elegíveis para participar do estudo foram colhidas amostras de sangue em lâminas para gota espessa e estendida no dia 0, para a contagem de parasitas de modo a confirmar os critérios de inclusão e de exclusão. Após a inclusão do paciente no estudo, no dia 0 também foram colhidos 200 μ l de sangue para o papel de filtro (antes do tratamento com anti-malárico). As amostras foram armazenadas após a secagem a temperatura ambiente no papel de alumínio e de seguida colocadas num *ziplock* contendo um indicador de humidade e sílica gel de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente usadas para os procedimentos laboratoriais descritos abaixo. As amostras foram coletados entre os meses de Fevereiro e Março de 2015.

3.6. TRANSPORTE DE AMOSTRAS

As amostras em papel de filtro devidamente acondicionadas e empacotadas foram transportadas dos dois postos de sentinela para o laboratório Nacional de Referência da Malária (LNRM) do Instituto Nacional de Saúde (INS) em Maputo onde foram armazenadas a temperatura ambiente e seguidamente foram transportadas para o

Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) em temperatura ambiente seguindo o protocolo internacional de envio adequado de amostras usando o sistema triplo.

3.7. ANÁLISE LABORATORIAL

3.7.1. EXTRAÇÃO DE ADN GENÓMICO

O ADN do *P. falciparum* foi extraído de amostras de gotas de sangue contidas em papel de filtro, nas quais foram feitos dois cortes (1cm diâmetro) em cada papel de filtro correspondente a um paciente, usando mini kit comercial *QIAmp DNeasy Blood* (QIAGEN, USA) de acordo com o protocolo do fabricante para extração de *Dried Blood Spot* (DBS). Resumidamente, os papéis de filtro foram colocados em tubos estéreis de 1,5 µl aos quais foram adicionados 180 µl de tampão ATL para posterior incubação 85° c por 10 minutos. De seguida centrifugou-se rapidamente (*short spin*) e adicionam-se 20 µl de *Proteinase K*. Depois cada tubo foi para o *vórtex* e de seguida para a incubação à 56° c por uma hora. Após uma 1h foi feito o *short spin* e adicionaram-se 200 µl de tampão AL, homogeneização da mistura no *vórtex*, e incubou-se à 70° c por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 µl de etanol puro, a mistura foi homogeneizada no *vórtex*, centrifugadas rapidamente e transferiu-se para as mini colunas. Centrifugou-se à 800 rpm por um minuto e descartou-se o sobrenadante. Para primeira lavagem adicionou-se 500 µl de tampão AW1 e centrifugou-se por um minuto à 1000 rpm e descartou-se o sobrenadante; para a segunda lavagem adicionaram-se 800 µl de tampão AW2, centrifugou-se por 3 minutos à 14.000 rpm. Por final colocou-se as colunas num tubo novo, adicionaram-se 150 µl do tampão de eluição AE deixando-o incubar a temperatura ambiente e centrifugou-se por um minuto a 8000 rpm. Depois transferiu-se o ADN para um tubo novo e armazenou-se na geladeira até o uso.

3.7.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

3.7.2.1. PCR DIAGNÓSTICO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Para confirmação da positividade encontrada microscopicamente do *P. falciparum*, foi feita PCR diagnóstica para todas as amostras seguindo o protocolo de Snounou *et*

al.,1999 com algumas modificações. É uma PCR aninhada (*Nested PCR*), baseada em duas ampliações, onde utilizou-se o produto da 1ª reacção genérica *Plasmodium sp.* para realização da 2ª reacção específica para *P. falciparum*. Na primeira reacção amplificou-se o fragmento usando um par de iniciadores rPLU5 5'-CTTGTTG TTGCCTTAAACTTC-3' e rPLU6 5'-TTAAAAT TGTTGCAGTTAAAACG-3' e na segunda reacção amplificou-se o fragmento usando um par de iniciadores rFAL1 5'-TTAAACT GGTTTGGGAAAACCAATAT-3' e rFAL2 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTAC CCGTC 3'. A amplificação foi realizada usando o termociclador *Eppendorf® MasterCycler gradient*. O volume final da primeira reacção foi de 25 µl, contendo 1X do tampão 10X, 1,5mM de MgCL₂, 0,12mM de cada dNTP, 0,5U de *Taq polimerase*, 5 pmol de cada iniciador, 10-50 ng de ADN e na segunda reacção também foram 25 µl de volume final utilizando as mesmas concentrações dos reagentes da primeira reacção, e 1µl do produto de PCR da primeira reacção. Para a primeira reacção de amplificação foi feito o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial à 95° C por 5 min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação à 94° C por 1 min em 1, anelamento à 58° C por 2 min e extensão à 72° C por 2 min e após os 25 ciclos foi feita uma extensão final de 72° C por 5 min. Perfil térmico da segunda reacção: desnaturação inicial à 95° C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação à 94° C por 1 min, anelamento à 65° C por 2 min e extensão à 72° C por 2 min, seguidos de extensão final à 72° C 5 min.. Do produto de PCR da segunda reacção, 8 µl foram corridos em gel de agarose 2% à 80 volts e posteriormente corado com brometo de etídio e visualizado através de luz Ultra Violeta (UV).

3.7.2.2. GENOTIPAGEM DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* UTILIZANDO OS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS MSP 1, MSP 2 E GLURP

As regiões altamente polimórficas, bloco 2 (região 2) do gene *msp 1* bloco 3 (região central) de gene *msp 2* foram amplificadas usando método *Nested PCR* e a região II do gene *glurp* foi amplificada usando o método *semi- Nested PCR* previamente descritos por Snounou *et al* (1999).

Os iniciadores utilizados nas reacções de PCR tanto para a amplificação dos blocos específicos de cada gene quanto para a amplificação das famílias alélicas estão especificados na tabela 1. Resumidamente, a primeira reacção foi feita utilizando-se, 1X

de tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, 0,12 mM de cada dNTP, 0,5U de *taq polimerase*, 0,025mM de cada iniciador e 10-50ng de ADN em um volume final de 25µl. Na segunda reacção as concentrações foram as mesmas que na primeira reacção com exceção de 1µl do produto da primeira reacção. O perfil térmico da primeira reacção de PCR foi: um ciclo inicial de desnaturação à 95° C por 5 min, seguidos de 24 ciclos de desnaturação à 94° C por 1 min, anelamento à 58° C por 2 min e extensão à 72C por 2 mine uma extensão final 72° C por 5 min. O perfil térmico da segunda reacção foi: desnaturação inicial de 95° C por 5 min, anelamento à 58° C por 1 min, extensão 72° C por 1 min, seguido de extensão final à 72° C por 5 min. O produto final da segunda PCR foi analisado em gel de agarose 2%, corada com brometo de etídio e visualizado sobre a luz ultravioleta. Os pesos moleculares dos produtos da PCR foram estimadas baseadas na sua mobilidade relativa ao tamanho padrão do ADN (8). A frequência alélica foi calculada baseada na presença de duas ou mais bandas do mesmo marcador molecular em uma amostra.

Tabela 1: Iniciadores usados na reacção em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação dos genes que codificam as proteínas MSP 1, MSP 2 e GLURP de *P. falciparum* (7,56).

Gene		Iniciadores	Sequencias 5'-3'
<i>msp 1</i>	Bloco 2	M1-OF	CTA GAA GCT TTA GAA GAT GCA GTA TTG
		M1-OR	CTT AAA TAG TAT TCT AAT TCA AGT GGA TCA
	família K1	M1-2KF	AAA TGA AGA AGA AAT TAC TAC AAA AGG TGC
		M1-2KR	GCT TGC ATC AGC TGG AGG GCT TGC ACC AGA
	família MAD20	M1-2MF	AAA TGA AGG AAC AAG TGG AAC AGC TGT TAC
		M1-2MR	ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA ATT ACC
	família RO33	M1-2RF	TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG
		M1-2RR	CAT CTG AAG GAT TTG CAG CAC CTG GAG ATC
<i>msp 2</i>	Bloco 3	M2-OF	ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA
		M2-OR	CTT TGT TAC CAT CGG TAC ATT CTT
	família IC ou 3D7	M2-FCF	AAT ACT AAG AGT GTA GGT GCA A/GAT GCT CCA
		M2-FCR	TTT TAT TTG GTG CAT TGC CAG AAC TTG AAC
	família	M2-ICF	AGA AGT ATG GCA GAA AGT AAG/T CCT C/TCT ACT

	FC27	M2-ICR	GAT TGT AAT TCG GGG GAT TCA GTT TGT TCG
<i>glurp</i>	Região II	G-OF	TGA AAT TGA AGA TGT TCA CAC TGA AC
		G-OR	GTG GAA TTG CTT TTT CTT CAA CAC TAA
		G-NF	TGT TCA CAC TGA ACA ATT AGA TTT AGA TCA

3.7.2.3. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CLONES DO PARASITA POR AMOSTRA

Se o isolado tiver um alelo em cada um dos 3 loci, essa amostra será considerada como infecção monoclonal. A multiplicidade de infecção (MOI) ou número mínimo de clones de parasitas por amostra será calculada como o quociente entre o número total de genótipos de *P. falciparum* para cada marcador numa região e o número de amostras positivas por PCR.

O processamento das amostras para este trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz no Rio de Janeiro e o acondicionamento e o armazenamento inicial das amostras ocorreu no Laboratório de Parasitologia, do Instituto Nacional de Saúde em Maputo, Moçambique com o apoio das duas Instituições acima mencionadas e da Organização Mundial da Saúde.

