

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

Estudo comparativo da variabilidade genética de *Plasmodium vivax*
provenientes de infecções primárias e episódios de recaída após tratamento
com Primaquina e Cloroquina

por

Flávia Carolina Faustino de Araújo

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

DISSERTAÇÃO MBCM – CPqRR

F.C.F. ARAÚJO

2012

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

**Estudo comparativo da variabilidade genética de *Plasmodium vivax*
provenientes de infecções primárias e episódios de recaída após tratamento
com Primaquina e Cloroquina**

por

Flávia Carolina Faustino de Araújo

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

Orientação: Dra. Cristiana F. A. de Brito

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A658e Araújo, Flávia Carolina Faustino.
2012

Estudo comparativo da variabilidade genética de *Plasmodium vivax* provenientes de infecções primária e episódios de recaída após tratamento com Primaquina e Cloroquina / Flávia Carolina Faustino Araújo. – Belo Horizonte, 2012.

XV, 63 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 73 -78

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

1. Malária/genética 2. *Plasmodium vivax*/parasitologia 3. Marcadores genéticos/genética
4. Microssatélites/genética 5. Coinfecção/complicações I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

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

**Estudo comparativo da variabilidade genética de *Plasmodium vivax*
provenientes de infecções primárias e episódios de recaída após tratamento
com Primaquina e Cloroquina**

por

Flávia Carolina Faustino de Araújo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

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

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

Prof. Dr. Guilherme Corrêa Oliveira

Suplente: Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Dissertação defendida e aprovada em: 24/02/2012.

A Pedra

"O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no Homem!

*Não existe 'pedra' no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu
próprio crescimento."*

Autor: Antonio Pereira

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Rede malária Pronex – CNPq, MS-DECIT, Fapemig, Fapemat, Faperj e Centro de Pesquisas René Rachou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao dono da minha vida pela sua real presença, por suas grandiosas obras em minha vida e por cuidar sempre de mim nos mínimos detalhes. Deus, quero lhe oferecer minha gratidão como forma de louvor e honra ao teu nome.

Aos meus pais pelas orações, apoio, carinho e por estarem sempre ao meu alcance quando estendo os meus braços à procura de um abraço. São meus exemplos e mestres na arte de saber viver, como diz Thayná Thoni: É com lições da vida que aprendemos a viver, mas talvez haja um modo mais fácil, sempre que puder ouça conselhos, eles são muito valiosos.

Ao meu irmão Cristiano pela cumplicidade e apoio, à minha amada irmã Ana Paula por todo incentivo, por acreditar que sou capaz e me ensinar que a meta de todo profissional é ser o melhor do mundo naquilo que faz. Obrigada Ana por sonhar junto comigo. Ao Paulo, pelo carinho, pelos conselhos sábios e inspiradores que fazem dele uma pessoa admirável. À princesinha Melissa, pelos momentos de alegria e diversão que encantam a todos, com seu lindo sorriso.

À minha orientadora Dra. Cristiana quero agradecer principalmente por toda a paciência direcionada a mim e pelos ensinamentos que me fizeram crescer não somente como profissional, mas também como pessoa.

À Dra. Luzia pelo apoio, discussões, críticas e sugestões que me fizeram crescer e ver a ciência com olhar diferenciado, sua dedicação ao trabalho e à ciência são exemplos de um profissional que ama o que faz.

Ao Dr. Cór Fontes e ao Antonio Rezende por suas valiosas contribuições para o trabalho, além da Alice Sabatino que sempre me socorreu e sempre esteve pronta a me ajudar com sua fascinante competência.

Aos meus queridos amigos que mesmo distantes estão sempre presentes na minha vida, agradeço a vocês: Brenda Resende, Juliana Passos, Letícia Torres, Marcos Celírio, Izabela Ibraim e outros tantos que ocupam lugar especial em meu coração.

Agradeço a vocês por muitas vezes compreenderem minha ausência e me oferecerem apoio incondicional em todos os momentos.

Quero agradecer também a uma pessoa muito especial que foi um grande exemplo e inspiração para que eu escolhesse o caminho da ciência e pesquisa, foi ela quem deu o “empurrãozinho” motivador, o seu entusiasmo e paixão pelo seu trabalho são contagiantes a todos que tem o privilégio de conhecê-la. Obrigada Michelyne.

À todos os membros e colegas que pertencem ou pertenceram ao laboratório de malária: Isabela Cerávolo, agradeço pela amizade e carinho. Flávia Alessandra, o presidente Armando Menezes, Lara Cotta, Heverton Dutra (pequenino ser), Marina Lima, Daniela Costa, Taís Nóbrega, Luciano Andrade, o sinistro Ricardo Ribeiro, Aracele Souza, Carolina Parreira, Carolina Dantas, Fernanda Rezende, Fernanda Freire, Denise Anete, Daniela Gonçalves, Etiene Casagrande, Flora Kano, Jéssica Rafaela, Jéssica Saliba, Sarah Stela, Walison Eustáquio, Michaelis Tang, Luke Antony, Flávio Figueiredo, Júlia Pena, Paula Monalisa, Ana Carolina Aguiar, Nicolli Bellotti, Bruno Rocha, Bruno Sanchez, Maíra Neves, Geraldo, quero agradecer por me acolherem com carinho e fazem o ambiente de trabalho ser agradável.

Aos amigos do Festa e Folia pela amizade, carinho, e companheirismo. Cris, Regiane, Iara, Taísa, Agenor, Vinícius, Néia, Tania, Lilica, Mariângela, Malthon, Karen, e todos os membros do grupo que fazem meus finais de semana serem mais alegres.

Agradeço aos funcionários do CPqRR, à coordenação do curso de pós-graduação e aos professores pelo ensinamento e contribuição para o meu crescimento profissional bem como pela construção de um bom ambiente de trabalho. À plataforma PDTIS por contribuir significativamente neste trabalho.

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

Aos participantes do XVI Seminário Laveran & Deane sobre Malária, de 2011, e seu idealizador, Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, pela oportunidade de fazer parte desse evento importante e pelas intensas discussões que contribuíram de forma significativa para a construção deste trabalho.

A todos, enfim, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, expreso meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Panorama atual da malária.....	16
1.1.1 Situação epidemiológica mundial.....	16
1.1.2 Situação epidemiológica da malária no Brasil.....	17
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>.....	20
1.3 Tratamento da doença.....	24
1.4 Recaídas.....	26
1.5 Marcadores moleculares utilizados no estudo das recaídas	29
1.5.1 Microssatélites	30
1.5.2 Proteínas de superfície do merozoíto.....	31
1.5.2.1 Proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP1).....	31
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Grupo de indivíduos com recaída	35
4.2 Isolados de <i>Plasmodium vivax</i>	35
4.3 Amplificação e genotipagem dos microssatélites.....	36
4.4 Clonagem dos fragmentos	38
4.5 Análise dos resultados.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7 REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Risco de transmissão de malária em diferentes regiões do mundo.....16
- Figura 2. Mapa do Brasil indicando as áreas de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual em 2009 – IPA (Brasil, 2009).....18
- Figura 3. Número de casos (x 1.000) registrados de Malária no Brasil no período de 1960-2010.....20
- Figura 4. Ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*.....22
- Figura 5. Formas hepáticas do ciclo biológico do *Plasmodium vivax*.....23
- Figura 6. Caracterização de perfil de recaída quanto ao número e intervalo de tempo de ocorrência das recaídas nas diferentes regiões do mapa mundial.....27
- Figura 7. Cepas de *Plasmodium vivax* e o intervalo de tempo entre a infecção primária e o episódio de recaída descrito em meses.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos microssatélites.....	37
Tabela 2. Iniciadores e condições de amplificação dos iniciadores.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMOVA	Análise Molecular de Variância
bp	Pares de Bases
CSP	Proteína Circunsporozoíta
DARC	Antígeno Duffy/Receptor para Quimiocinas
DBP	Proteína de ligação ao antígeno Duffy
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
He	Heterozigosidade Esperada
IPA	Incidência Parasitária Anual
KDa	QuiloDaltons
MS	Ministério da Saúde
MSP	Proteína de Superfície do Merozoíto
MSP	Proteína de Superfície do Merozoíto 1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos por restrição de fragmentos
rFU	Unidade Arbitrária de Fluorescência
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Base Única)
SVS	Serviço de Vigilância em Saúde
TRAP	Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina
WHO	World Health Organization

RESUMO

A malária humana é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Aproximadamente 40% da população mundial encontra-se em risco de infecção. No Brasil foram registrados 333.339 casos da doença em 2010, sendo 85% deles causados pelo *Plasmodium vivax*. O *P. vivax* apresenta uma característica importante em seu ciclo de vida, a possibilidade de desenvolver formas latentes no fígado, os hipnozoítos, que podem causar episódios de recaída. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos de latência e ativação dos hipnozoítos. Porém dados da literatura relatam uma correlação entre cepa do parasito e padrão de recaída, sugerindo uma programação genética dos parasitos. A escassez de marcadores genéticos para *P. vivax* tem dificultado as análises de importantes fenótipos do parasito, tais como os padrões de recaídas. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a variabilidade dos parasitos presentes nas infecções primárias e nos episódios de recaída. Sessenta e cinco amostras pareadas de 30 pacientes foram genotipadas utilizando 10 marcadores moleculares (08 microssatélites e os blocos 2 e 10 da MSP-1) através de eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA. Além disso, a presença de infecção múltipla nos pacientes foi confirmada através da clonagem dos fragmentos amplificados e genotipagem a partir de diferentes colônias. Na análise baseada nos alelos predominantes foi demonstrado que os parasitos da recaída são principalmente heterólogos em relação à infecção primária e que geralmente ocorre uma flutuação entre os alelos predominantes nos diferentes episódios do indivíduo. Entretanto, o número de alelos por marcador foi limitado e geralmente os alelos foram idênticos nos diferentes episódios da doença num mesmo paciente. A principal contribuição deste trabalho foi demonstrar uma alta taxa de infecções múltiplas tanto das infecções primárias como nas recaídas, pela primeira vez demonstrada, sendo que infecções múltiplas puderam ser identificadas com apenas 5 marcadores. A presença de repetidas recaídas após o tratamento cloroquina/primaquina pode sugerir presença de parasitos resistentes ao tratamento. Com estes resultados espera-se contribuir para o esclarecimento dos aspectos relacionados à diversidade genética dos parasitos das recaídas do *P. vivax*, que poderão ajudar no seu prognóstico, direcionamento o tratamento e auxiliando no controle da doença.

ABSTRACT

Human malaria is caused by protozoa from the genus *Plasmodium*. Approximately 40% of world population is at risk of infection. In Brazil, 333,339 cases of the disease were recorded in 2010 and 80% of these are caused by *Plasmodium vivax*. *P. vivax* presents an important characteristic in its life cycle which is the possibility to develop latent forms of the parasite, the hypnozoites which can cause relapses. Little is known about the mechanism of latency and activation. However, the literature reports a correlation between parasite strain and pattern of relapse, suggesting a genetic programming of parasites. The scarcity of genetic markers for *P. vivax* has hampered the analysis of important parasite phenotypes, such as patterns of relapse. In this context, the aim of this work was to study the variability of the parasites present in primary infections and relapse episodes. Sixty-five paired samples of 30 patients were genotyped using 10 molecular markers (08 microsatellites and blocks 2 and 10 of MSP-1) by capillary electrophoresis on an automated DNA sequencer. Moreover, the presence of multiple infections was confirmed by cloning of amplicons and genotyping of different colonies. We showed that relapse parasites are mainly heterologous compared to the ones of the primary infection and that a change in the alleles composition occurs in the different episodes of the individual. However, the number of alleles per marker was usually limited and the alleles were identical in the different episodes of the disease in the same patient. The main contribution of this work was to demonstrate a high rate of multiple infections both in primary infection and relapse, demonstrated for the first time, and multiple infections could be identified with only five markers. The presence of repeated relapses after treatment chloroquine / primaquine may suggest the presence of parasites resistant to treatment. With these results we hope to contribute to the clarification of aspects of the genetic diversity of parasites in relapses of *P. vivax*, which may help in the prognostic treatment guidance and ultimately help control disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama atual da malária

1.1.1 Situação epidemiológica mundial

A malária é considerada um grave problema de saúde pública no mundo e uma das mais importantes doenças infecciosas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, ocorrendo em mais de 106 países e territórios. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. As principais espécies que parasitam o homem são o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*.

Dos casos de malária registrados anualmente, 90% se concentram no continente africano e os outros 10% estão distribuídos na América Central e do Sul, sudeste asiático e ilhas da Oceania (WHO, 2009). Aproximadamente 225 milhões de casos e 781.000 mortes foram registradas em 2009 em decorrência da malária. Em torno de 91% das mortes ocorreram no continente africano, ocasionadas principalmente pelas formas graves da doença como a malária cerebral e a anemia grave sendo a maioria delas em crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2010).