3.7.3. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram introduzidos através de dupla entrada e analisados usando pacote estatístico SPSS V16.0. As variáveis categóricas foram analisadas usando os testes de Qui quadrado (χ^2) com correção de Yates para proporções e em caso de valores esperados menores que cinco foi feito o teste exato de *Fisher*. Para variáveis contínuas foram realizadas análises de distribuição de frequências, medidas de tendência central (médias e medianas), medidas de dispersão (variância e desvio padrão) e teste t de *Student* para comparação de médias. Para correlação de duas variáveis numéricas foi usado o teste de *Spearman*. Para comparação entre três grupos foi usado o teste *Kruskal Wallis*. Os haplotipos foram calculados através de combinação de vários genótipos e famílias alélicas (Tabela de contigências). Em todos os casos foi considerado como estatisticamente significativo um valor de p menor de 0,05.

3.7.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras de sangue no papel de filtro usadas no presente estudo foram obtidas de um estudo mãe intitulado 'Eficácia e segurança de Artemether- Lumefantrina no tratamento da malária não complicada por *Plasmodium falciparum*' aprovado pelo Comité Nacional de Bioética em Saúde (CNBS) de Moçambique com número 115/CNBS/2014. Para cada criança elegível para participar do estudo, um consentimento informado escrito foi assinado pelos pais ou responsável legal da mesma. No protocolo mãe consta a informação sobre a utilização das amostras para amplificação por PCR do ADN e análise dos genes propostos no presente trabalho. Os resultados deste estudo não tem influência para os cuidados dos participantes e foram usados para determinar a diversidade da população de plasmódios nas diferentes regiões em estudo.

4. RESULTADOS

4.1. DADOS DEMOGRÁFICOS

Amostras de 176 crianças menores de cinco anos com malária não complicada por *P. falciparum* domiciliadas nos distritos de Chókwè e Moatize foram colhidas entre fevereiro e março de 2015 (obtidas de um estudo mãe intitulado 'Eficácia e segurança de Artemether- Lumefantrina no tratamento da malária não complicada por *Plasmodium falciparum*'). Essas amostras foram usadas para estudar a diversidade genética do *P.falciparum* nesta população. Para este estudo foram selecionadas 176 amostras de crianças, contudo apenas 163 (92.6%) amostras foram processadas com sucesso e 13 (7.3%) apresentaram material insuficiente para o processamento. Destas, 88 (53,9%) amostras eram provenientes do distrito de Chokwé e 75 (46,1%) amostras eram provenientes do distrito de Moatize. A **tabela 2**, mostra as características da população de estudo de acordo com o sexo, proveniência, idade e resultados laboratoriais relativos ao diagnóstico molecular da malária. Do total de pacientes incluídos no estudo, 87 (53,4%) eram do sexo masculino, 75 (46%) do sexo feminino e 1 (0.6%) não tinha a informação. A média de idades foi de 3 [IC 95% (2,86- 3,26)] anos de idade.

Todas as 163 amostras positivas para *P. falciparum* através do gota espessa foram confirmadas positivas para *P. falciparum* pela técnica de PCR (**Figura 6**). A densidade

parasitária mostrou-se alta neste estudo com uma média de 42.832 (37.246-48.417) parasitas por microlitro de sangue (P/ μ l).

Tabela 2: Características demográficas e laboratoriais dos pacientes do estudo.

CARACTERÍSTICAS	SUBGRUPO DE VARIÁVEIS	VALORES
SEXO	Masculino	87 (53.4%)
	Feminino	75 (46.0%)
PROVENIÊNCIA	Moatize	75 (46.0%)
	Chokwè	88 (54.0 %)
MÉDIA DE IDADE, EM ANOS		3.02 (2.86-3.26)
FAIXA ETÁRIA (ANOS)	<1	29 (18 %)
	1-3	57 (35 %)
	4-5	75 (46 %)
MÉDIA DE TEMPERATURA °C		37.97 (\pm 1.8)
MÉDIA DENSIDADE PARASITÁRIA (IC 95%)		42.832 (37.246-48.417)
PCR DIAGNÓSTICO (RESULTADO)	Positivo	N=163

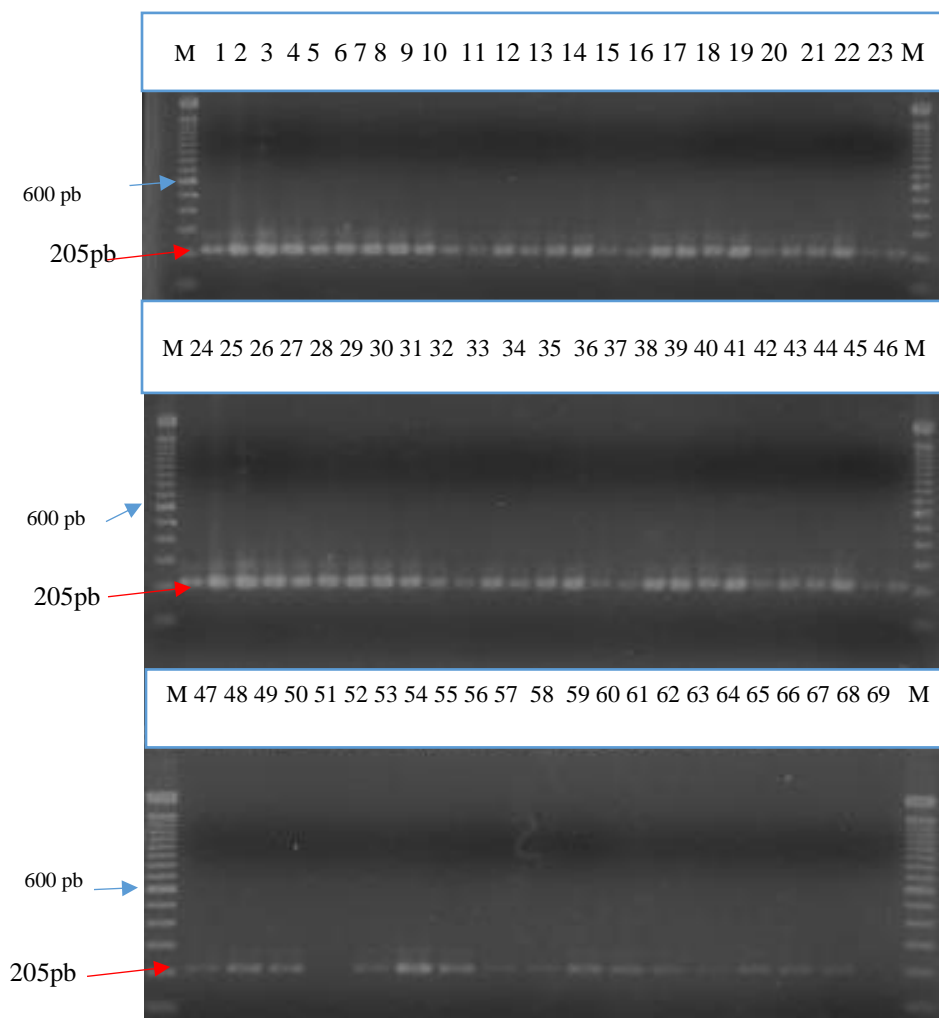


Figura 7: Electroforese de gel de agarose à 2% do diagnóstico molecular de *Plasmodium falciparum* por PCR. **Legenda:** M- Marcador de peso molecular 100pb; 1- controlo positivo *P. falciparum*; 2 á 68- amostras de participantes no estudo; 69- controlo negativo. Todas as 163 amostras apresentaram uma banda com aproximadamente 205bp sendo assim confirmadas como positivas para o *P. falciparum*.

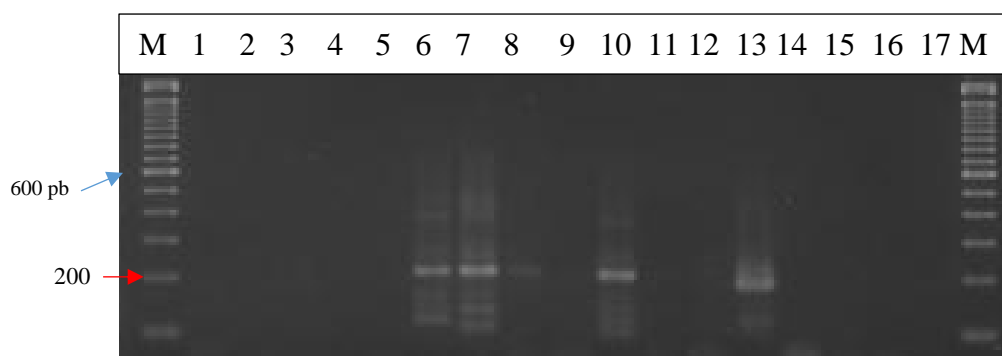
4.2. GENOTIPAGEM DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Do total das 163 amostras genotipadas para *P. falciparum* usando a técnica *Nested PCR* e *Semi- Nested PCR*, 154 (94,5%) amplificaram para o gene *msp 1*, 153 (93,9%) amplificaram para o gene *msp 2* e 122 (74,8%) para o gene *glurp*. Os genótipos foram identificados de acordo com o tamanho dos fragmentos, sendo que cada fragmento (banda) correspondia a um genótipo diferente.

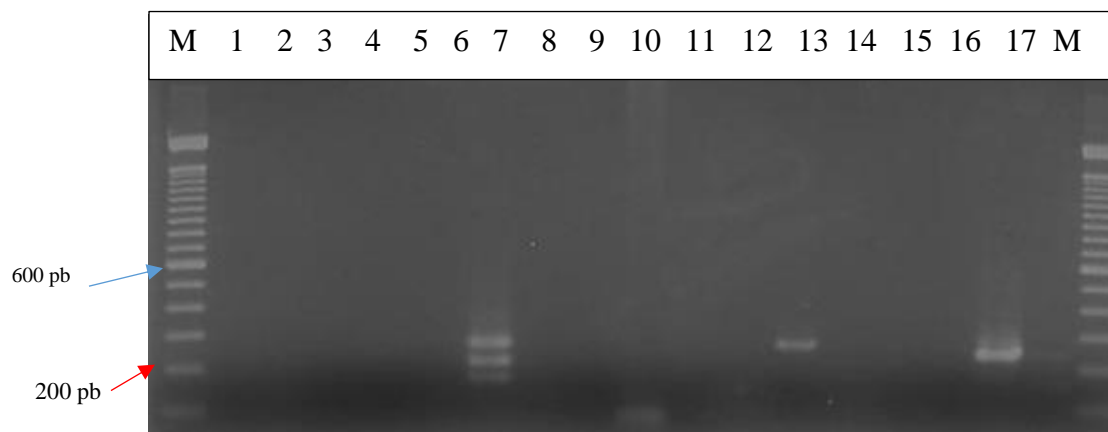
4.2.1. IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GENE *MSP1* E DESCRIMINAÇÃO DAS FAMÍLIAS ALÉICAS K1, MAD20 E RO33

Para o gene *msp 1* foram detectados 17 genótipos diferentes nas 154 (94,5%) amostras amplificadas com sucesso (Figura 7), divididos entre as três famílias alélicas. Das amostras genotipadas para o gene *msp 1*, a família alélica K1 foi detectada em 118 isolados de *P. falciparum*, com 6 alelos; a família MAD20 foi detectada em 63 isolados, com 6 alelos; família RO33 foi detectada em 78 isolados com 5 alelos diferentes.

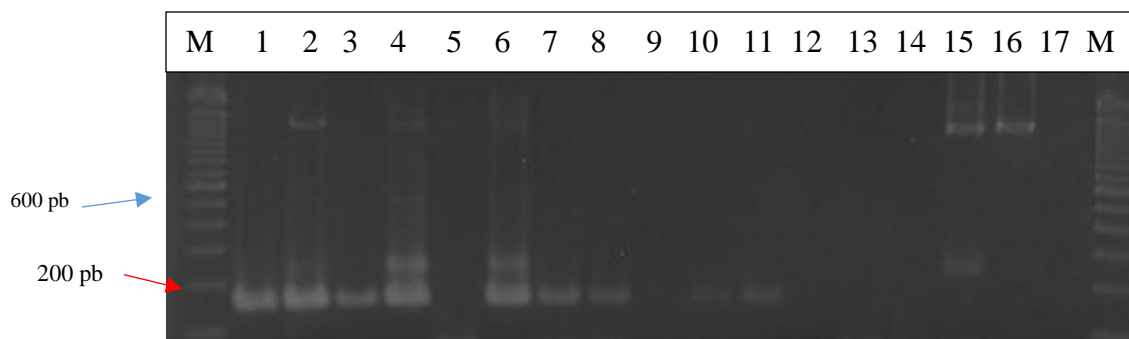
O tamanho de fragmentos amplificados para o gene *msp 1* variaram de 190-350 pb para K1, 150- 400 pb para MAD20 e 180-480pb para RO33 (Figura 8). Os alelos mais frequentes na família K1 se encontravam entre 280-300 pb, na família MAD20 entre 180-200pb e na família RO33 entre 160-180 pb.



A



B



C

Figura 8: Electroforese em gel de agarose à 2% da genotipagem do gene *msp1*, e discriminação das três famílias alélicas. **Legenda:** M- Marcador de peso molecular 100pb; 1 à 17- amostras clínicas. **A.** Família alélica RO33 com bandas que variam de 180 à 480pb **B.** Família alélica K1 com tamanho de bandas de 190 à 350pb **C.** Família alélica MAD20 (bandas de 150 à 400pb). A família alélica RO33 mostrou-se menos variável, monoclonal.

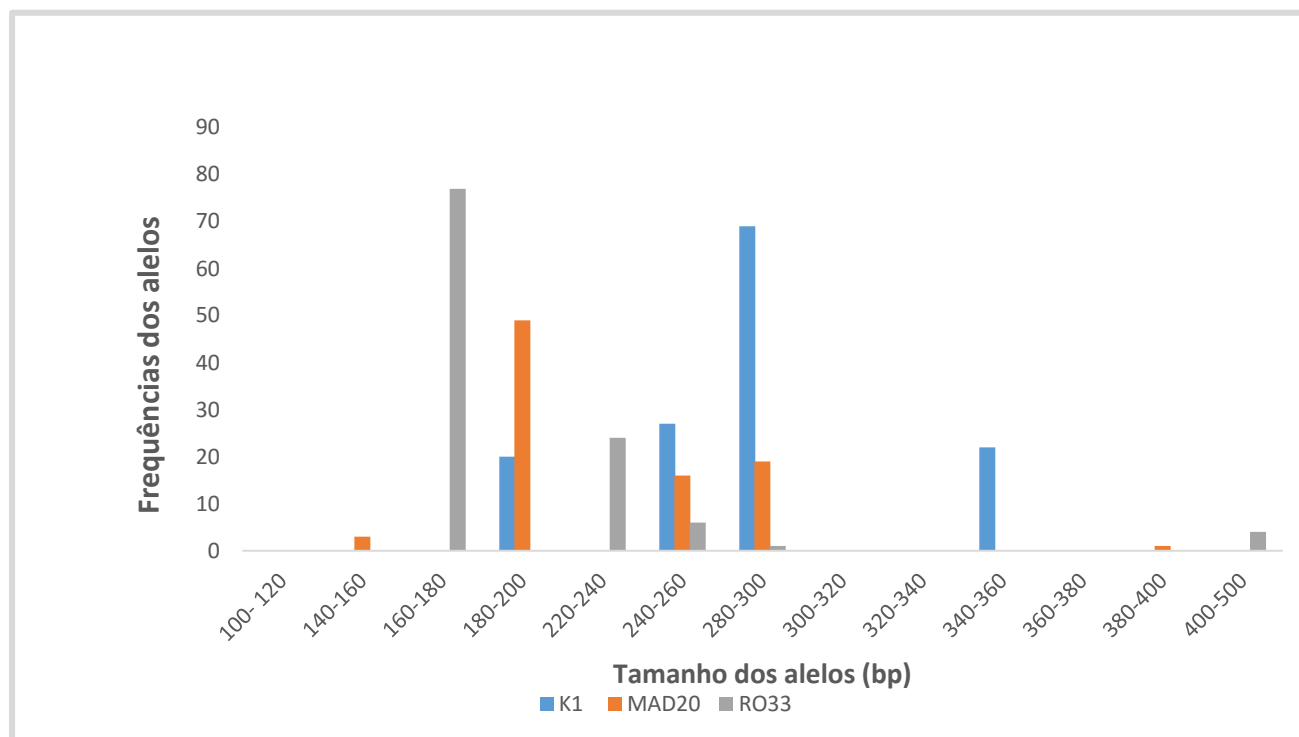
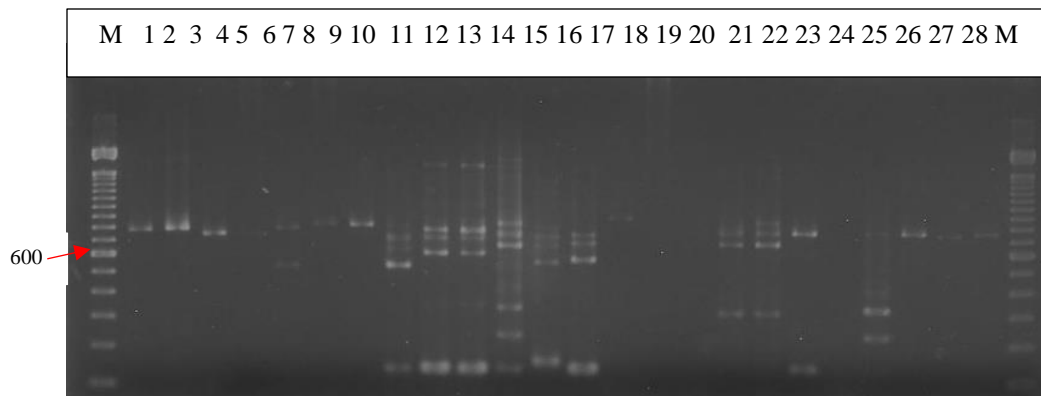


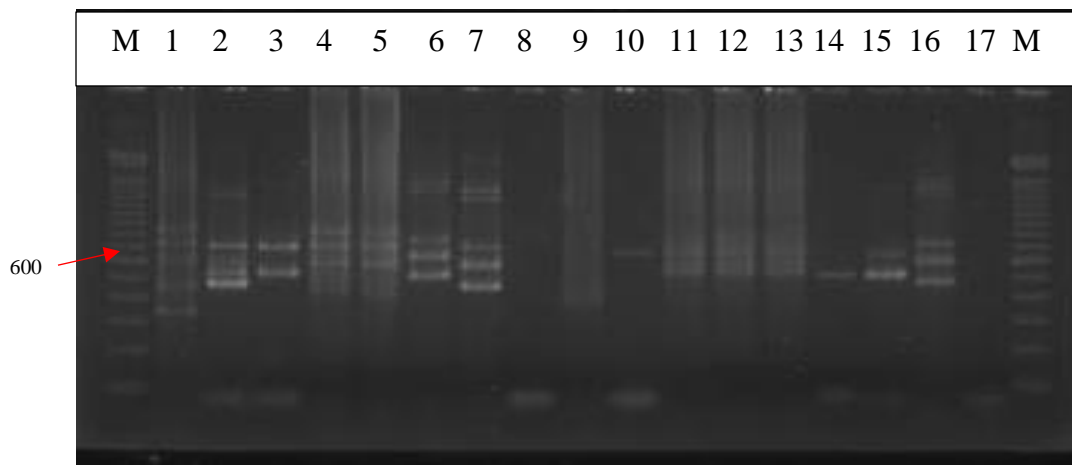
Figura 9: Frequência alélica das 3 famílias do gene *msp 1*. O RO33 mostrou-se mais predominante no intervalo entre 160-180 pb.