Nas Américas, 60% dos casos notificados são do Brasil, os outros 40% estão distribuídos entre os países da América do Sul e Central, como demonstrado no mapa (Figura 1).

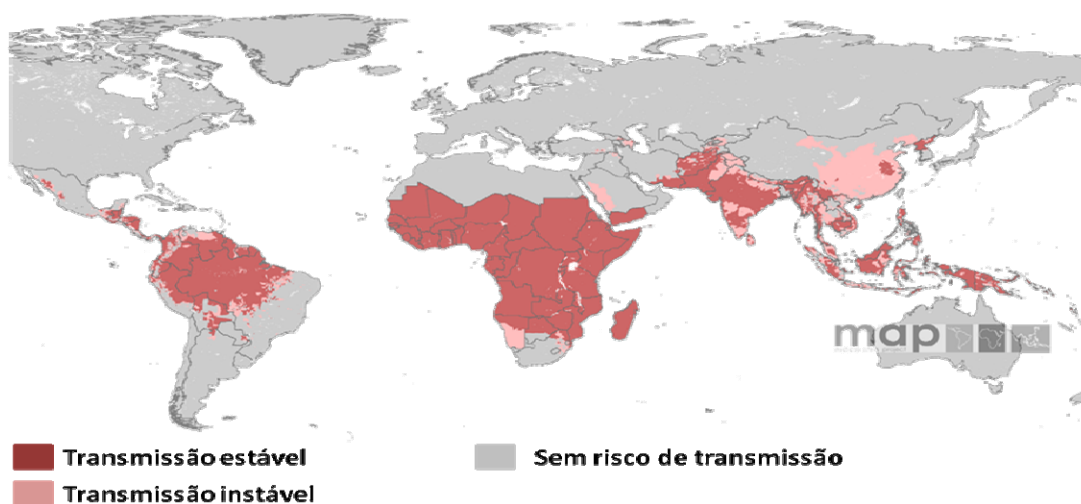


Figura 1. Risco de transmissão de malária em diferentes regiões do mundo. (Guerra, *et al.*, 2010)

Quarenta por cento da população mundial vive em áreas de transmissão e exposta ao risco de contrair a doença, que é de difícil controle devido a vários fatores, como a resistência dos parasitos às drogas e dos vetores aos inseticidas (Brasil, 2007; 2008).

1.1.2 Situação epidemiológica da malária no Brasil

O Brasil vem registrando notificações de cerca de 350 mil casos anuais de malária sendo 333.339 casos em 2010. Aproximadamente 99,8% desses casos se concentram na região da Amazônia Legal, composta pelos estados Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins. Estima-se que 49 milhões de pessoas estão em áreas de risco no país (Barbosa, 2011).

“O desenvolvimento intensificado da Amazônia nas décadas de 70 e 80 acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração de madeira e mineração. Nesta região, as precárias condições socioeconômicas da população migrante determinaram a rápida expansão da doença (Brasil, 2001).”

Em 2007, em apenas três estados, Amazonas, Rondônia e Pará foram registrados cerca de 350 mil casos, o que correspondeu a 78% das ocorrências naquele ano. Contudo, a maioria dos estados da Amazônia Legal apresentou redução, em 2007, na frequência de casos em relação ao ano anterior, exceto Amazonas e Mato Grosso (Brasil, 2008). Estes dados demonstram um caráter focal da doença cujos municípios de maior transmissão variam de ano para ano como resultado de diferentes fatores, tais como intensidade de chuvas, medidas de controle, entre outros (Figura 2).

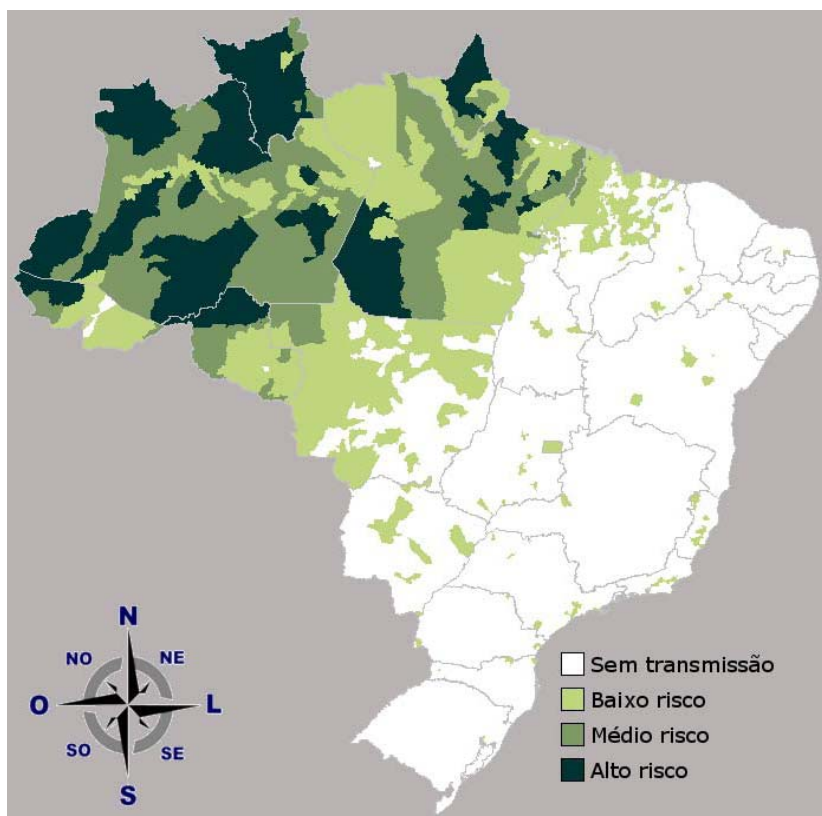


Figura 2. Mapa do Brasil indicando as áreas de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual em 2009 – IPA (Brasil, 2009).

A região extra-amazônica não é área endêmica para malária e apresenta uma média anual de 220 casos autóctones da doença desde 1999, sendo que, em 2007 houve uma incidência de 172 casos de malária nessa região. Os estados do Paraná, São Paulo e Espírito Santo estão constantemente sujeitos a ocorrência de surtos devido ao fluxo contínuo de pessoas vindas de áreas endêmicas dentro e fora do país (Brasil, 2008). Os estados localizados em áreas não endêmicas possuem fatores que favorecem a transmissão de malária, tais como: presença do vetor e fluxo migratório de indivíduos infectados das áreas endêmicas para as áreas não endêmicas. O fato destas populações desconhecerem a doença e a pouca familiaridade dos profissionais da saúde em relação ao diagnóstico e a terapêutica da malária, são fatores que levam a um prognóstico desfavorável, tornando a mortalidade alta nesta região (Brasil, 2007).

No Brasil, são encontradas três espécies que parasitam o homem: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo que cerca de 85% dos casos de malária registrados no ano de 2008 foram causados pelo *P. vivax* (Brasil, 2008). A transmissão do *P. falciparum*, espécie responsável pelas formas mais graves e letais da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos (Brasil, 2010a) (figura 3).

Na série temporal brasileira, a partir dos anos 60 pode ser observado que até 1976 foram registrados menos de 100 mil casos de malária por ano. A partir daquele ano, houve forte tendência na elevação do número de casos da doença em função da ocupação desordenada da região amazônica. Este incremento deveu-se também à implantação, na região, de projetos de colonização e mineração sem a necessária estrutura de saúde para atender à população. No período de 1984 a 1995, foram registrados de 400 a 500 mil casos em média por ano. Em 1996 e 1997 houve redução importante nos registros da doença. Nos anos de 1998 e 1999, a incidência aumentou de forma preocupante, atingindo seu limite, em 1999, com 635.646 casos. De 2000 a 2002, foi observado o maior declínio na ocorrência da malária nos últimos 40 anos. Em 2002, registraram-se 348.259 casos, o que representou 43% de queda em relação a 2000. De 2003 a 2005, observou-se nova elevação progressiva no número de casos, chegando a 607.730 casos notificados em 2005, um aumento de 74% em relação ao número de casos de 2002. O Ministério da Saúde desencadeou então, amplo processo de mobilização de forças multissetoriais priorizando as ações de vigilância, prevenção e o controle da malária. Os efeitos dessa articulação refletiram-se a partir do ano de 2006 até 2008, quando foi observado declínio constante no número de casos, passando de 550.930 para 313.922, uma redução de 43%. Até a década de 80, houve relativa equivalência entre as espécies parasitárias (*P. vivax* e *P. falciparum*) inclusive com um período de inversão parasitária de 1983 a 1988 com predominância de *P. falciparum*. A partir de então, nota-se um distanciamento no número de registros causados pelas duas espécies, que culminou com a predominância do *P. vivax* (Brasil, 2010a).

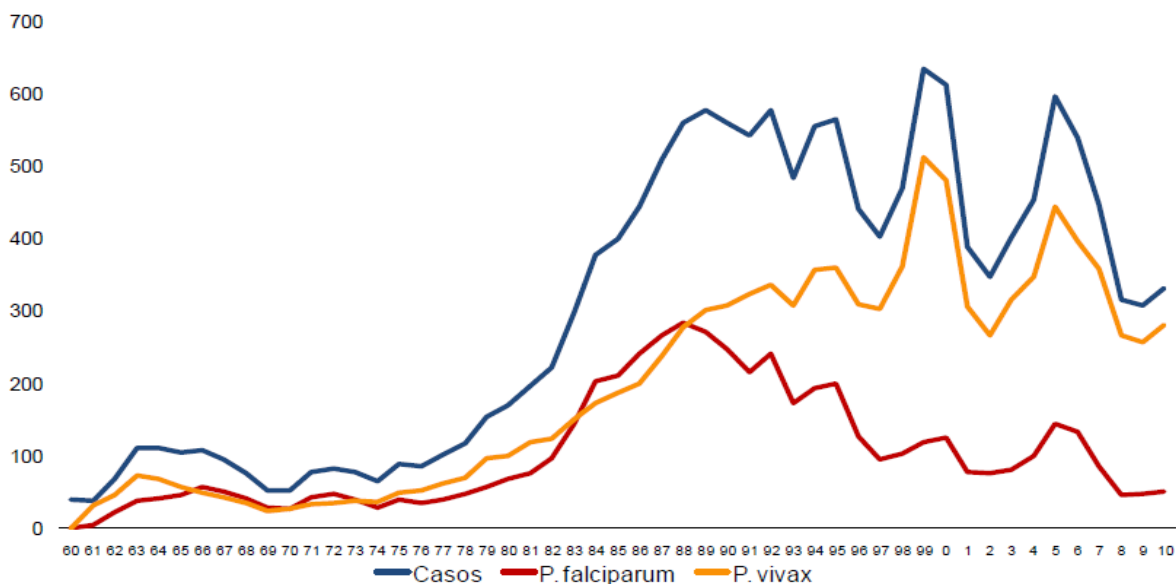


Figura 3. Número de casos (x 1.000) registrados de Malária no Brasil no período de 1960-2010. Número total de casos de malária (azul), número de casos causados pelo *Plasmodium falciparum* (vermelho) e número de casos causados pelo *p. vivax* (amarelo). (Barbosa, 2011).

Apesar da malária causada por *P. vivax* ser a principal encontrada nas Américas e na Ásia, ela é ainda pouco estudada, possivelmente por ser esta espécie menos virulenta que o *P. falciparum* e, devido às dificuldades de sua manutenção em cultivo contínuo, o que também limita os conhecimentos a cerca da biologia e da diversidade genômica do *P. vivax*.

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium*

O ciclo biológico do parasito requer uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado e uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado (Figura 4). O homem é infectado quando fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* depositam esporozoítos, acumulados nas glândulas salivares do inseto vetor, na sua derme durante o repasto sanguíneo. Na picada são depositados de 15 a 200 esporozoítos que podem permanecer na derme por um longo período de tempo (Yamauchi *et al.*, 2007). Em sua maioria, estes esporozoítos são degradados nos linfonodos para onde são drenados, porém outra parte invade os vasos sanguíneos e seguem para o fígado (Amino *et al.*, 2006).

Uma vez no fígado, os esporozoítos passam por vários hepatócitos antes de estabelecer uma infecção estável. Eles invadem os hepatócitos com a ajuda

principalmente de duas proteínas do parasito (Proteína circunsporozoíta – CSP e proteína adesiva relacionada à trombospondina – TRAP) que ligam-se a sulfatos de heparina dos proteoglicanos na superfície dos hepatócitos (Miller, *et al.*, 2002). Este processo resulta na formação do vacúolo parasitóforo no último hepatócito invadido, onde ocorrerá a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos através de várias divisões por esquizogonia formando os esquizontes, repletos de formas infectantes do eritrócito, os merozoítos (10.000 a 15.000 para *P. vivax* e 40.000 para *P. falciparum*). Estes, são liberados na corrente sanguínea no interior de vesículas delimitadas pela membrana da própria célula hospedeira, os merossomos (Sturm *et al.*, 2006; Amino *et al.*, 2006) finalizando assim o ciclo pré-eritrocítico.

Ao serem liberados na corrente sanguínea através dos merossomos, os merozoítos invadem os eritrócitos iniciando o ciclo eritrocítico. Dentro do eritrócito, estas formas se multiplicam e, quando liberados na corrente sanguínea, podem invadir novos eritrócitos. A ruptura dos eritrócitos está associada ao aparecimento dos sintomas característicos da doença, como febre e calafrios (Barnwell & Galinski, 1998).

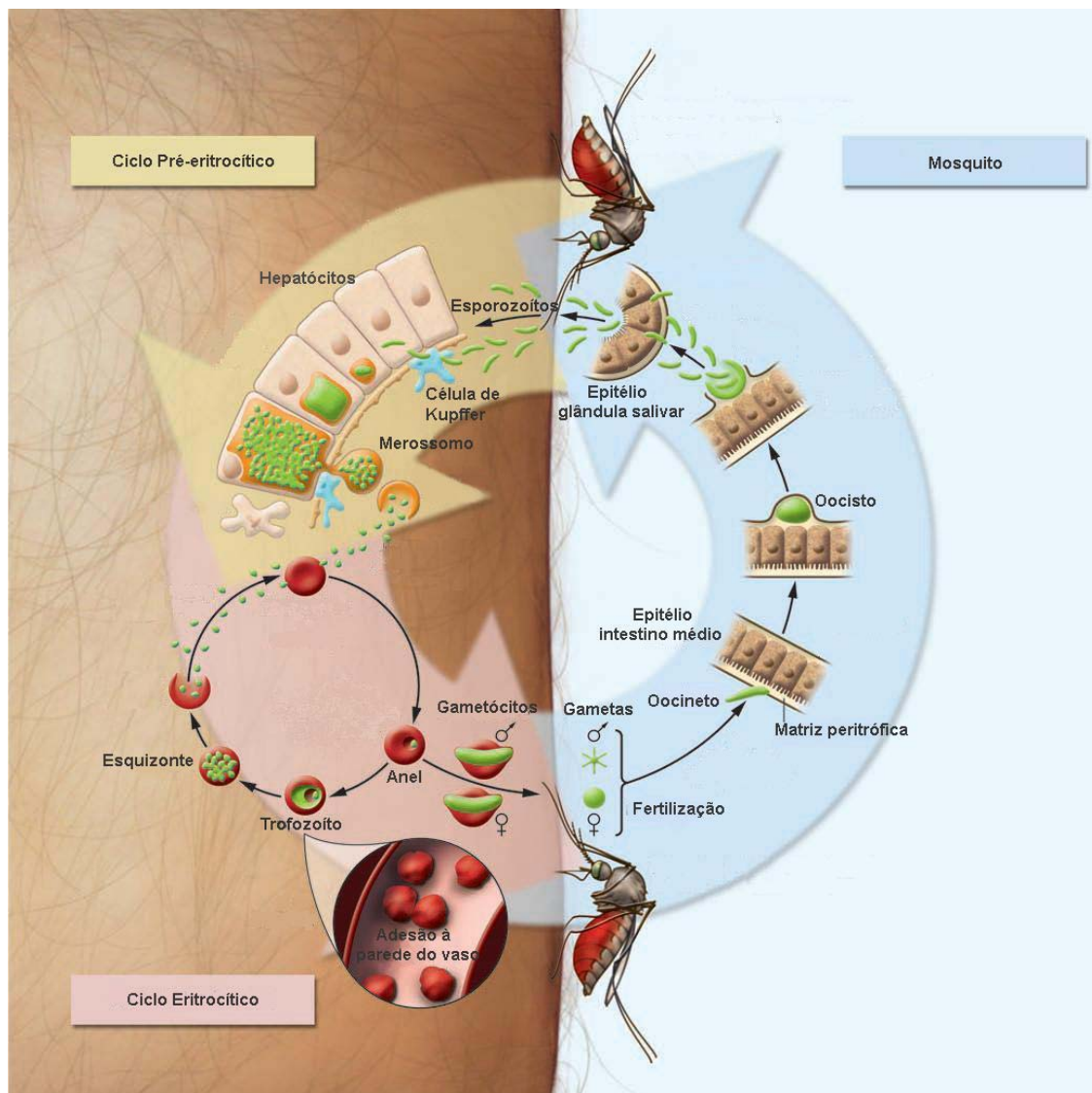


FIGURA 4. Ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Figura modificada de Greenwood *et al* (2008).

Algumas espécies como *P. vivax* e *P. ovale* têm a capacidade de manter formas latentes do parasito no fígado, os hipnozoítos, que permanecem dormentes por intervalos variáveis de tempo e podem levar a uma reagudização da doença com elevação da parasitemia do indivíduo e novamente aparecimento dos sintomas, dificultando o controle da doença (Mueller *et al.*, 2009).

O reaparecimento da parasitemia após o tratamento pode ter três diferentes origens: recaída, recrudescência ou reinfecção. A recrudescência é resultante de parasitos assexuais sanguíneos que sobreviveram ao tratamento (falha terapêutica). A reinfecção é originada de uma nova inoculação de esporozoítos pelo mosquito vetor. E, por último, a verdadeira recaída que se caracteriza pela ativação dos hipnozoítos no fígado (Figura 5).

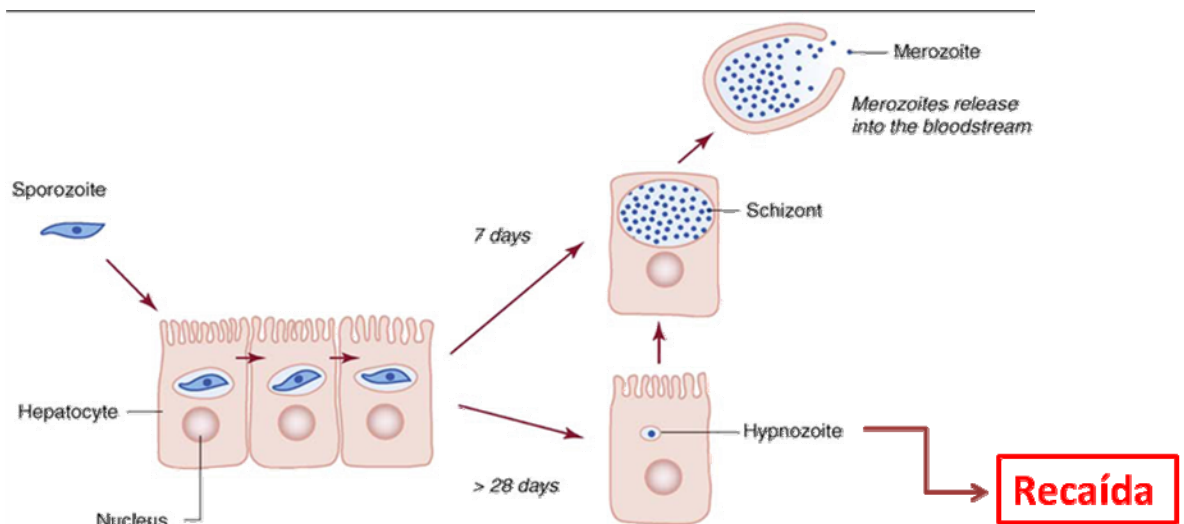


Figura 5. Formas hepáticas do ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. O hospedeiro humano é infectado por esporozoítos durante o repasto sanguíneo do mosquito. No fígado, após 7 dias, os esporozoítos podem se multiplicar e formar esquizontes exo-eritrocíticos contendo, em seu interior vários merozoítos. O *P. Vivax* consegue manter formas dormentes chamadas hipnozoítos por um tempo superior a 28 dias e estes podem ser ativados causando as recaídas.. Figura modificada de Wells *et al.* , 2010.

Existem algumas diferenças entre *P. falciparum* e *P. vivax* quanto ao tipo de célula que eles invadem e a forma que utilizam para invadir essas células. O *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos (eritrócitos jovens) e utiliza uma via principal de invasão que é a interação de uma proteína micronemal do parasito, a proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP), com o seu receptor na membrana do eritrócito, o antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC) (Miller *et al.*, 1976; Mons, 1990). Já o *P. falciparum* invade tanto reticulócitos quanto eritrócitos maduros (Pasvol *et al*, 1980) e utiliza diferentes vias de invasão (Gaur *et al*, 2004).

A invasão dos eritrócitos pelo parasito envolve quatro etapas. Primeiramente, o parasito encontra o eritrócito e adere à sua parede de forma reversível. Em seguida, o parasito se reorienta, posicionando a sua região apical, em contato com a membrana eritrocítica, formando uma junção irreversível entre as membranas. A junção é deslocada para o pólo posterior do parasito e o conteúdo de organelas situadas na região apical, como roptrias, grânulos densos e micronemas, são liberados. A invasão do parasito no eritrócito ocorre através da formação do vacúolo parasitóforo, dentro do qual o parasito se desenvolve (Oh & Chishti, 2005; Cowman & Crabb, 2006).

No interior dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem nas formas de trofozoítos jovens, maduros e, posteriormente esquizontes. Os últimos estão repletos de merozoítos que serão liberados na corrente sanguínea e invadirão novos eritrócitos. Alguns desses merozoítos também podem se diferenciar em formas sexuais do parasito, os microgametócitos e macrogametócitos, que ao serem ingeridas pelo mosquito vetor, durante o repasto sanguíneo, se transformam em gametas masculinos e femininos, respectivamente. No interior do intestino médio do mosquito, esses gametas se fundem e formam o zigoto (Barnwell & Galinski, 1998). Em seguida, o zigoto se transforma em oocineto e este, quando chega à lâmina basal do intestino do mosquito se diferencia em oocisto. Após sucessivas divisões mitóticas e diferenciação celular, são produzidos milhares de esporozoítos a partir dos oocistos. Os esporozoítos caem na hemolinfa e se acumulam nas glândulas salivares do mosquito, fechando o ciclo biológico do parasito ao serem inoculados num novo hospedeiro no repasto sanguíneo (Sinden, 2002).

1.3 Tratamento da doença

O controle da malária no Brasil se apoia em três pilares básicos: diagnóstico rápido através de exame de gota espessa, tratamento quimioterápico dos indivíduos positivos e redução do contato com os mosquitos vetores utilizando-se mosquiteiros impregnados com inseticidas e, em alguns casos a borrifação de inseticidas. Assim, o tratamento da doença visa interromper o ciclo evolutivo do parasito em pontos chave (Brasil, 2010b):

- Interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção;
- Destruição de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias;
- Interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos).

O tratamento adequado tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, a morte por malária, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (Brasil, 2001) e deve levar em consideração os seguintes aspectos (Brasil, 2010b):

- Espécie de plasmódio infectante, pela especificidade dos esquemas terapêuticos a serem utilizados;
- Idade do paciente, pela maior toxicidade para crianças e idosos;
- História de exposição anterior à infecção uma vez que indivíduos primoinfectados tendem a apresentar formas mais graves da doença;
- Condições associadas, tais como gravidez e problemas de saúde como deficiências de metabolismo;
- Gravidade da doença, pela necessidade de hospitalização e de tratamento com esquemas especiais de antimaláricos

O tratamento de pacientes infectados com *P. vivax* com primaquina recomendado pela OMS dura 14 dias, por causa de sua baixa meia-vida, na dose de 0,25 mg/kg associada a uma droga esquizontocida e gametocitocida no caso, a Cloroquina, por três dias em uma dose total de 25 mg de base/kg. Entretanto, no Brasil, para facilitar a adesão do paciente ao tratamento é recomendado o uso da primaquina por apenas 7 dias com uma dose de 0,5 mg/kg. Uma falha do tratamento (recrudescência) é caracterizada pelo aparecimento de parasitemia até o dia 28 após o início do tratamento (Brasil, 2001). No entanto, alguns autores têm questionado a eficácia desse regime de tratamento, e acredita-se que uma menor eficácia possa contribuir para o aumento da ocorrência de episódios de recaída e a possibilidade de seleção de cepas resistentes à primaquina (Pukrittayakamee *et al*, 2010; Baird, 2009). Gestantes e crianças menores de 6 meses com malária pelo *P. vivax* ou *P. ovale* devem receber apenas cloroquina para o seu tratamento, uma vez que a primaquina é contra-indicada nessas situações pelo alto risco de hemólise (Brasil, 2010b).