4.2.2. IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GENE *MSP 2* E DESCRIMINAÇÃO DAS FAMÍLIAS ALÉLICAS IC/3D7 E Fc27

Foram genotipadas com sucesso 153 (93,9%) amostras clínicas para o gene *msp 2*, sendo que 123 pertencem à família FC27 e 136 são da família IC/3D7, e 32 genótipos identificados no total. A família alélica FC27 foi a mais polimórfica, com 18 genótipos quando comparados aos 14 genótipos pertencentes à família alélica IC/3D7. Os fragmentos variaram de 180 à 800 pb para a família FC27, com maior frequência no intervalo de 350 à 400 pb; e de 300 à 800 pb para a família IC/3D7 sendo que os alelos com maior frequência foram encontradas entre o intervalo de 500 à 550 pb..



A



B

Figura 10: Electroforese em gel de agarose 2% da genotipagem do gene *msp2* e discriminação das famílias alélicas. **Legenda:** M- Marcador de peso molecular 100pb; **A:** 1 a 28- amostras, família alélica FC27 e **B:** 1-17 amostras, família alélica IC/3D7. Do total de 163, 153 amostras amplificaram com sucesso.

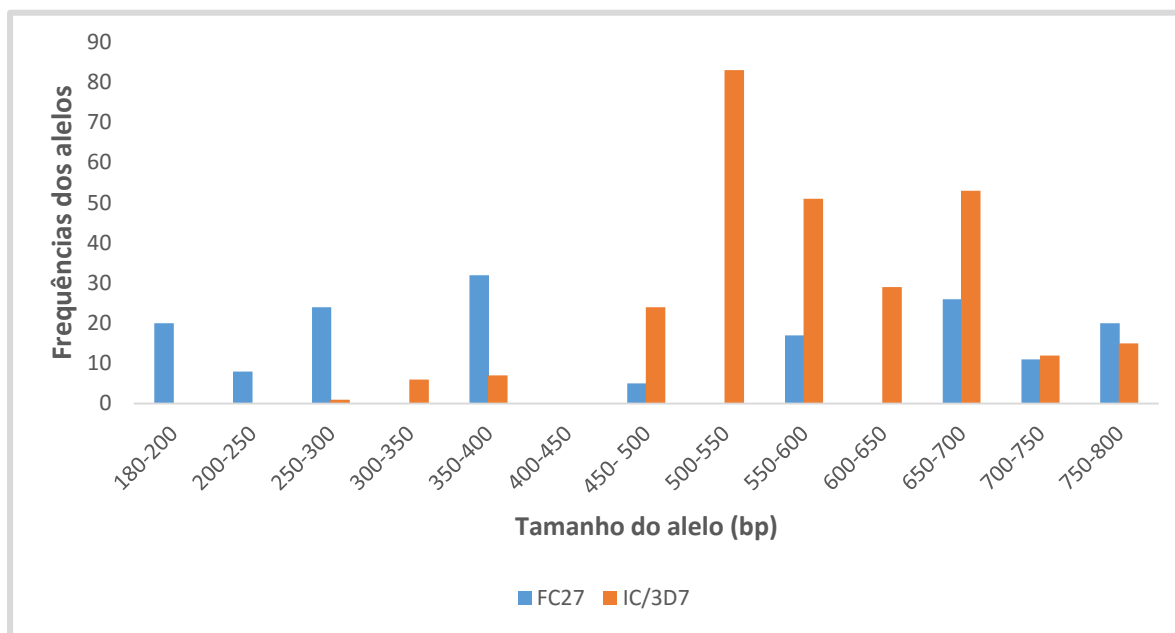


Figura 11: Frequência alélica das duas famílias FC27 e IC/3D7 do gene *msp 2*. O 3D7 aparece com maior frequência.

4.2.3. IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GENE *GLURP*

Para o gene *glurp* foram encontrados 5 genótipos diferentes dentre as 122 (74,8%) amostras genotipadas com sucesso. Os alelos identificados variaram de 700 à 1100 pb, com maior frequência no intervalo entre 900 à 1000 pb onde foram detectadas em 89 (54,6%) amostras e 9 (5,5%) amostras possuíam bandas com menor frequência entre 700 à 750 pb (**Figura 12**).

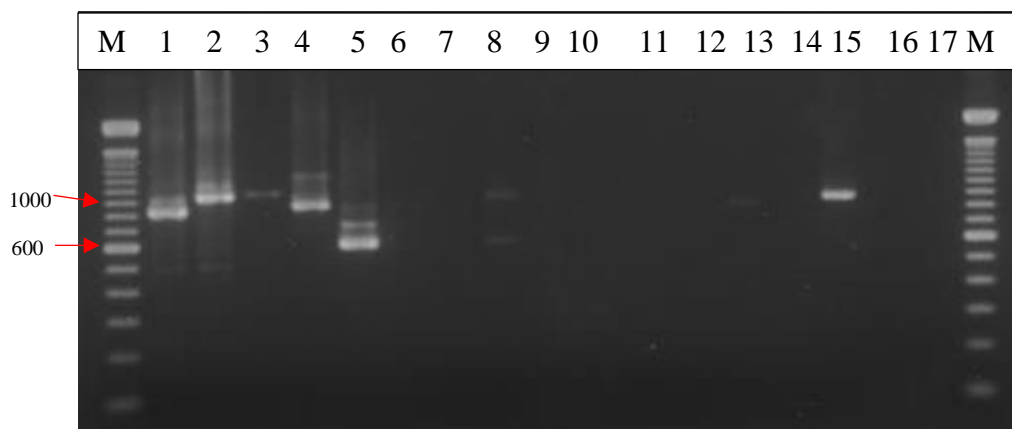


Figura 12: Electroforese em gel de agarose à 2% da genotipagem do gene *GLURP* de *P. falciparum*. Marcador de peso molecular 100pb.

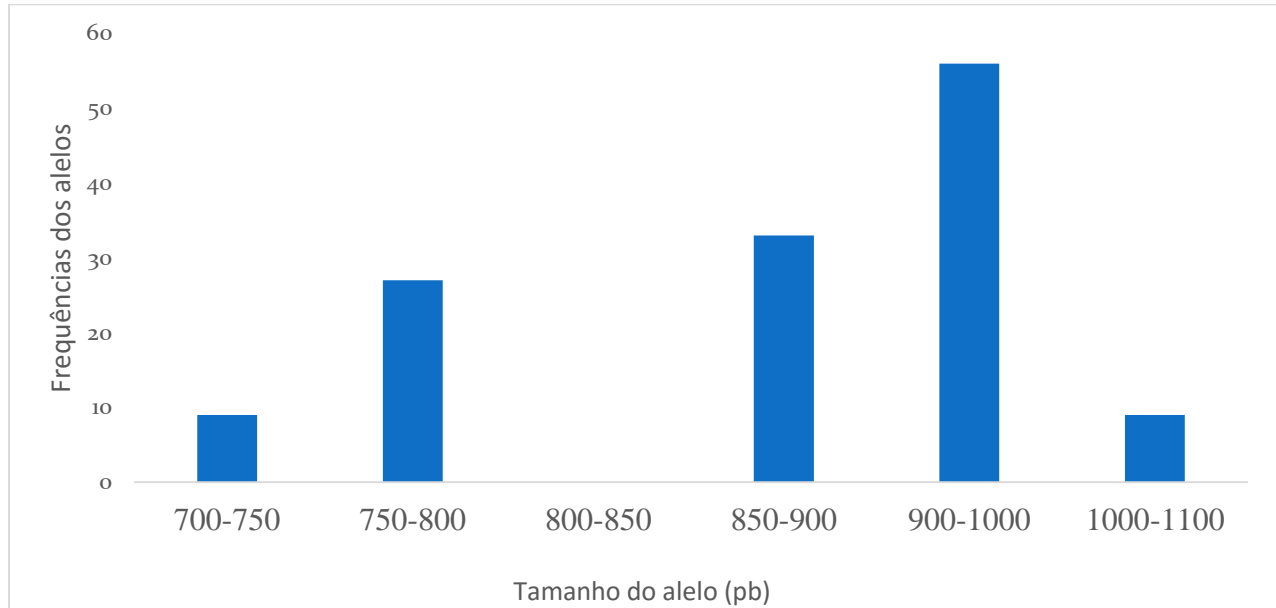


Figura 13: Frequências dos alelos da região II dos gene *glurp*. O tamanho de bandas que variaram entre 900 e 1000 pb mostrou-se com maior frequência.

4.3. MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO (MOI)

Foi encontrado um maior número de genótipos no gene *mSP2*, com 32 (59,3%) genótipos, quando comparadas aos 17 (31,5%) genótipos do gene *mSP1* e 5 (9,3%) genótipos para o gene *glurp*. Para *mSP1* foram identificadas infecções monoclonais da família alélica K1 em 94 amostras (79,7%), da família RO33 em 52 amostras (66,7%) e da família alélica MAD20 em 32 amostras (50,8%), isto é, foi detectado um único alelo para estas famílias para cada uma das amostras. Nas outras infecções policlonais para estas famílias foram detectadas de 2 a 4 alelos (Tabela 3)

No gene *mSP2*, a família alélica FC27 apresentou maior número de amostras com infecções monoclonais, 91 (74%), em relação à família 3D7 que teve 31 (22,8%) amostras com infecções monoclonais. A maior parte das amostras que amplificaram o gene *glurp*, 111 (91%) eram de infecções monoclonais. As famílias alélicas do gene *mSP2* foram as que apresentaram maior número de alelos por indivíduo, cerca de quatro alelos de uma

família em um indivíduo (**Tabela 3**). O maior número de genótipos encontrados numa única amostra, juntando os 3 marcadores moleculares foi de 10 genótipos.

Tabela 3: Número de alelos detectados para cada uma das famílias alélicas nas amostras estudadas.

Número de alelos detectados	Números de amostras								
	<i>msp 1</i>				<i>msp2</i>			<i>glurp</i>	
	K1	RO33	MAD20	Total	3D7	FC 27	Total	R11	Total
1	94	52	32	178	31	91	122	111	111
2	19	24	28	71	63	13	76	10	10
3	2	4	0	6	32	8	40	1	1
4	-	-	-	-	7	2	9	-	-

A média de multiplicidade de infecção (MOI) foi calculada usando dados de cada um dos três marcadores moleculares em cada amostra. Para *msp 1* foi 2,3, *msp 2* foi 2,7 e para *glurp* foi de 1,1 como é apresentado na **Figura 13**. O intervalo de número de genótipos encontrados por indivíduo no distrito de Chókwè foi de 1 a 9 genótipos e no distrito de Moatize foi de 2 a 10 genótipos. A média de multiplicidade de infecção observada nas duas regiões foi 5,44 para Moatize e 5.61 para Chókwè (P=0,65). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as MOI das duas regiões (Moatize e Chókwè), provavelmente a média de MOI nas duas regiões não são diferentes (p= 0,57).

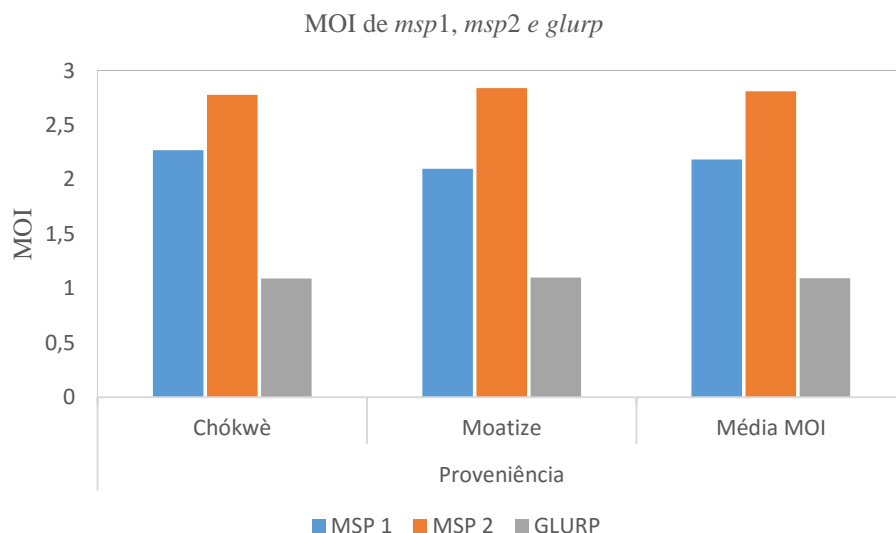


Figura 14: Comparação entre a multiplicidade de infecção (MOI) dos genes *m*sp 1, *m*sp 2 e *glurp* nas duas regiões (Moatize e Chókwe) de Moçambique. A MOI de *m*sp 2 quando comparada a *m*sp 1 foi igual para as duas regiões ($p=0,57$).

4.4. HAPLÓTIPOS

Das 163 amostras genotipadas, 160 (98,2%) apresentavam múltiplos clones e 3 (1,8%) eram monoclonais. As infecções múltiplas foram encontradas em 68,2% (105/154) das amostras genotipadas para o gene *m*sp 1, em 83,7% (128/153) das amostras para o gene *m*sp 2 e em 9% (11/120) das amostras para o gene *glurp*. Para este estudo foram encontrados 17 pares de haplótipos. A combinação *m*sp1/ *m*sp 2/ *glurp* apresentou-se com o maior número de amostras, aproximadamente 107 amostras.

Tabela 4: Pares de haplótipos identificados após análise dos genótipos encontrados na população de estudo

Ordem	Pares de haplótipos			Número amostras com haplótipos
	<i>m</i> sp1	<i>m</i> sp2	<i>glurp</i>	
1	K1	IC/3D7	-	99
2	K1	FC27	-	86

3	K1	IC/FC27	-	75
4	K1	-	-	118
5	K1	-	<i>glurp</i>	94
6	K1/MAD20	IC/FC27	-	28
7	MAD20	IC/3D7	-	54
8	MAD20	FC27	-	49
9	MAD20	IC/FC27	-	43
10	MAD20	-	-	63
11	MAD20	-	<i>glurp</i>	50
12	MAD20/RO33	IC/FC27	-	23
13	RO33	IC/3D7	-	68
14	RO33	FC27	-	65
15	RO33	IC/FC27	-	57
16	RO33	-	-	78
17	RO33	-	<i>glurp</i>	57
18	-	IC/3D7	-	136
19	-	FC27	-	123
20	-	-	<i>glurp</i>	122
21	-	IC	<i>glurp</i>	111
22	-	FC27	<i>glurp</i>	101
23	<i>m_{sp}1</i>	<i>m_{sp}2</i>	<i>glurp</i>	107

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO E DENSIDADE PARASITÁRIA

Neste estudo o impacto da densidade parasitária no número de clones por indivíduo, média de multiplicidade de infecção (MOI) não foi estatisticamente significativo ($P=0,682$).

4.6. RELAÇÃO ENTRE MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO E IDADE

As crianças na faixa etária menor de 1 ano apresentaram maior média de número de genótipos, 2.24 para *m_{sp} 1* e 2.97 para *m_{sp} 2*. As maiores médias de multiplicidade de infecção foram encontradas para o gene *m_{sp} 2* em todas as faixas etárias, contudo não

foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na média de multiplicidade de infecção de *msp 1*, *msp 2* e *glurp* entre si nas diferentes faixas etárias estudadas ($p=0.088$). As médias de multiplicidade foram relativamente,mas não estatisticamente, inferiores na faixa etária de 1 aos 3 anos. Resumidamente não existe relação entre a idade e a média de multiplicidade de infecção.

Tabela 5: Média de multiplicidade de infecção dos diferentes genes estratificada por idade. $p= 0.088$.

Idade (Anos)	Número de amostras	Média de Multiplicidade de infecção		
		<i>msp 1</i>	<i>msp 2</i>	<i>glurp</i>
Menos de 1	29	2.24	2.97	0.72
De 1 a 3	57	2.02	2.70	0.68
De 4 a 5	75	2.09	2.47	0.77
Valor de p		$p= 0.73$	$p= 0.18$	$p=0.51$

5. DISCUSSÃO

Em Moçambique, a malária é uma doença altamente endêmica sendo um dos principais problemas de saúde pública contribuindo com cerca de 45% de todos casos de consultas externas, aproximadamente 56% dos internamentos nas pediatrias e cerca de 26% do total de mortes nos hospitais. A maior parte dos casos são devidos ao *P. falciparum* (57). Estudar a epidemiologia molecular da malária se torna importante numa região pois ajuda na compreensão da dinâmica da transmissão da doença e produz informações úteis para a escolha de estratégias de controlo adequadas e específicas para cada região, avaliando parâmetros associados ao *P. falciparum* tais como a resistência aos anti maláricos, imunidade, impacto das intervenções que vem sendo usadas no país e na interpretação dos resultados dos estudos de vacina contra a malária (58). Este estudo trouxe-nós a estimativa da diversidade genética nas populações de *P. falciparum* circulantes nos distritos de Chókwè e Moatize em Moçambique mostrando que o número de genótipos circulantes em Chókwè e em Moatize foi de 54 durante o período de estudo.