A Cloroquina é uma 4-aminoquilonina com rápida atividade esquizontocida sanguínea para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*, também tem ação antipirética e anti-inflamatória e atua na digestão de produtos da hemoglobina, porém, não tem ação contra formas hepáticas (Brasil, 2001). O único tratamento atualmente utilizado contra as formas teciduais do *P. vivax* é a primaquina, uma 8-aminoquinolina que inibe a respiração mitocondrial do parasito. Ela é altamente ativa contra gametócitos de todas as espécies de malária humana e contra hipnozoítos de *P. vivax* (Brasil, 2001). Entretanto esta é uma droga bastante tóxica e nem sempre eficaz, pois tem sido frequentemente associada à recrudescência. Em geral, falhas terapêuticas na malária vivax podem ser causadas

por fatores relacionados ao paciente (adesão, gravidade, genética, peso), ao parasito (resistência, virulência, carga) e às drogas (qualidade, regime) (WELLS *et al* 2010), porém não há relatos na literatura de resistência do parasito por esta droga.

A resistência é definida como a capacidade do parasito de sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações de fármaco que normalmente destruiriam os parasitos ou preveniriam sua multiplicação (WHO, 2010). A grande dificuldade no estudo de resistência a drogas pelo *P. vivax*, além da ausência de cultivo, é a possibilidade de ocorrência de episódios de recaída que complicam o reconhecimento de parasitos resistente à terapêutica, sendo necessária a inclusão de uma metodologia que auxilie na diferenciação entre recrudescência, recaída e nova infecção.

1.4 Recaídas

Pacientes infectados com *P. vivax* foram descritos desde tempos antigos apresentando recidivas da doença sem sinal de exposição a uma nova picada do mosquito infectado (Thayer, 1897; Bignami, 1898; Manson, 1901). As recaídas eram descritas como recorrências da doença com um período longo de latência (meses) em relação à infecção inicial.

Acreditava-se que as recaídas eram resultantes de esporos depositados nas vísceras do hospedeiro e permaneciam inertes até serem liberados como resultado de algum agravo cuja natureza era desconhecida (Thayer, 1897; White, 2011). Em 1913, Bignami propôs que as recaídas derivavam da persistência de pequeno número de parasitos no sangue. Embora essa teoria explicasse a recorrência tardia de infecções por *P. malariae*, não conseguia explicar vários fatores nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* (White, 2011). Quase 70 anos depois, Krotoski identificou, em tecido hepático, formas uninucleares de cerca de 4µm de diâmetro em espécies causadoras de episódios de recaída como *P. vivax*, mas não em *falciparum* (Krotoski, 1980; 1982; 1985; Garnham, 1988), que ficariam dormentes (“hypnos”) até o momento de sua ativação, que resultaria no reaparecimento de parasitemia e sintomas clínicos (reagudização da doença). Tais formas foram chamadas de hipnozoítos, porém os mecanismos de ativação dos mesmos ainda são desconhecidos. Desde então o termo “Recaída” é usado para descrever recorrências originadas da ativação de formas latentes do parasito da malária vivax

(hipnozoítos) no fígado e o termo “recrudescência” se refere a recorrências originadas de parasitos sanguíneos que persistiram após o tratamento recomendado e que conseguiram se multiplicar e desenvolver levando ao reaparecimento de parasitemia detectável (White, 2011).

Estudos de modelos experimentais da época demonstraram que o período de incubação e latência e o número de recidivas era determinado, além de outros fatores, pelo número de esporozoítos inoculados na infecção primária (para revisão ver White, 2011). Porém sabe-se que cepas de *Plasmodium vivax* de regiões temperadas tem perfil de recaída distinto de cepas de regiões tropicais e subtropicais.

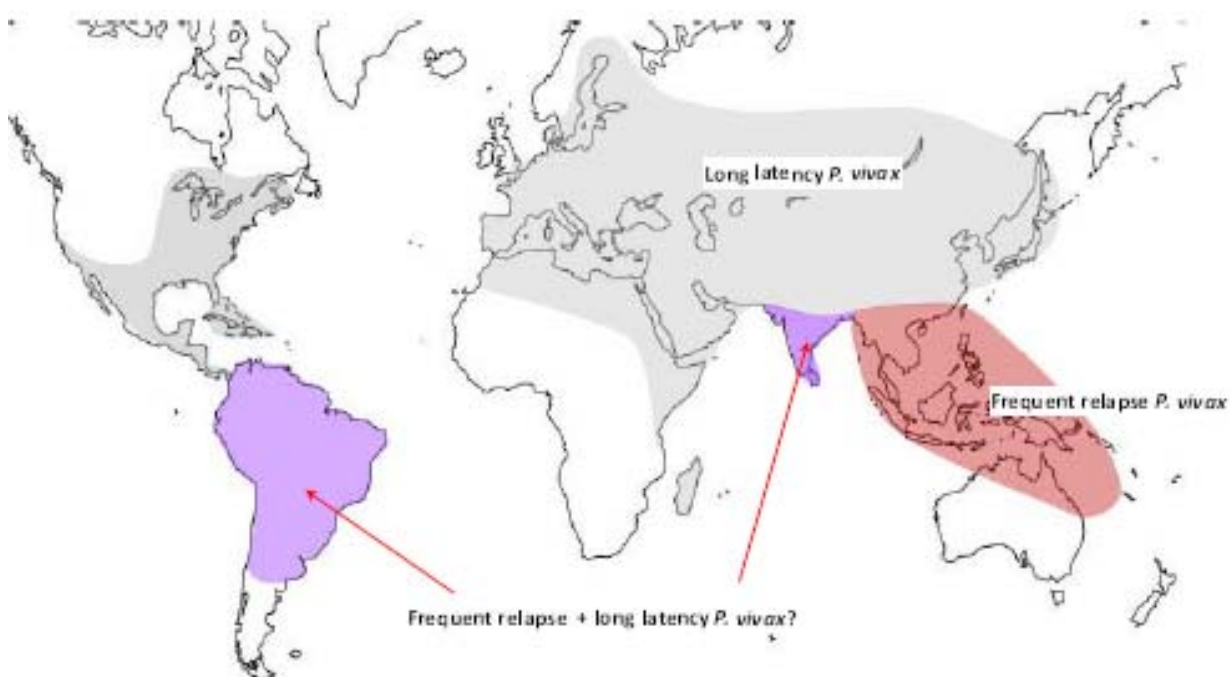


Figura 6. Caracterização de perfil de recaída quanto ao número e intervalo de tempo de ocorrência das recaídas nas diferentes regiões do mapa mundial. (White, 2011)

Os períodos de incubação, o número de merozoítos por esquizonte sanguíneo, relações antigênicas, susceptibilidade a drogas, virulência e intervalo de recaídas diferem entre as cepas (White, 2011). De modo geral, as cepas de regiões tropicais e subtropicais são associadas com múltiplas recaídas que ocorrem com um curto intervalo de latência (3-5 semanas), enquanto as cepas de regiões temperadas são caracterizadas por poucos episódios de recaídas, com longos períodos de latência (5-10 meses) (Coatney & Cooper, 1947, Shute *et al.* 1976). Entretanto, em algumas regiões como na Índia já foram relatados os dois perfis concomitantemente (Adak *et al.* 1998; Kim *et al.* 2006). Estes dados sugerem que existe uma variação

na ativação dos hipnozoítos, que pode ser constituída por fatores do parasito e do hospedeiro.

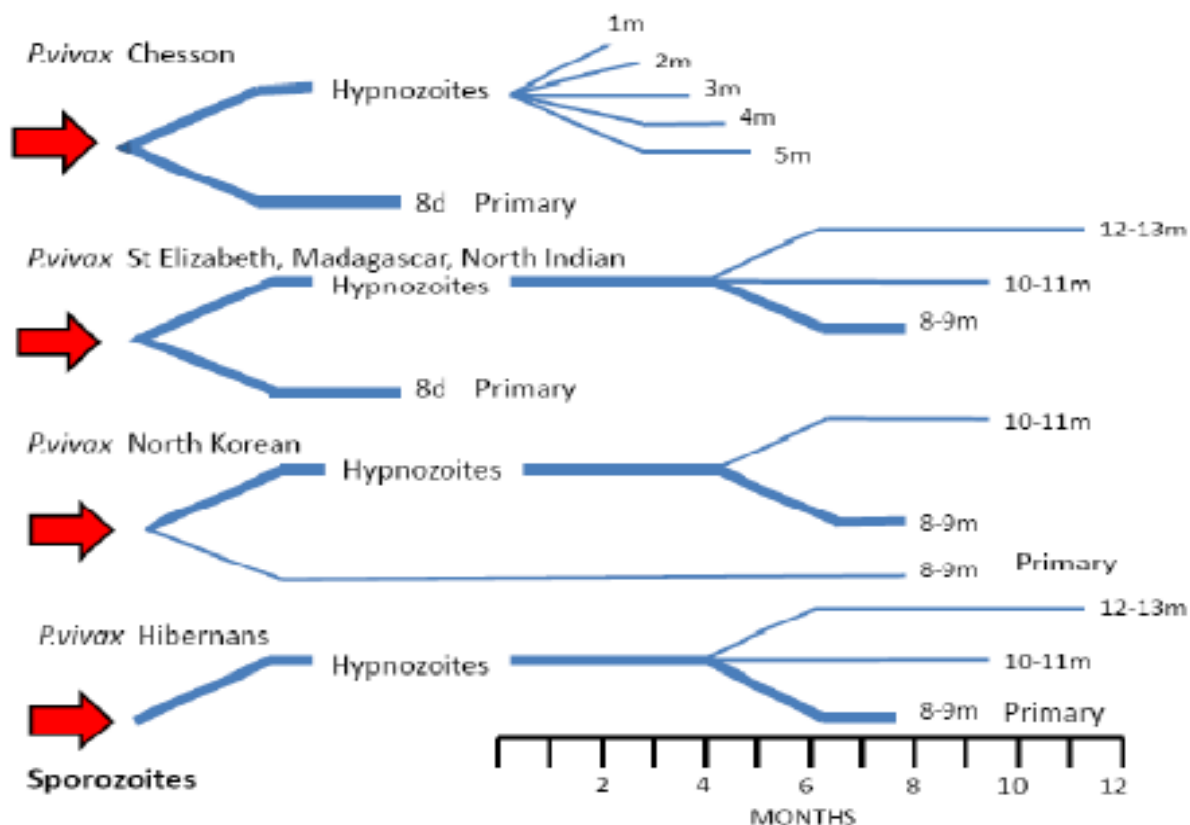


Figura 7. Cepas de *Plasmodium vivax* e o intervalo de tempo entre a infecção primária e o episódio de recaída descrito em meses. (White, 2011)

Várias são as hipóteses que tentam explicar os fatores responsáveis pela indução de latência e sinalização para ativação dos hipnozoítos. Alguns autores acreditam que infecções mistas (*P. vivax* e *P. falciparum*) aumentem a probabilidade de ocorrência de recaídas, pois, devido à inoculação simultânea das duas espécies, a tendência é que elas desenvolvam mecanismos de sobrevivência e conservação da espécie, no caso, o aumento do número de gametócitos (*P. falciparum*) e a formação de hipnozoítos (*P. vivax*) que podem permanecer latentes por longos períodos de tempo e por alguma razão serem ativados levando ao reaparecimento de parasitemia por *P. vivax* (Lin *et al.*, 2011).

Outro estudo sugere que os responsáveis pela ativação dos hipnozoítos são os próprios mosquitos anofelinos. Acreditam que a picada de mosquitos não infectados leva a uma sinalização para ativação dos hipnozoítos latentes, resultando em episódios de recaída (Huldén, 2008) e que a proporção de episódios de recaída aumenta em épocas de reprodução do vetor. Isso sugere que a dormência dos

parasitos seja parte de uma coevolução do parasito com o mosquito, com o parasito causador da recaída coincidindo com a abundância sazonal do mosquito, propondo que este seja um mecanismo de sobrevivência do parasito e conservação da espécie (Wells, 2010). Outros acreditam que outra enfermidade (que tenham respostas de citocinas associadas), um estímulo sistêmico, como a febre ou a inflamação, pode desencadear a ativação dos hipnozoítos (Levine, 1963; Mclester, 1945; White, 2011). Um desses casos é o próprio episódio de infecção aguda por malária. Supõe-se que cada episódio sintomático da doença é o estímulo ativador para a ocorrência da próxima recaída (White, 2011). Cada hipnozoíto geneticamente distinto seria programado para ser ativado em determinado momento, e que cada episódio de recaída seja causado por um clone latente mesmo que a infecção primária seja múltipla, resultando em uma ativação específica de uma única variante alélica (Chen, 2007). Os mecanismos de ativação dos hipnozoítos continuam desconhecidos e pouco se sabe sobre a biologia e diversidade genética dessa forma parasitária, conhecimentos que são importantes para o esclarecimento dos perfis de recaída, para o prognóstico da doença, padrões de resistência a drogas, controle da malária vivax e até mesmo no direcionamento da terapêutica da doença.