A diversidade genética do parasita varia de acordo com as características epidemiológicas das áreas malarígenas (14). A dinâmica das populações de parasitas numa determinada região permite inferir a intensidade da transmissão de malária. Com o alto grau de diversidade genética do *P. falciparum* encontrado neste estudo observa-se que existe um elevado número de genótipos diferentes, suficiente para garantir a manutenção da recombinação genética e conseqüente elevada transmissão da doença (47). Um estudo realizado em Gabão em uma zona endêmica para a malária, e comparado com Coté d' Ivoire, uma área não endêmica, mostrou que o alto nível de diversidade genética esta directamente ligado aos altos níveis de transmissão da malária (59). Pesquisas realizadas em quatro localidades da Colômbia (considerada como uma área de malária meso ou hipoendêmica) verificaram que numa das localidades foi encontrado um maior número de genótipos comparativamente as outras três localidades e isto pode estar relacionado com uma maior incidência de malária nessa região (7).

Para estudar a diversidade populacional do *P. falciparum*, vários pesquisadores têm optado pelo método de genotipagem usando genes altamente polimórficos que sofrem uma pequena mutação apenas em determinadas regiões; deste modo podemos saber quantas populações do parasita estão circulantes através da identificação das famílias alélicas de cada gene (54). Os marcadores moleculares que têm sido geralmente usados para a genotipagem de *P. falciparum* são as sequências polimórficas dos genes *msp 1*, *msp 2* e *glurp*, devido ao seu alto grau de polimorfismo espelhado deste modo às populações de parasitas circulantes (54). As proteínas de superfície do merozóito (MSP) 1 e 2 do *P. falciparum* são os principais antígenos sanguíneos candidatos à vacina e seus genes (*msp 1*, *msp2* e *glurp*) são considerados excelentes marcadores genéticos para identificação de subpopulações de parasitas. Em um estudo realizado por Yuan *et al.*, (2013) numa região endêmica de Myanmar foram identificados cerca de seis genótipos do *glurp* e os autores consideraram necessária a introdução deste marcador nos estudos de diversidade genética para que nos traga acréscimos na detecção da diversidade. Para este estudo, foram usados os três marcadores moleculares altamente polimórficos, *msp 1*, *msp 2* e *glurp* com o objetivo de se obter uma taxa de detecção da diversidade genética em diferentes alelos, pois o uso de um único marcador pode subestimar a diversidade genética dos parasitas nas infecções (12).

Vários estudos na Ásia observaram que o uso dos três marcadores moleculares (*msp 1*, *msp 2* e *glurp*) mostravam uma extensa diversidade genética e um elevado grau de multiplicidade de infecção (MOI), o que vem reforçar o uso destes marcadores para a estudar a população de parasitas circulantes na região (5,12). No estudo feito por Yuan *et al.* (2013), a genotipagem dos genes *msp 1* e *msp 2* mostrou que 30,1% e 21,3% de indivíduos, respectivamente, apresentavam-se infectados com mais de um genótipo de *P. falciparum* e 1,6 % com *glurp*. O estudo de Atroosh *et al.*, (2011) mostrou que as frequências das famílias alélicas do gene *msp 1* era mais alta que as do gene *msp 2* e as famílias predominantes de *msp 1* e *msp 2* foram RO33 e 3D7, respectivamente.

Em outros estudos foi encontrado um cenário completamente oposto ao citado anteriormente com um número maior de alelos do gene *msp2* e mais frequente que o *msp 1*; as famílias alélicas predominantes foram FC27 e K1 respectivamente. A família

alélica FC27 do gene *msp 2* foi a mais predominante, o que contrasta com a maior parte dos estudos realizados em regiões endêmicas para a malária, sugerindo que o 3D7 é o genótipo mais circulante em regiões endêmicas, como evidenciado em um estudo realizado em Tanzânia e vários outros realizados na África subsahariana, onde a família alélica 3D7 mostrou-se mais predominante em crianças com menos de cinco anos com malária não complicada (12,60) assim como na Tailândia onde o 3D7 mostrou-se mais frequente ou ainda na mesma proporção (8,16).

No nosso estudo, o gene *msp 2* foi o melhor marcador molecular para o estudo da diversidade genética dos parasitas quando comparado com os genes *msp 1* e o *glurp*. Foram detectados 32 genótipos diferentes do gene *msp 2*, sendo 18 genótipos da família FC27 e 14 genótipos da família IC/3D7. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em diferentes regiões da África Austral (12) e em Camboja (15). Em um estudo realizado com adultos em Chókwè, na província de Gaza, em 2013 foi observado a presença de 25 genótipos diferentes com um número bem menor de amostras (n=48) (51). O estudo de Barrera et al (2010) na Colômbia também observou que o gene *msp 2* é melhor marcador para diferenciar as infecções nessa área de baixa endemicidade. Nesse trabalho o gene *msp1* apresentou apenas uma família alélica, MAD20, e todas as amostras com infecção monoclonal para este marcador (fragmento de 187pb) enquanto que o gene *msp 2* mostrou-se presente em 96.3% das amostras. Estudos em Papua Nova Guiné também mostraram que o gene *msp 2* era o mais polimórfico e o mais informativo dos marcadores (61). Na nossa população, a família alélica RO 33 do gene *msp1* apresentou um baixo polimorfismo e esse resultado é idêntico aos achados em áreas com diferentes intensidades de transmissão em cinco países de África (12) e na Índia (43).

A variabilidade do gene *glurp* é baseado no polimorfismo de tamanho da região II; no nosso trabalho essa região mostrou ser bem polimórfica sendo identificados 5 genótipos que variaram de 700 pb à 1100 pb corroborando com estudos realizados por (7) na Colômbia onde obtiveram 5 genótipos com tamanhos de 633 à 1009 pb o que sugere que este gene pode ser usado como marcador genético para estudos sobre a dinâmica de populações de *P. falciparum*. O genótipo mais frequente nesse estudo estava no intervalo de 800 à 899 pb diferente do encontrado no nosso estudo onde o intervalo foi de 700 à

755 pb.

Multiplicidade da infecção (MOI)

Em áreas endémicas, onde a transmissão da malária é intensa a probabilidade de um indivíduo ser infectado com diferentes genótipos é muito alta (62). Quando o indivíduo se encontra infectado com vários genótipos diferentes em simultâneo ocorre a selecção natural dos mesmos que pode favorecer a transmissão efetiva de gametócitos sexuais para o mosquito como resultado da presença de alelos específicos que medeiam a sobrevivência do parasita dentro do mosquito. Em regiões que se distanciam apenas por poucos quilómetros pode-se observar a diversidade genética do parasita quando a intensidade de transmissão é alta (63,64). As infecções múltiplas podem ter influência no estado clínico do indivíduo (assintomático X sintomático), na gravidade da doença e pode ser afectado pela nível de endemicidade da malária, idade do paciente e pela imunidade adquirida (52,64).

Em Moçambique a transmissão da malária é considerada estável, isto é, as populações são expostas continua e constantemente à altas frequências de inoculação da parasita o que confere aos indivíduos uma imunidade parcial e um baixo risco de contrair a malária grave desde a infância, explicando deste modo a alta densidade parasitária encontrada nesta população de estudo com menos de 5 anos sem então desenvolver a malária grave (mDP=42.832).

Vários estudos mostraram que a MOI é dependente da idade do indivíduo (65–69). Os estudos de Yavo et al. (2016) mostraram a existencia de correlação entre idade e multiplicidade da infecção: quanto menor era a idade, menor era a MOI (decrécimo de MOI com a idade). Entretanto outro estudo observou que crianças menores de 5 anos apresentavam uma MOI mais alta quando comparadas a crianças maiores de 5 anos (60). Porém, este facto não se verifica em todos os estudos e parece ser dependente da endemicidade das áreas; em alguns casos, não se verifica correlação entre a idade e a MOI (70). No nosso estudo não verificamos a correlação entre a idade e a MOI, provalmente devido ao perfil da população de estudo, crianças menores de 5 anos.

Por ser um estudo seccional (transversal) não foi possível realizar um acompanhamento longitudinal dos nossos indivíduos nesta pesquisa. Somente usamos amostras do momento zero da infecção e por isso pode haver alguma limitação nos diferentes genótipos encontrados, dado que alguns trabalhos têm mostrado que o número de diferentes parasitas muda dependendo do dia da colheita das amostras pois alguns genótipos podem ser sequestrados e não são detectados numa única coleta. Para estabelecer de uma forma mais aproximada a multiplicidade de infecção num indivíduo é necessário usar amostras em momentos diferentes (como por exemplo coleta diária de amostras) do mesmo paciente para termos uma melhor ideia dos genótipos circulantes pois alguns genótipos vão desaparecendo ou aparecendo ao longo do tempo reflectindo população de parasitas circulantes e a complexidade das infecções (71).

Regiões endêmicas para a malária, quando comparadas a regiões não endêmicas, apresentam uma MOI muito alta (73). A multiplicidade da infecção (MOI) encontrada no nosso estudo é considerada alta sendo de 2,3 quando usado o gene *msp 1*, 2,7 para o gene *msp 2* e de 1,1 para o gene *glurp* o que sugere que a intensidade de transmissão é alta. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados em outras regiões de África, como é o caso a pesquisa sobre a diversidade genética realizado na Nigéria que obtiveram MOIs de 2,1, 2,2 e 1,3 para *msp 1*, *msp 2* e *glurp*, respectivamente (74). Na África austral a MOI de *msp 2* foi mais alta com 2,24 quando comparado com os *msp 1* (1,48) e de *glurp* (1,4) (12).

Vários autores já mostraram a relação entre a multiplicidade de infecção (MOI) e a densidade parasitária (DP). Vafa et al. (2008) observou, no Senegal, em crianças menores de 5 anos onde houve uma correlação significativa entre a MOI e a DP. Quanto maior era a densidade parasitaria maior era o número de genótipos por indivíduo. Contudo, na nossa população a MOI não está correlacionada com densidade parasitária, sendo esse resultado similar ao encontrado por (75) realizado em Benin, sobre a variabilidade genética de *msp 1* e *msp 2* em amostras clínicas de *P. falciparum* isoladas de crianças. Outro estudo realizado na Tanzânia em crianças menores de 5 anos com malária não complicada também mostrou uma fraca relação entre a MOI e DP, sem significancia estatística (60). Como nosso estudo estava aninhado à uma pesquisa para o monitoramento da eficácia terapêutica dos fármacos para a malária, existia a

necessidade de definição de intervalos de densidade parasitária para que o paciente fosse incluído na amostra. Este facto pode ter influenciado nossos resultados pois não foi possível comparar diferentes níveis de densidade parasitária com a MOI já encontrados em outros trabalhos.

Várias medidas de controlo têm sido levadas a cabo para redução dos casos de malária em Moçambique. Entre elas está o uso de rede mosquiteira, TIP, PIDOM, entre outras (76). Uma forma de monitorar os efeitos destas medidas de controlo é o estudo da dinâmica de populações de *P. falciparum* pois os níveis de diversidade genética e a multiplicidade de infecção dos parasitas de malária estão directamente relacionados com a intensidade de transmissão da malária. Apesar da redução de casos de malária em Moçambique verificada nos últimos anos, a elevada diversidade genética de *P. falciparum* encontrada, assim como os altos níveis de multiplicidade de infecção sugerem, como apontado anteriormente, que o tamanho das populações parasitárias e a intensidade de transmissão da malária continua muito alta, suficientes para permitir a recombinação do parasita favorecendo a diversidade genética do mesmo o que nos desperta atenção para intensificação das medidas de controlo.

Os genes *msp1*, *msp2* e *glurp* são marcadores moleculares recomendados para caracterização das populações de parasitas circulantes em uma determinada região através da genotipagem por PCR devido ao alto grau de polimorfismo nas suas sequências (49,56,77,78). Contudo a PCR é uma técnica com um poder discriminatório inferior às técnicas recentemente desenvolvidas como é o caso da eletroforese capilar, o que pode influenciar neste tipo de análise em que se pretende discriminar os genótipos de acordo com o tamanho de fragmentos (79). Os alelos pertencentes à mesma família variam no tamanho dos fragmentos e/ou nas suas sequências (80–82). A análise visual das bandas após a eletroforese e coloração do gel de agarose é subjectivo pois dependendo da tonalidade da banda esta pode ser vista como apenas uma ou mais, dependendo do analisador, representando uma limitante do uso deste método devido a possível convergência dos resultados. Em caso de tamanho de fragmentos similares mas não idênticos estes fragmentos podem ser classificados como iguais considerando-se apenas um alelo. A habilidade em distinguir dois alelos diferentes amplificados depende da resolução do método usado. O método de eletroforese capilar oferece melhor

resolução quando comparado ao método de eletroforese em gel de agarose (12,83). Segundo estudo realizado em Ghana onde foi observado que o uso da técnica PCR seguido de digestão por enzima (PCR-RLFP) para a genotipagem de clones do parasita, mostrou ter um maior poder de discriminação. O uso de enzima *HinfI*, resulta em bandas mais específicas que permite maior discriminação dentro das famílias alélicas (83)(60). Neste estudo encontrou-se uma alta diversidade genética do *P.falciparum* e multiplicidade de infecção, estes dados são consistentes com os obtidos em outros estudos realizados em área endêmicas e de alta transmissão de malária. (3,84).

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram uma alta de diversidade genética de *P. falciparum* na região sul e centro de Moçambique. Houve maior diversidade genética no gene msp 2.

A média de multiplicidade de infecção (MOI) foi alta nas duas regiões usando os três genes.

A densidade parasitária não influenciou na multiplicidade de infecção. A multiplicidade de infecção também não foi influenciada pela idade e nem pela proveniência dos casos.

7. RECOMENDAÇÕES

Para os próximos estudos sugere-se o uso de uma técnica de PCR que efectua a medição do tamanho dos fragmentos de modo a permitir maior discriminação dos alelos numa determinada posição.

O sequenciamento das amostras permitirá obter informação exacta dos genótipos e das famílias alélicas.

Recomenda-se a realização de estudos de amostras colhidas em estudos transversais ou longitudinais que incluam amostras com densidades parasitárias em intervalos não limitados como o caso das amostras colhidas em estudos de eficácia terapêutica, com vista a analisar melhor a relação entre a densidade parasitária e a multiplicidade de infecção.

A diversidade genética encontrada é uma importante linha de base para estudos epidemiológicos, sobre a intensidade de transmissão da malária nestas regiões.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455–67.
2. WHO. World malaria report 2013 [Internet]. 2013. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/
3. WHO. World Malaria Report 2015. 2015.
4. IMM Inquerito Malaria 2007(Portuguese).pdf.
5. Kang J-M, Moon S-U, Kim J-Y, Cho S-H, Lin K, Sohn W-M, et al. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* field isolates from Myanmar. *Malar J* 2010. 2010;9:131:1–8.
6. Dahlstrom S, Aubouy A, Maiga-Ascofare O, Faucher J-F, Wakpo A, Ezinmegnon S, et al. *Plasmodium falciparum* Polymorphisms Associated with Ex Vivo Drug Susceptibility and Clinical Effectiveness of Artemisinin-Based Combination Therapies in Benin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jan 1;58(1):1–10.
7. Barrera SM, Pérez MA, Knudson A, Nicholls RS, Guerra ÁP. Genotypic survey of *Plasmodium falciparum* based on the *msp1*, *msp2* and *glurp* genes by multiplex PCR. *Biomedica*. 2010;30(4):530–8.
8. Yuan L, Zhao H, Wu L, Li X, Parker D, Xu S, et al. *Plasmodium falciparum* populations from northeastern Myanmar display high levels of genetic diversity at multiple antigenic loci. *Acta Trop*. 2013 Jan;125(1):53–9.
9. Atroosh WM, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MA, Saif-Ali R, Al-Mekhlafi AM, Surin J. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Pahang, Malaysia based on MSP-1 and MSP-2 genes. *Parasit Vectors*. 2011 Dec 13;4:233.
10. MMV. Medicine for Malária Venture. 2008.
11. WHO. WORLD MALARIA REPORT. WHO. GENEVA, SWITZERLAND; 2008.

12. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck H-P, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2011;10(1):79–88.
13. Mara SE, Silué KD, Raso G, N'Guetta SP, N'Goran EK, Tanner M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* among school-aged children from the Man region, western Côte d'Ivoire. *Malar J.* 2013;12(1):1.
14. Jiménez JN, Muskus CE, Vélez ID. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its implications in the epidemiology of malaria. *Biomédica.* 2005;25(4):588–602.
15. Gosi P, Lanteri CA, Tyner SD, Se Y, Lon C, Spring M, et al. Evaluation of parasite subpopulations and genetic diversity of the msp1, msp2 and glurp genes during and following artesunate monotherapy treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Western Cambodia. *Malar J.* 2013;12(1):403.
16. Congpuong K, Sukaram R, Prompan Y, Dornae A. Genetic diversity of the msp-1, msp-2, and glurp genes of *Plasmodium falciparum* isolates along the Thai-Myanmar borders. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014 Aug;4(8):598–602.
17. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* 2006 Feb;124(4):755–66.
18. Mohammed H, Mindaye T, Belayneh M, Kassa M, Assefa A, Tadesse M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on MSP-1 and MSP-2 genes from Kolla-Shele area, Arbaminch Zuria District, southwest Ethiopia. *Malar J.* 2015;14(1):73.
19. Antônio Carlos Lopes. *Tratado de Clínica Médica.* 1st ed. Vol. 2. São Paulo. Brasil: Roca; 2006. 5366 p.
20. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired Immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan 1;22(1):13–36.
21. WHO report 2016.pdf.