1.5 Marcadores moleculares utilizados no estudo das recaídas

Análises epidemiológicas da diversidade genética e estrutura populacional dos plasmódios são essenciais para o entendimento da dinâmica da transmissão da malária e para o desenvolvimento de vacinas maláricas bem como para a identificação de resistência aos antimaláricos (Brito & Ferreira, 2011).

Os principais marcadores moleculares utilizados nos estudos populacionais de *P. vivax* são SNPs (single nucleotide polymorphisms – polimorfismos de base única) em genes codificadores de antígenos. Como os antígenos sofrem a ação do sistema imune do hospedeiro seus genes codificadores estão sob forte pressão seletiva positiva, não sendo dessa forma considerados marcadores neutros e, por isso, não são bons marcadores evolutivos. Os marcadores mais comumente utilizados em estudos de genética de populações são os microssatélites.

1.5.1 Microssatélites

Microssatélites são pequenas repetições em tandem de 2-6 bp muito utilizados para estudos de diversidade genética por serem hipervariáveis, co-dominantes e loci específicos (Russell *et al*, 2006). Sua variabilidade não está sujeita à pressão do sistema imune, portanto são considerados marcadores neutros. Esta variabilidade provém do “slippage” da DNA polimerase ou derrapagem no momento da replicação do DNA. Também são utilizados na genotipagem de infecções múltiplas por plasmódios na qual, pela intensidade de fluorescência de cada pico, consegue-se diferenciar o alelo predominante de cada infecção (Havryliuk *et al*, 2008, 2009) .

Poucos marcadores genéticos, a maioria ortólogos de genes codificadores de antígenos previamente identificados do *P. falciparum* são usados nos estudos populacionais do *P. vivax* (Bruce *et al.*, 2000) em contraste com a abundância de marcadores para *P. falciparum*, como por exemplo, mais de 1.000 microssatélites e centenas de polimorfismos de tamanho de restrição e polimorfismos de base única (SNPs). Para *P. vivax* já foram descritos na literatura como polimórficos em isolados de campo cerca de 40 microssatélites (Leclerc *et al.* 2004; Karunaweera *et al.* 2008; Ferreira *et al.*, 2007).

A princípio, acreditava-se que a variação polimórfica dos microssatélites de *P. vivax* era pequena entre isolados de diferentes regiões do mundo (Leclerc *et al*, 2004). Entretanto, em estudos recentes, alguns autores descrevem a grande diversidade genética do *P. vivax* utilizando microssatélites altamente variáveis (Imwong *et al*, 2006; 2007; Karunaweera *et al*, 2007, 2008). A diferença entre estes estudos foi atribuída ao tamanho do arranjo do microssatélite que é diretamente proporcional à sua variabilidade (Imwong *et al.* 2006). Em estudos de recaídas por *P. vivax* utilizando microssatélites foi visto que a diversidade genética era elevada e que as recaídas resultam de hipnozoítos geneticamente distintos (heterólogos) dos parasitos da infecção primária (Imwong *et al*, 2007; Restrepo *et al*, 2011), o que também foi demonstrado em amostras brasileiras por Orjuela-Sánchez e colaboradores em 2009, em área de baixa endemicidade para a doença utilizando 14 microssatélites, os autores encontraram em 28 amostras pareadas, de infecção primária e recaída, apenas dois pares de amostras com haplótipos idênticos e 4 pares de amostras com haplótipos relacionados considerando os alelos predominantes, porém em quase todos os estudos as amostras utilizadas são

originadas de pacientes de área endêmica, o que dificulta a exclusão de uma nova infecção.

1.5.2 Proteínas de superfície do merozoíto

As proteínas de superfície do merozoíto (MSP) são uma grande família de proteínas de superfície envolvidas na interação inicial entre os parasitos e as células vermelhas do sangue. Nove MSPs têm sido caracterizadas em *P. vivax*. Algumas MSPs são altamente polimórficas como a MSP1 e MSP3- α , outras mostram variabilidade limitada como MSP4, MSP7 e MSP10 (Brito & Ferreira, 2011).

1.5.2.1 Proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP1)

A MSP1 é um antígeno imunodominante de 200-KDa expresso na superfície do merozoíto. É formado de seis domínios altamente polimórficos flanqueados por sete sequencias conservadas. Em estudos de polimorfismos genéticos em isolados de *P. vivax* foi demonstrado que os blocos 1, 3 e 5, ao nível protéico são conservados com poucas substituições dimórficas, enquanto os blocos 2, 4, 6 e 10 são altamente variáveis (Brito & Ferreira, 2011). Além disso, essa proteína tem maior variabilidade em *P. vivax* em relação ao *P. falciparum* (Russell *et al*, 2006). Sua alta diversidade pode ser resultado de recombinações intragênicas nas regiões polimórficas entre os tipos de alelos dimórficos ou por pressão seletiva do sistema imune (Brito & Ferreira, 2011).

A MSP1 tem sido usada em estudos de diversidade no estudo de recaídas e para genotipar isolados de diferentes cepas originadas de regiões geográficas distintas (Kim, *et al*, 2006). No Brasil, foi realizado um estudo a nível molecular utilizando essa proteína na caracterização das recaídas e em cerca de 20% dos casos já relatados foram identificados parasitos distintos da infecção primária (Kirchgatter & Del Portillo, 1998) e a diversidade genética dos isolados era elevada assim como em estudos de amostras tailandesas (Cui, *et al*, 2003) e indianas (Kim, *et al*, 2006). Entretanto, na Coreia, relativamente baixa diversidade foi encontrada na PvMSP1 de pacientes que apresentaram recorrências da doença (Lim, *et al*, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença parasitária que ocupa posição de destaque no panorama mundial. A incidência dessa doença no Brasil vem oscilando nas últimas décadas, com períodos de grande elevação e, em períodos em que as atividades dos programas de controle da malária são mais intensas, observa-se uma diminuição do número de incidência de casos da doença. É importante destacar que atualmente mais de 80% dos casos diagnosticados no Brasil são por *P. vivax* (WHO, 2008). Este parasito apresenta uma particularidade importante em seu ciclo biológico que afeta diretamente o controle da transmissão da doença, ele é capaz de desenvolver formas latentes (hipnozoítos) no tecido hepático que, quando ativadas, podem levar a uma recidiva da doença (recaída). Além das dificuldades encontradas para o controle da doença como resistência dos vetores aos inseticidas e dos parasitos às drogas as recaídas constituem um reservatório do parasito que dificulta o controle da doença. Assim, a dificuldade de distinção entre recaída, recrudescência e uma nova infecção tem se tornado um empecilho para os estudos de resistência as drogas, eficácia terapêutica e até mesmo para o desenvolvimento de novas drogas.

A caracterização molecular dos parasitos das infecções agudas e episódios de recaída é uma importante ferramenta para auxiliar na distinção entre nova infecção e recrudescência ou uma recaída. Tem sido demonstrado na literatura que geralmente os parasitos da recaída são geneticamente iguais aos da infecção primária, constituindo um subgrupo destes parasitos (Craig & Kain, 1996). Entretanto, nos estudos recentes isso não foi observado, na maioria dos casos o parasito causador da infecção primária era geneticamente distinto do parasita da recaída (Imwong *et al*, 2007; Restrepo *et al*, 2011, Véron *et al*, 2009). Recentemente, uma ampla análise molecular utilizando diferentes marcadores identificou a presença de parasitas heterólogos na recaída em 60% dos pacientes provenientes de áreas de baixa transmissão (Imwong *et al*. 2007). Este ano foi publicado um segundo artigo relatando níveis ainda maiores de genótipos heterólogos nas recaídas, em torno de 80% numa vila rural do Vietnã (Van den Eede *et al.*, 2010). Poucos estudos foram realizados com amostras de *P. vivax* do Brasil, um deles utilizou apenas um marcador (MSP-1) para estudar 10 indivíduos, encontrando parasitos homólogos na maioria das recaídas (Kirchgatter & Del

Portillo, 1998). Outro estudo utilizou microssatélites e encontrou principalmente parasitos heterólogos nas recaídas (Orjuela-Sánchez *et al.* 2009). Esses dados confirmam a necessidade de se ampliar os estudos moleculares das recaídas no Brasil. Além disso, cada estudo utiliza um tipo diferente de marcador. Assim, para facilitar a comparação com os estudos prévios foram incluídos neste estudo, além dos microssatélites também um gene codificador de antígeno polimórfico (MSP-1).

Através deste estudo pretende-se entender melhor a dinâmica de transmissão da doença, com destaque para o entendimento dos episódios de recaída e sua diferenciação em relação a recrudescência e reinfeção. Esses resultados serão importantes no estabelecimento de novas estratégias e metodologias de controle da malária nas regiões endêmicas, principalmente no delineamento de estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a variabilidade genética de isolados de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* em amostras pareadas de infecção aguda e dos episódios de recaída.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os perfis de 08 loci de microssatélites e dos blocos 2 e 10 do gene codificador da Proteína de Superfície do Merozoíto 1 (MSP-1) dos isolados de *P. vivax* provenientes de amostras pareadas: parasitos provenientes da infecção primária e do(s) episódio(s) de recaída dos mesmos indivíduos.
- Comparar os perfis de genotipagem das amostras pareadas obtidos buscando identificar marcadores moleculares de recaída.
- Analisar a diversidade genética da população estudada
- Determinar a presença de infecção múltipla em indivíduos cujas variantes do *P. vivax* da infecção aguda e recaída forem geneticamente distintas.
- Estabelecer um número mínimo de marcadores necessários para detecção de infecções múltiplas

4 METODOLOGIA

4.1 Grupo de indivíduos com recaída

Amostras de sangue coletadas de infecção primária e recaída(s) de 29 pacientes clinicamente acompanhados no Hospital Universitário Júlio Muller/MT em Cuiabá/MT foram selecionadas de bancos de dados da instituição. Além disso, também foi incluído neste estudo amostra de uma paciente de 47 anos, atendida no Hospital das Clínicas em Belo Horizonte/MG após o retorno de Ariquemes/Rondônia, área endêmica para malária. Os pacientes foram tratados de acordo com o que foi preconizado pelo Ministério da Saúde (3 dias de tratamento com Cloroquina 150mg e 7 dias de tratamento com Primaquina 15mg), e que sofreram episódios de recaída da doença. Para ser incluído neste estudo o episódio de recaída deveria ter ocorrido com mais de 30 dias após o tratamento (eliminar recrudescência) e o paciente deveria relatar o não retorno às áreas endêmicas até o momento da ocorrência do episódio de recaída.

As amostras foram coletadas de adultos do sexo masculino e feminino que procuraram o hospital durante uma infecção aguda de malária, portanto, as amostras selecionadas eram de infecções sintomáticas e a primeira coleta de sangue e diagnóstico de malária do paciente no hospital foi considerada infecção primária, somente 7 dos 30 pacientes analisados eram registrados como primo infectados, ou sejam primeira inoculação de esporozoítos.

Ambos os hospitais estavam localizados em áreas sem transmissão de malária (Cuiabá e Belo Horizonte). As amostras foram coletadas no período de 2001 a 2009 e os locais de contágio foram amplamente dispersos variando de 9 km a mais de 3.500 quilômetros de distância de Cuiabá (média de 1.205 km). A média de idade dos pacientes foi de 37 anos (14-63 anos).

4.2 Isolados de *Plasmodium vivax*

O DNA do parasito foi extraído do sangue total das amostras coletadas usando o kit para extração Puregene DNA (Gentra Systems, Minneapolis, MN) de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, para cada 1 mL de sangue total 3 mL de solução de lise para eritrócitos foram utilizados por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 2000 x g por 10

minutos; o sobrenadante então foi removido. O sedimento foi ressuspendido em 1 ml de solução de lise celular. Foram adicionados 333 µL de solução de precipitação de proteína ao lisado celular e esta mistura homogeneizada. Posteriormente ocorreu uma centrifugação a 2000 x g por 10 minutos e, depois o sobrenadante foi colocado em um tubo contendo 1 mL de isopropanol. Esta solução foi homogeneizada e centrifugada a 2000 x g por 3 minutos. O sobrenadante então foi descartado e foi adicionado ao sedimento 1 mL de etanol 70%. Outra centrifugação foi realizada a 2000 x g por 1 minuto e o sobrenadante novamente descartado. Finalmente foram adicionados 100 µL de solução de hidratação de DNA ao sedimento. O DNA foi hidratado incubando-o a 65°C por 1 hora ou 16 horas em temperatura ambiente. O DNA foi dosado no espectrofotômetro NanoDrop e então armazenado a -20°C.

4.3 Amplificação e genotipagem dos microssatélites

Os parasitos foram genotipados utilizando os marcadores da MSP1 (bloco 02 e bloco 10) e 08 loci de microssatélites identificados no laboratório de Malária do Centro de pesquisa René Rachou (Rezende *et al.* 2010). Os loci encontram-se amplamente distribuídos pelos cromossomos do *P. vivax* (cromossomos 2, 3, 5, 6, 8, 12, 13 e 14) e com baixo desequilíbrio de ligação entre eles (Tabela 1). Os microssatélites PvMS1 e 2 possuem repetições de dinucleotídeos (CA, TA), os microssatélites PvMS3 a 6 possuem repetições de trinucleotídeos (CAT, TGA, TAA) e os microssatélites PvMS7 e 8 possuem repetições de tetranucleotídeos (TGTA, CATA).

Tabela 1. Caracterização dos microssatélites

Microssatélite	Cromossomo	Unidade repetitiva	Varição no tamanho do	Número de alelos	TOP HIT	Posição no genoma
MS01	12	GT9	224-248	5	Adaptador relacionado ao complexo protéico gama 1 subunidade 2 (NC_009917)	2075887-2076132
MS02	3	CA12	290-312	10	Proteína hipotética (NC_009908)	782947-783248
MS04	6	TA21	130-174	12	Não codificadora	1027329-1027483
MS05	3	CAT10	173-215	10	Proteína hipotética (NC_009908)	30333-30515
MS06	14	TGA19	194-298	12	Proteína hipotética (NC_009919)	2835596-2835833
MS07	2	TAA22	349-388	8	Não codificadora	152239-152633
MS08	13	TGTA7	249-325	7	Não codificadora	1561308-1561621
MS11	8	CATA49	284-560	31	Não codificadora	840626-840999
MSP1b12	7	Putaporntip <i>et al.</i> (2002)	352-460	7	Principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo Pv200	1157742-1163137
MSP1b10	7	Putaporntip <i>et al.</i> (2002)	226-329	12	Principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo Pv200	1157742-1163137

A reação em cadeia da polimerase ou PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Gradient. As temperaturas de anelamento dos iniciadores e a concentração de cloreto de magnésio variaram de 50°C a 60°C e de 0,75mM a 1,50mM, respectivamente (Tabela 2). O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose corado pelo brometo de etídio.

Tabela 2. Iniciadores e condições de amplificação dos iniciadores

INICIADOR	FOWARD	REVERSE	TM (°C)	[MG ⁺] (MM)
PvMS1	5' CTA TCT GAG GAA TGG GGA 3'	5' ATT TAC TAT GAC GAA GGT GA 3'	53,4	1,5
PvMS2	5' CAT CAT TTG GGT AAG TCG GG 3'	5' GCA GCC ACA AAA TCA ACA CC 3'	60	1,5
PvMS4	5' TTTATTTCCCCCTTTGCC 3'	5' AAATGGATGTTCTTGTCAAA 3'	55,7	1
PvMS5	5' TGCTATTTGCTCGGTCTGT 3'	5' GAGCGTTATCATCATTAG 3'	56	1,5
PvMS6	5' ACA CAT TTG ACA CAG TTC C 3'	5' ATG CCC TGG TCC CTA CAA 3'	58,6	1,5
PvMS7	5' GTATTCGCCGCTTGTCC 3'	5' CTTTCTCCGTTCTTATTCT 3'	56	1,5
PvMS8	5' TCC GTT GTT TTG TTG CCC 3'	5' CAC TTG TTC GTT CCG CTC 3'	60	1,5
PvMS11	5' CGATGCGTTCACCTGGAT 3'	5' TATTCTTCTCCCCTCGTG 3'	54	0,75
MSP1bl2	5' GACGATATTGAAAATTGGA 3'	5' CTCCTTCAGCACTTTCACGCGCTT 3'	63	3
MSP1bl10	5' CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA 3'	5' ATTACTTTGTGCTAGTCCCTCGGCGTAGTCC 3'	60	3

Posteriormente à identificação dos loci polimórficos, os iniciadores senso foram adquiridos com fluoresceína na extremidade 5' para realização da genotipagem no seqüenciador automático, onde os produtos de PCR amplificados foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços do modelo “Ultraamp™ Skirted 96 PCR Plate” (marca Sorenson BioScience TNC). A cada poço foram adicionados Tween 20 a 0,1%, 0,3µL de padrão de peso molecular, MegaBACE™ ET550-R Size Standard (GE Healthcare), com todas suas bandas marcadas com ET-ROX e 2-5µL de produto de PCR para um volume final de 10µL. Após a separação das amostras por eletroforese capilar os resultados foram analisados utilizando o programa MegaBACE Fragment Profiler versão 1.2, para identificação dos tamanhos exatos dos fragmentos previamente amplificados. Pelo fato do parasito ser haplóide na fase sanguínea do ciclo, a presença de dois picos numa mesma amostra, foi considerada como uma evidência de infecção múltipla. O cut off mínimo para a altura dos picos foi de 150 unidades de fluorescência arbitrária (rFu). Na presença de dois ou mais picos, o que obteve a maior altura foi considerado o alelo predominante.

4.4 Clonagem dos fragmentos

Quatro pacientes que obtiveram perfil de genotipagem da infecção primária diferente da recaída em pelo menos um marcador foram selecionados para realização de clonagem para a busca de infecções múltiplas que não foram

detectadas no primeiro momento. Foram clonados fragmentos de amplicons de 2 marcadores variados de cada paciente (escolhidos aleatoriamente). Para a realização da técnica, os produtos da amplificação por PCR anteriormente descrita foram clonados no vetor pGEM-T Easy vector, conforme instruções do fabricante e *Escherichia coli* da cepa TOP10 quimicamente competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante. Em um tubo de microcentrífuga foram incubados 2 µL do produto da reação de ligação com 50 µL de células competentes por 30 minutos no gelo. Rapidamente o tubo foi transferido para o banho-maria a 42°C por 45 segundos e imediatamente o tubo foi recolocado ao gelo por 2 minutos. Foram adicionados 500 µL de meio LB líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L) ao tubo, que foi incubado a 37°C, sob forte agitação por 1 hora. Em seguida as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, Ágar 20 g/L pH 7,0) com 100 µg/mL de ampicilina e mantido a 37°C 12-16 h.

As colônias resultantes foram selecionadas, repicadas com o auxílio de palitos autoclavados e incubadas individualmente em 2 mL de meio LB líquido (NaCl 10 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L) com 100 µg/mL de ampicilina a 37°C, sob forte agitação por 12-16 hs (cultura saturada). Foram selecionadas 20 colônias de cada transformação para extração plasmidial, amplificação dos clones e posteriormente os amplicons foram submetidos a genotipagem conforme protocolo descrito anteriormente.

A extração de DNA plasmidial foi realizada a partir do sistema Quiaprep (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 1 mL de cada cultura saturada foram centrifugados por 10 minutos a 9000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 250 µL de tampão P1 (Buffer P1 + RNase). Em seguida, 250 µL de tampão P2 foram adicionados e os tubos homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. Foi acrescentado à mistura o tampão N3 e imediatamente os tubos foram homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. O sedimento foi descartado e o sobrenadante aplicado em colunas oferecidas pelo Kit. Após centrifugação das colunas por 1 minuto a 13000 rpm o conteúdo do tubo foi descartado. A coluna foi lavada com 500 µL de Tampão PB e novamente centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm e ao final, o conteúdo do tubo foi descartado. Foram adicionados 750 µL de tampão PE (Buffer PE + álcool etílico 96%)

e durante 1 minuto foram centrifugados a 13000 rpm descartando o conteúdo do tubo no final. A coluna foi colocada em tubo de microcentrifuga e o plasmídeo eluído com 50 µL de água destilada e deionizada esterilizada. Foi realizada a amplificação dos fragmentos específicos por PCR de acordo com as condições descritas no item 2.

Para verificar infecções múltiplas e da derrapagem possível da polimerase durante a amplificação dos microssatélites, o que levaria a resultados errôneos causados pela presença de artefatos (Stutter bands), os tamanhos de amplicons obtidos a partir de plasmídeos recombinantes contendo os produtos de PCR clonados foram comparados com os tamanhos dos amplicons do DNA original.

4.5 Análise dos resultados

Calculou-se a diversidade genética (heterozigosidade esperada, H_E), que pode ser definido como a probabilidade de que um par de alelos obtidos aleatoriamente da população serem distintos, usando Arlequin 3.0 software (Excoffier *et al.* 2007) e a diversidade genética dos parasitas primários e recaídas foi comparada usando ANOVA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de artigo submetido à publicação.

De: The Journal of Infectious Diseases

Data: 03/02/2012 17:53:35

Para: Flávia Carolina Araújo

Assunto: Submission Confirmation for Multiclonal Activation of Hypnozoites is the Leading Cause of Relapses in Plasmodium vivax Infection

Dear Dr. Brito,

Thank you for submitting your manuscript, "Multiclonal Activation of Hypnozoites is the Leading Cause of Relapses in Plasmodium vivax Infection", to the Journal of Infectious Diseases. Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. Please use this number for all correspondence and communication with the editorial office. It can also be used to check the status of your manuscript online (at <http://jid.edmgr.com/>).

Thank you again for submitting your manuscript to JID.

Sincerely,

Editorial Staff

The Journal of Infectious Diseases

225 Friend St., 7th Floor

Boston, MA 02114

Phone: 617-367-1848

Fax: 617-367-2624

E-mail: lpowers@covad.net

<http://jid.edmgr.com>

Multiclonal Activation of Hypnozoites is the Leading Cause of Relapses in *Plasmodium vivax* Infection

Flávia Carolina F. de Araujo,¹ Antônio Mauro de Rezende,² Cor Jesus F. Fontes,³ Luzia Helena Carvalho,¹ and Cristiana F. Alves de Brito¹

¹Laboratory of Malaria, and ²Laboratory of Celular and Molecular Parasitology, Rene Rachou Research Institute – Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG; ³University Hospital Júlio Muller, UFMT, Cuiabá, MT, Brazil

Corresponding author Tel - +55 31 33497772; Fax - +55 31 32953115; e-mail – cristiana@cpqrr.fiocruz.br.

Running title Genetic Variability of *P.vivax* relapses

ABSTRACT

Background *Plasmodium vivax* infections are characterized by dormant liver forms, the hypnozoites. These forms are activated in varying intervals of time resulting in blood parasitemia. Differentiation between relapses, treatment failure and new infections is not a trivial task due to the high frequencies of multiple-clone infection in malaria vivax.

Methods Primary-relapse paired samples from 30 patients with vivax malaria in Brazil were genotyped using 10 molecular markers (8 microsatellites and MSP-1 blocks 2 and 10). Cloning of a number of PCR products and genotyping was used to identify rare clones of parasites.

Results Here we showed for the first time a high frequency of multiple-clone infections in both primary and relapse infections. Besides that, there was a limited number of alleles per locus, and the combination of these alleles in haplotypes identified mainly heterologous relapsing parasites. Notably, *P. vivax* recurrences are characterized by fluctuations of parasite clones.

Conclusions Multiple-clone infection observed in both primary and relapse infections might be the consequence of heterologous hypnozoite activation. Our findings support an additional complexity in circulating genotypes during relapse infections and highlight the influence of yet speculative mechanisms in hypnozoite activation.

(189 words)

Key words Malaria, *Plasmodium vivax*, relapse, genetic variability; molecular marker, microsatellites, multiple-clone infection.

Plasmodium vivax is the most widespread human malaria parasite and is the main cause of malaria morbidity outside of Africa [1, 2]. Approximately 225 million malaria cases and 780.000 deaths occurred in 2009, taking 40% of world population at risk of infection [3]. In Brazil, roughly 350.000 episodes of disease are registered each year, 99% of which in the Amazon region, mainly due to the *P. vivax* infection [4].