22. WHO, GM Programme, World Health Organization. World Malaria Report 2014. 2014.
23. Saúte F, Aponte J, Ahmeda J, Ascaso C, Vaz N, Dgedge M, et al. Malaria in southern Mozambique: incidence of clinical malaria in children living in a rural community in Manhica district. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(6):655–60.
24. Saúte F, Aponte J, Almeda J, Ascaso C, Abellana R, Vaz N, et al. Malaria in southern Mozambique: malariometric indicators and malaria case definition in Manhica district. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(6):661–6.
25. PNCM. Documento estratégico para o controlo da malária em moçambique. Moçambique: Ministério da Saúde; 2009 Jul p. 1–38.
26. CDC. CDC - Malaria - About Malaria - Disease [Internet]. 2014 [cited 2017 Feb 5]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
27. Oki M, Asai S, Saito-Nakano Y, Nakayama T, Tanaka Y, Tachibana H, et al. A Case of Quadruple Malaria Infection Imported from Mozambique to Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Jun 4;90(6):1098–101.
28. Bannister LH, Sherman IW. Malaria. In: eLS [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2001 [cited 2017 Feb 6].
29. CDC. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. 2016 [cited 2017 Feb 6]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
30. Kadekoppala M, Holder AA. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: The MSP1 complex and the MSP7 family. *Int J Parasitol.* 2010 Aug 15;40(10):1155–61.
31. Gomes AP, Vitorino RR, Costa A de P, Mendonça EG de, Oliveira MG de A, Siqueira-Batista R. Severe Plasmodium falciparum malaria. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(3):358–69.
32. WHO. WHO guidelines treatment malaria [Internet]. 2015. Report No.: 3. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf

33. Bassat Q, Guinovart C, Sigaúque B, Aide P, Sacarlal J, Nhampossa T, et al. Malaria in rural Mozambique. Part II: children admitted to hospital. *Malar J*. 2008;7(1):37.
34. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the immune system in humans. *Chem Immunol*. 2002;80:229–42.
35. Sanders PR, Gilson PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Nebl T, Carucci DJ, et al. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):40169–76.
36. Wright GJ, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion: Combining Function with Immune Evasion. *PLoS Pathog*. 2014 Mar 20;10(3):e1003943.
37. Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BMA-S, Baloch AH, Somanath SD, et al. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Nov;111(1):163–71.
38. Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, et al. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:37–42.
39. Holder AA, Blackman MJ. What is the function of MSP-I on the malaria merozoite? *Parasitol Today Pers Ed*. 1994 May;10(5):182–4.
40. Raj DK, Das BR, Dash AP, Supakar PC. Genetic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* in different malaria-endemic localities. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Sep;71(3):285–9.
41. Bourdy G, Willcox ML, Ginsburg H, Rasoanaivo P, Graz B, Deharo E. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? *Int J Parasitol*. 2008 Jan;38(1):33–41.
42. Berzins K, Anders RF. The malaria antigens. In: Wahlgren. Switz Harwood Acad Publ. 1999;181–216.

43. Hussain MM, Sohail M, Kumar R, Branch OH, Adak T, Raziuddin M. Genetic diversity in merozoite surface protein-1 and 2 among *Plasmodium falciparum* isolates from malarious districts of tribal dominant state of Jharkhand, India. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011 Dec;105(8):579–92.
44. Ferreira MU, Hartl DL. *Plasmodium falciparum*: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol*. 2007 Jan;115(1):32–40.
45. Høgh B, Thompson R, Zakiuddin IS, Boudin C, Borre M. Glutamate rich *Plasmodium falciparum* antigen (GLURP). *Parassitologia*. 1993 Jul;35 Suppl:47–50.
46. Maestre A, Arango E, Carmona-Fonseca J. Estado de la frecuencia alélica y la diversidad de *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 y glurp antes de la implementación de terapia combinada con artemisina en el Noroccidente de Colombia. *Colomb Medica*. 2013;44(4):208–13.
47. Kemp DJ, Cowman AF, Walliker D. Genetic Diversity in *Plasmodium falciparum*. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Elsevier; 1990 [cited 2016 Aug 29]. p. 75–149. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08601050>
48. Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic Diversity and Immune Evasion by Malaria Parasites. *Clin Vaccine Immunol*. 2004 Nov 1;11(6):987–95.
49. Hoffmann- Peyerl G, Jelinek T, Kilian A. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Health*. 2001;6:607–13.
50. Paganotti GM, Babiker HA, Modiano D, Sirima BS, Verra F, Konaté A, et al. Genetic complexity of *plasmodium falciparum* in two ethnic groups of burkina faso with marked differences in susceptibility to malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Aug 1;71(2):173–8.

51. Crisolgo de Jesus Salvador, Sonia Enosse, Martha Suarez. Diversidade genética de Plasmodium falciparum do gene que codifica a proteína MSP 2 em indivíduos HIV positivos em Moçambique. Moçambique; 2012.
52. Mayor A, Saute F, Aponte JJ, Almeda J, Gómez-Olivé FX, Dgedge M, et al. Plasmodium falciparum multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity. Trop Med Int Health. 2003;8(1):3–11.
53. Mayor A, Aponte JJ, Fogg C, Saúte F, Greenwood B, Dgedge M, et al. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. Malar J. 2007;6(1):3.
54. Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapirat P, Jarra W, Thaithong S, et al. Genotyping of Plasmodium falciparum isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. Bull World Health Organ. 1995;73(1):85–95.
55. PGM. Províncias e Distritos / Geografia de Moçambique / Moçambique / Início - Portal do Governo de Moçambique [Internet]. 2017 [cited 2017 Feb 6]. Available from: <http://www.portaldogoverno.gov.mz/por/Mocambique/Geografia-de-Mocambique/Provincias-e-Distritos>
56. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in Plasmodium falciparum populations in Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(4):369–74.
57. IDS. Inquérito Demográfico de Saúde. Ministério da Saúde. Moçambique.; 2011.
58. Kateera F, Nsobya SL, Tukwasibwe S, Mens PF, Hakizimana E, Grobusch MP, et al. Malaria case clinical profiles and Plasmodium falciparum parasite genetic diversity: a cross sectional survey at two sites of different malaria transmission intensities in Rwanda. Malar J [Internet]. 2016 Dec [cited 2016 Jun 24];15(1).

59. Yavo W, Konaté A, Mawili-Mboumba DP, Kassi FK, Tshibola Mbuyi ML, Angora EK, et al. Genetic Polymorphism of *msp1* and *msp2* in *Plasmodium falciparum* Isolates from Côte d'Ivoire versus Gabon. *J Parasitol Res* [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 21];2016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4823507/>
60. Kidima W, Nkwengulila G. *Plasmodium falciparum msp2* Genotypes and Multiplicity of Infections among Children under Five Years with Uncomplicated Malaria in Kibaha, Tanzania. *J Parasitol Res*. 2015;2015:1–6.
61. Felger I, Tavul L, Kabintik S, Marshall V, Genton B, Alpers M. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. 1994;2(79):106–16.
62. Snounou G, Beck H-P. The Use of PCR Genotyping in the Assessment of Recrudescence or Reinfection after Antimalarial Drug Treatment. *Parasitol Today*. 1998 Nov 1;14(11):462–7.
63. Konaté L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, et al. 5. Variation of *Plasmodium falciparum msp1* block 2 and *msp2* allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999 Feb 1;93(Supplement 1):21–8.
64. Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, et al. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J*. 2009;8(1):135.
65. Arnot D. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998 Dec;92(6):580–5.
66. Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, et al. Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis*. 1997 Apr;175(4):921–6.

67. Felger I, Irion A, Steiger S, Beck H-P. 2. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(Supplement 1):3–9.
68. Guerra-Neira A, Rubio JM, Royo JR, Ortega JC, Auñón AS, Diaz PB, et al. *Plasmodium* diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa). *Int J Health Geogr.* 2006 Jun 19;5:27.
69. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape J-F, Mercereau-Puijalon O. Age-Dependent Carriage of Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Antigen-2 Alleles in Asymptomatic Malaria Infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 Jan 1;52(1):81–8.
70. Vafa M, Troye-Blomberg M, Anchang J, Garcia A, Migot-Nabias F. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J.* 2008;7(1):17.
71. Jafari-Guemouri S, Boudin C, Fievet N, Ndiaye P, Deloron P. *Plasmodium falciparum* genotype population dynamics in asymptomatic children from Senegal. *Microbes Infect.* 2006 Jun;8(7):1663–70.
73. Jordan S, Jelinek T, Aida AO, Peyerl-Hoffmann G, Heuschkel C, Valy AO EI, et al. Population structure of *Plasmodium falciparum* isolates during an epidemic in southern Mauritania. *Trop Med Int Health.* 2001;6(10):761–6.
74. Olasehinde G, Yah C, Singh R, Ojuronbge OO, Ajayi A, Valecha N, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* field isolates from south western Nigeria. *Afr Health Sci.* 2012 Sep;12(3):355–61.
75. Ogouyèmi-Hounto A, Gazard DK, Ndam N, Topanou E, Garba O, Elegbe P, et al. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from children in South of Benin. *Parasite.* 2013 [cited 2017 Feb 9];20.

76. PNCM. Relatório Anual, 2015 Programa Nacional de Controlo da Malária. Maputo: PNCM; 2015.
77. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. 3. Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(Supplement 1):11–4.
78. Felger I, Smith T, Etoh D, Kitua A, Alonso P, Tanner M, et al. 6. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 Feb 1;93(Supplement 1):29–34.
79. Carlsson AM, Billy E Ngasala, Sabina Dahlström, Christopher Membi, Isabel M Veiga, Lars Rombo, et al. *Plasmodium falciparum* population dynamics during the early phase of anti-malarial drug treatment in Tanzanian children with acute uncomplicated malaria. *Malar J.* 2011;10:380:1–12.
80. Sheikh IH, Kaushal DC, Chandra D, Kaushal NA. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding 42kDa fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. *Acta Trop.* 2016 Jun 13;
81. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Mar;39(2):227–34.
82. Snewin VA, Herrera M, Sanchez G, Scherf A, Langsley G, Herrera S. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Dec;49(2):265–75.
83. Falk N, Maire N, Sama W, Owusu-Agyei S, Smith T, Beck H-P, et al. COMPARISON OF PCR-RFLP AND GENESCAN-BASED GENOTYPING FOR ANALYZING INFECTION DYNAMICS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jun 1;74(6):944–50.

84. Gupta P, Singh R, Khan H, Raza A, Yadavendu V, Bhatt RM, et al. Genetic Profiling of the Plasmodium falciparum Population Using Antigenic Molecular Markers. Sci World J. 2014 Oct 22;2014:e140867.