P. vivax has a characteristic of keeping latent forms of the parasite in the liver, the hypnozoites, which remain dormant for varying periods of time after clearance of the primary acute blood-stage infection. In general, while relapsing parasites from the tropical zone – such as the “Chesson strain” - exhibit a short latency period before the appearance of frequent episodes of relapses, parasites from temperate zones – such as the “St Elizabeth strain” - show a prolonged latency period succeeded by few episodes of relapses [5]. In some areas, such as India, a mixed relapse pattern was described [6]. These findings indicate a remarkable regulation of relapse patterns, which suggest somehow genetically programmed parasites. Although the mechanisms that control relapse and determine their periodicity are largely unknown, many factors seem to contribute to both the timing and the number of relapses. Previous studies demonstrated that the number of sporozoites inoculated by the anopheline mosquito is a relevant factor [7, 8]. Other factors incriminated in hypnozoite’s activation are (i) a previous *P. falciparum* infection [9, 10]; (ii) influence of vectors - mosquito bites and anopheline species [6, 11]; (iii) systemic vivax febrile illness [12]; (iv) effects of host immune response [13, 14]; (v) effects of drugs [15, 16]; and finally (vi) regional differences – disease seasonality, latitude, altitude [17-19].

Elucidation of recurrent infections is a difficult task because those infections can either result from asexual blood-stage surviving after drug treatment (recrudescence),

novel infections, or relapses caused by the activation of hypnozoites in the liver, or combinations of all. In different endemic settings, the probability of relapses generally varies between 20% and 80% [20]; the proportion is currently around of 30% in tropical areas [6, 21, 22]. Thus, the relapses have important implications for the control of vivax malaria and also for the evaluation of drug treatment efficacy [23].

The molecular characterization of parasites from primary and recurrent infections is a crucial tool to define adequately the epidemiology of relapses. Different molecular markers have been used to genotype paired samples of primary and relapse episodes. Initially, genetically similar parasites were identified in primary and relapse episodes [24–26]. More recently a predominance of heterologous parasites in relapses has been demonstrated. These studies were based on the analysis of microsatellites, considered the most appropriate markers due to their neutral evolution mostly independent of the immune response of the host [21, 27–29].

The genotyping of microsatellites has revealed a high frequency of multiple-clone *P. vivax* infections, i.e. individuals with more than one genetically distinct parasite in areas with varying levels of transmission [30–32]. Therefore, relapses may originate from the activation of identical parasite clones of the primary infection (homologous parasites) or genetically distinct clones (heterologous parasites), making the task of relapse identification even more difficult. In this study, we hypothesized that multiple-clone infections usually described for *P. vivax* infections should also occur in relapses. Thus, we carried out a deep analysis of the genetic diversity of paired primary-relapse samples in patients who received specific antimalarial treatment (chloroquine plus primaquine) during their initial malaria infection and were then not further exposed to *P. vivax* reinfection.

METHODS

Studied individuals

Samples were selected from a frozen DNA bank, kept at the Laboratory of Malaria, in the Rene Rachou Institute - Fiocruz, Belo Horizonte, MG, and the following criteria were used to select patients who had primary-relapse paired samples: (i) the interval between the first acute episode and the first recurrence occurred between 30 days to 6 months ; (ii) *P. vivax* patients who were not re-exposed to malaria transmission (during the interval between recurrences); (iii) absence of pregnancy; (iv) minimum age of 14 years. Following these criteria, 30 *P.vivax*-infected patients (average age 37 years, range 14-63 years) were selected. Their malaria diagnosis and treatment were realized at the University Hospital Júlio Muller, UFMT, Cuiabá, MT, between 2001 and 2009 (Supplemental Table 1). At that time, all patients were treated according to the therapy guidelines of the Ministry of Health of Brazil (MS/SVS) with chloroquine (25 mg/kg/day over 3 days) and primaquine (0.5 mg/kg/day for 7 days) [33], and provided a written consent to store their blood samples, in accordance with guidelines for human research, as specified by the Brazilian National Council of Health (Resolution 196/96; approved protocol Number 05/2006 and 05/2010). The primary infection was defined by microscopic diagnosis of *P.vivax* at admission, and 7 out 30 patients reported suffering their first malaria infection (first sporozoite inoculation). The places of contagion were widely dispersed in the Amazon area, ranging from 9 Km to more than 3,500 Km (average of 1,205 Km) apart from the University hospital where no malaria transmission occurs. The interval between primary and recurrent parasitemias ranged from 32 to 199 days, and it was concentrated in a lag period of one to three months (average 2.3 months) (supplemental Figure S1).

DNA extraction and PCR amplification

DNA was extracted from whole blood samples using a Qiagen genomic DNA purification kit (Puregene®, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA) or the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) for extracting DNA from filter paper according to the manufacturer's protocols. Eight microsatellite loci (MS01, MS02, MS04, MS05, MS06, MS07, MS08 and MS11) and two MSP1 fragments (block 2 and 10) were amplified using specific primers and conditions described by Rezende *et al.* [34] and Koepfli *et al.* [35]. The 8 microsatellites selected for this study were highly polymorphic di-, tri- and tetranucleotide unit repeats. Polymerase Chain Reactions (PCRs) were performed using a gradient thermocycler (Eppendorf). The melting temperatures and magnesium concentration ranged from 50°C to 60°C and from 0.75 mM to 1.50 mM [34]. A reaction volume of 20 µL containing 20 pmol of each primer (forward and reverse), 0.125 mM dNTPs, 1X PCR buffer, and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) was used. The cycling parameters were set to: 1 cycle at 94°C for 2 min, 40 cycles at 94°C for 30s, 50 to 60°C for 20s and 72°C for 30s, and a final cycle at 72°C for 2 min. Amplified products were initially visualized in agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL).

Microsatellites and MSP1 genotyping

PCR products amplified using the forward primers labeled with fluorescein were separated and differentiated using capillary electrophoresis in an automatic DNA sequencer (MegaBACE, Amersham Biosciences, USA). Their lengths and relative abundance (peak heights in electropherograms) were determined using MegaBACE Fragment Profiler version 1.2 software and internal size standards (MegaBACE ET550-R). We measured allele frequencies using the single or predominant allele at

each locus per sample; non-predominant alleles were recorded and used to estimate multiplicity of infection. Importantly, all markers are single-copy loci and blood stage malaria parasites are haploid. The highest peak in the electropherogram was defined as the predominant allele and the other peaks that reached the minimal cut-off of detection were defined as additional alleles in a multiple-clone infection. The minimal cut-off value detectable peak height was set to 150 arbitrary fluorescence units (rFU). In our system, this value guaranteed a maximum of sensitivity and the absence of false positives.

PCR Product Cloning

To determine the presence of multiple infections, the amplification products of two markers were selected for cloning. By this way, 16 products were cloned from four primary-relapse pairs. The resulting PCR products were cloned into pGEM-T Vector (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's protocol. Recombinant vectors were used to transform *Escherichia coli* strain Top10 using thermal shock [36] and the cells were plated in LB agar supplemented with ampicillin (50 µg/mL). 10 to 20 colonies of each cloned product were grown out and the resulting plasmids extracted using kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). DNAs obtained were quantified in a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and used for parasite genotyping using two molecular markers arbitrarily chosen. To check multiple infections and the possible slippage of the polymerase during amplification of the microsatellite, the genotyping obtained from recombinant plasmids containing the cloned PCR products were compared with those from the original DNA.

Statistical analysis

We calculated the gene diversity (expected heterozygosity, H_E), defined as the probability that a pair of alleles randomly obtained from the population differs, using Arlequin 3.0 software [37]. The genetic diversity of parasites from primary and relapse malaria episodes was compared using AMOVA [38].

RESULTS

Of the 30 patients studied, 26 had a single recurrent parasitemia and 4 had two or more recurrent infections (in total, 35 recurrences over the follow-up period). The resulting 65 acute samples of *P. vivax* showed a high haplotype variability, with 57 single haplotypes identified using a panel of 10 markers (Haplotype diversity = 0.9957 ± 0.0037). The expected heterozygosity varied from 0.48 to 0.96 among the loci (0.77 ± 0.13).

Considering the predominant allele, the analysis of primary-relapse paired samples (one or more per patient) showed the highest proportion of parasites (46%) with heterologous haplotypes, i.e. harboring different alleles in more than 2 of 10 markers (Figure 1A), similar to what was shown by Orjuela-Sanchez and colleagues [21]. No parasite showed a totally different haplotype in primary and relapse episodes. Interestingly, 55% of the relapsing parasites carrying haplotypes that were related or totally homologous to the primary infection. The expected heterozygosity (H_E) was not significantly different in parasites from primary and relapse episodes (Primary: $H_E = 0.779 \pm 0.129$; first relapses: $H_E = 0.798 \pm 0.115$; second relapses: $H_E = 0.810 \pm 0.197$; AMOVA test $P=0.7116$).

Taking in account only the predominant allele, the number of alleles detected by each marker was limited, ranging from 5 to 12 (Table 1 and Figure 1B); only one marker (MS11) identified 31 alleles. The number of all alleles (predominant and rare)

detected in the primary and relapse episodes was still limited; the increase of 14 rare alleles in the analysis did not modify significantly the average of alleles (9 to 10, without MS11, considered here as an outlier). This finding reflects the variation in the ability to detect low frequency alleles among those 10 markers used here, and demonstrated a significant fluctuation between predominant and rare alleles during the course of infection. In four patients who had multiple recurrent infections, it was possible to confirm the fluctuation of predominant alleles (Figure 2). In these patients, it was possible to identify two to six different predominant alleles in each marker. Usually, these markers showed the same predominant allele in all consecutive samples of each patient (25 out 40, 65%). Considering the remaining alleles, 9 out of 14 were identical during the relapses, nevertheless, the dominant genotypes were still distinct from the primary infection. Taken together, the combination of these alleles resulted in 10 different haplotypes (H1 to H10); only one patient harbored the same haplotype in all episodes (Patient 17; Figure 2).

In order to verify whether the detection of distinct alleles during the course of infection was due to their low frequencies in preceding malaria episodes, PCR products of two markers (randomly selected) from four patients were cloned and 10 to 20 clones were analyzed per product (Figure 3). The results demonstrated that the majority of cloned samples (12 out of 16, 75%) included more than one allele, representing a multiple clone infection in both initial and recurrent infections; notably, up to 4 distinct alleles per marker could be identified in the same patient (Figure 3). Therefore, these data strongly support the hypothesis that those distinct alleles detected in the recurrent infections corresponded to undetected parasite clones in low abundance, present in the primary infection.

To further confirm whether the rare alleles were not identified in the primary infection because of their low level of fluorescence, we re-analyzed the original

electropherogram peaks. Figure 4 illustrates two situations in which predominant peaks have different heights while the rare ones were similar in heights. In panel A, the predominant peak had 455 rFU and the rare had 153 rFU, i.e., one-third of the predominant peak height. In panel B, the lower peak had similar intensity of fluorescence as in panel A (188 rFU), however, the predominant peak has 4665 rFU (25 times higher). In support of these data, the presence of rare alleles was further confirmed by cloning (data not shown). Thus, by properly adjusting the cut-off (≥ 150 rFU), the molecular markers were able to detect a high frequency of multiple clone infections. Considering multiplicity of infection detected at least by one marker, 91% of multiple clone-infections could be detected (59 out of 65 samples, Figure 5A). However, taking in account two markers, the percentage of multiple infections detection decreased to 85%, and with a minimum of three markers this ability decreased to 58% (Figure 5A). This data suggests a variation among these molecular markers in the ability to detect multiple infections, which two microsatellite markers (MS01 and MS07) accounting for most of this detection (Figure 5B). In conclusion, although five markers were able to detect all multiple-clone infections, the results suggest that fewer markers can be used to detect the majority of multiple-clone infection.

DISCUSSION

The activation of heterologous hypnozoites seems to be the most common cause of relapse [27, 29, 31, 39]. The results presented here reinforce previous studies, showing that the majority of relapses were caused by parasite populations distinct from the first parasite wave. However, the novelty of our study was the identification of a high multiplicity of infections not only in primary infections but also during

relapses. These findings make the concept of heterologous activation more complex, because, it means that the allele present in subsequent relapses could also be present in the primary infection (as a rare allele). Also, the predominant initial parasite might not be predominant in the relapse, which shows that circulating parasite clones fluctuate considerably during *P. vivax* recurrences. Consequently, the activation in relapses might be either from homologous or heterologous hypnozoites. According, Koepfli *et al.* [40] reported a fluctuation in the predominant allele during the course of vivax primary infection. Following vivax patients in Peruvian Amazon, the results of Van Den Eede and colleagues [39] reinforced this hypothesis of a high turnover of parasite genotypes in recurrences. Considering the importance of these findings, large-sized studies are needed to analyze the multi-clone infection during vivax recurrence, specifically under the perspective of a looming primaquine resistance.

A significant number of studies approached the mechanisms of hypnozoite activation. Recently, data from a well-conducted study with infants in Thailand demonstrated that the first vivax relapse of life is usually with genetically homologous parasites; basically because there is no previously acquired hypnozoites to be activated [41]. In the present study, five out of seven primarily infected patients showed a single clone infection with homologous parasites in the subsequent recurrences. Thus, our results corroborate the hypothesis of homologous activation after first sporozoite inoculations. Notwithstanding, it is important to consider that malaria infection can be induced by the inoculation of more than one clone (sporozoites from different mosquitoes) and, as hypothesized here, more than one clone of hypnozoites can remain latent until some of them are simultaneously activated. Consequently, it is not feasible to differentiate if the heterologous hypnozoites are first activated - which also explain its prevalence in relapse - or if this

difference is related to the number of heterologous/homologous dormant clones that could be simultaneously activated [27]. Since in the current study most of the primary infections do not correspond to the first sporozoite inoculation of life, it is not excluded that previous infections could also be a source of heterologous hypnozoites.

An interesting point not considered in previous studies was the limited number of alleles used to build the high number of haplotypes shown by us and others [21]. This limitation could be due to the intrinsic characteristic of microsatellites/minisatellites (such as MSP1b12 and 10) that control their own size, maintaining a limited pool of alleles per locus [42]. Another hypothesis for the high variability despite the limited number of alleles could be some unknown mechanism of DNA rearrangements. A type of mechanism like that has to be active during the mitotic replication of the parasite, such as the schizogony, and may not disrupt the high linkage disequilibrium reported in *P. vivax* [43–45]. Although relevant, this hypothesis has not been investigated yet.

Aiming to improve sensitivity to detect multiple clone infection, the approach to identify rare alleles used herein was based on the analysis of electropherograms using a lower cut-off level (≥ 150 rFU). By cloning PCR products, it was possible to confirm the specificity of this strategy that allowed the identification of high levels of multiple clone infections. Furthermore, by using a more common criterion to detect rare peaks, based on the quantification of peak heights [46, 47], multiple clone infection was also confirmed in our primary-relapse samples (Supplementary figure S2). However, our results demonstrated that this criterion has limitations depending on the height of the predominant peak. At this time, it is not possible to exclude that our finding might be a characteristic of the herein studied *P. vivax* populations. However, as the multiplicity of infections has been demonstrated for different *P. vivax*

populations [31, 32, 43-45, 48], we believe that it is a common phenomenon of relapsing parasites, but not identified yet due to the low sensitivity of previous protocols. Here, in order to reduce the artifacts in genotyping, we have used several strategies: repeat genotyping using different PCR products from the same patient (to avoid dropout); confirm rare alleles using cloning before genotyping (to detect low frequent alleles); and reduced stutter peaks (peaks closer or attached to the main peak result from DNA slippage during PCR) in PCR standardization or discard them from analysis. In conclusion, our approach is useful to detect low-frequent clones, but should be used with caution to avoid an overestimation of multiple clone infections.

Taken together our results showed a high haplotype variability and multiplicity of clones in relapsing parasites. Our results provide new insights on the molecular biology of relapses that must be considered in control strategies of the disease.

(3,010 words)

Notes

Financial support. This work was supported by the PRONEX malaria network: CNPq/Ministry of Healthy-DECIT; FAPEMAT; and FAPEMIG. CFADB, LHC and CJFF were supported by CNPq fellowships. FCFA and AMR are supported by scholarships from CNPq and Fapemig, respectively.

Potential conflict of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for disclosure of potential conflicts of interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Acknowledgements

We are grateful to all patients who made this study possible. We also thank the Program for Technological Development in Tools for Health - PDTIS platform (FIOCRUZ) for DNA sequencing facilities.

Figure legends

Figure 1. Comparison of genotyping of *P. vivax* from paired samples of primary and relapse parasites of 30 individuals using 10 molecular markers. (A) Haplotypes built using only the predominant allele of each marker. Totally homologous – parasites showing all markers with the same allele; Homologous or Related – parasites with 80 to 90% of markers with the same allele; Heterologous - parasites showing less than 80% of markers with the same allele; totally heterologous – parasites showing all markers with different alleles. Relapsing parasites were compared with the closest acute malaria episodes from each patient. (B) Number of alleles detected by each marker considering only the predominant allele or all alleles in the malaria episodes (primary and relapses). The average of alleles was 9.2 ± 2.3 and 10.8 ± 2.7 (without MS11 data) for predominant and all alleles, respectively, and 11.4 ± 7.3 and 13.4 ± 8.7 (with MS11 data).

Figure 2. (A) Fluctuation in the predominant alleles detected in samples of four patients during different times of blood collection: primary infection (1st acute episode), first relapse (2nd acute episode), second relapse (3th acute episode) and third relapse (4th acute episode). Alleles are represented by different forms for each marker delimited by dotted lines (indicated on the right side). MS – microsatellites numbered according to Rezende *et al.* [36], MSP1b12 and MSP1b10 – merozoite surface antigen 1 block 2 and 10, respectively. Haplotypes are indicated on top of the figure. (B) Frequencies of markers showing the same alleles at all times of blood collection (in each patient), relapsing episodes showing the same alleles but distinct from primary infection or primary and relapsing parasites showing distinct alleles.

Figure 3. Demonstration of the genotypic profile of parasites from four patients before and after genotyping of PCR product cloning using two molecular markers

(randomly chosen) of each patient. Each form represents an allele, therefore the presence of two or more forms characterize a multiple clone infection. The sizes of forms represent the frequency of each allele (bigger for predominant and smaller for rare alleles). Before cloning the allele frequency was determined through the height of the peak in genotyping and after cloning the frequencies were inferred by the number of plasmid clones bearing identical sequences. Molecular markers analyzed here were: MM1- MSP1BI10; MM2- MS07; MM3-MSP1BI2; MM4- MS02.

Figure 4. Genotyping of two samples with distinct profiles for the same marker (MSP1BI02). (A) Multiple infection in which the minor peak had a third of the fluorescence level (rFu) compared to the predominant peak. (B) Multiple infection in which the predominant allele has a 25 times higher level of fluorescence compared to the smaller peak (rare allele). Fragments sizes are represented on the X axis of the graph. Light gray peaks represents the molecular marker used (MegaBACE™ ET550-R).

Figure 5. Detection of multiple-clone *P. vivax* infections using a panel of 10 markers. (A) Number and percentage of malaria episodes showing multiple clone infections detected by different numbers of markers. (B) Minimal number of markers capable to detect all multiple clone infections was five markers: MS01 (77%), MS01 + MS07 (92%), MS01+ MS07 + MSPBI2 (97%), MS01+ MS07 + MSPBI2 + MS11 (98%), MS01+ MS07 + MSPBI2 + MS11 + MS08 (100%).

Additional files

Figure S1. Interval between primary infection and relapse infections. Time in lag months per individual (A) and frequencies of episodes with different intervals (B). Repeated individual numbers represent a second relapse episode (gray bars) and a third relapse episode (black bar). Individuals with a primary infection are denoted by

an asterisk. Number of lag months are represented on the X axis: one lag month = 0.5 to 1.5 months, two lag months = >1.5<2.5 months, and so on.

Figure S2. Comparison of percentages of multiple clone infections in primary and relapse episodes detected based on the ≥ 150 rFU cut off , rare alleles with intensities of one quarter or one third of the intensity of the predominant allele.

TableS1. Description of patient's characteristics

REFERENCES

1. Hay S, Guerra C, Tatem A, *et al.* The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* **2004**; 4:327–36.
2. Price R, Tjitra E, Guerra C, *et al.* Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 77:79–87.
3. WHO World Health Organization, World Malaria Report 2010. Ed. Who Press, W. H. O., Geneva, **2010**.
4. Ministério da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica. *Aspectos epidemiológicos da Malária*. – Brasilia : Ministerio da Saude, **2010**.
5. Craige B, Alving A, Jones R, *et al.* The Chesson strain of *Plasmodium vivax* malaria. I. Relationship between prepatent period, latent period and relapse rate. *J Infect Dis* **1947**; 80:228-36.
6. Adak T, Sharma V, Orlov V. Studies on the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Delhi, India. *Am J Trop Med Hyg* **1998**; 59:175-9.
7. Contacos P, Collins W, Jeffery G, *et al.* Studies on the characterization of *Plasmodium vivax* strains from Central America. *Am J Trop Med Hyg* **1972**; 21:707-12.
8. Warren M, Garnham P. *Plasmodium cynomolgi*: X-irradiation and development of exo-erythrocytic schizonts in *Macaca mulatta*. *Exp Parasitol* **1970**; 28:551–6.
9. Sinton J. Studies in malaria, with special reference to treatment. Part II. The effects of treatment on the prevention of relapse in infections with *Plasmodium falciparum*. *Indian J Med Res* **1932**; 13:579-601.

10. Douglas N, Nosten F, Ashley E, *et al.* *Plasmodium vivax* Recurrence Following Falciparum and Mixed Species Malaria: Risk Factors and Effect of Antimalarial Kinetics. *Clin Infect Dis* **2011**; 52:612–20.
11. Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J* **2011**; 10:90.
12. James S, Shute P. Report on the first results of laboratory work on malaria in England. *League of Nations. Health Organization. Geneva. C. H. Malaria* **1926**; 57:30.
13. Boyd M, Stratman T, Kitchen S. On the duration of homologous immunity to *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med* **1936**; 16:311-5.
14. Boyd M. A review of studies on immunity to vivax malaria. *J Natl Malar Soc* **1947**; 6:12-31.
15. Sinton J, Bird W. Studies in malaria with special reference to treatment; plasmogone in treatment of malaria. *Indian J Med Research* **1928**; 16:159.
16. Gogtay N, Desai S, Kamtekar K, *et al.* Efficacies of 5- and 14-day primaquine regimens in the prevention of relapses in *Plasmodium vivax* infections. *Ann Trop Med Parasitol* **1999**; 93:809-12.
17. Gill C. The seasonal periodicity of malaria and the mechanism of the epidemic wave. JA Churchill Ltd. London. **1938**.
18. Goller J, Jolley D, Ringwald P, *et al.* Regional differences in the response of *Plasmodium vivax* malaria to primaquine as anti-relapse therapy. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 76:203-7.
19. Howe C, Duff F. Effect of altitude anoxia in provoking relapse in malaria *Science* **1946**; 103:223.
20. White, N. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* **2011**; 10:297.

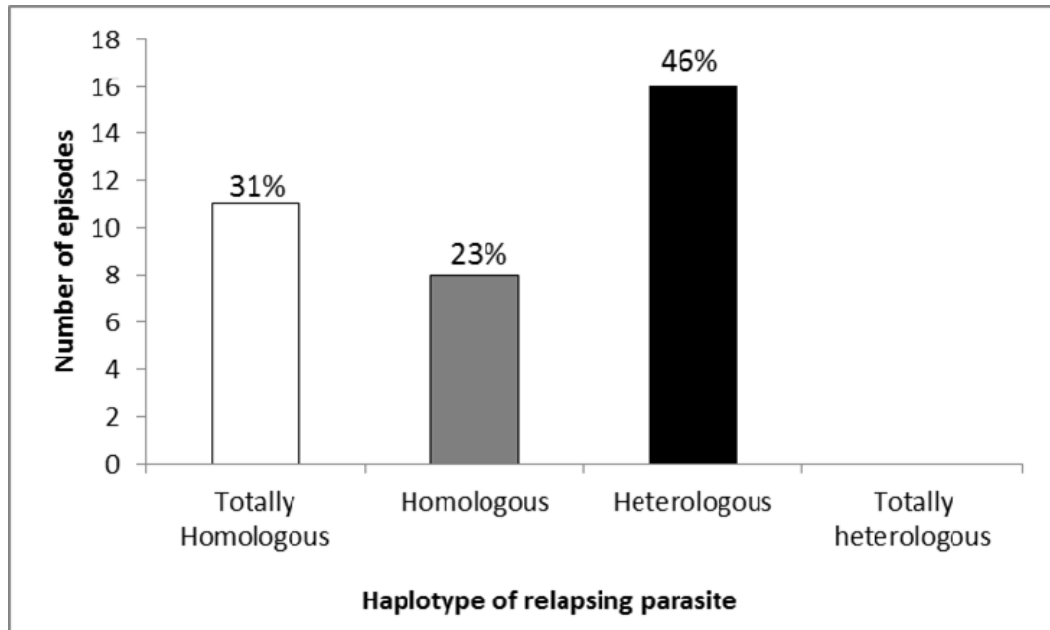
21. Orjuela-Sánchez P, da Silva N, da Silva-Nunes M, *et al.* Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 81:961-8.
22. Katsuragawa T, Gil L, Tada M, *et al.* The Dynamics of Transmission and Spatial Distribution of Malaria in Riverside Areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of Brazil. *PLoS ONE* **2010**; 5:e9245.
23. Galappaththy G, Omari A, Tharyan P. Primaquine for preventing relapses in people with *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2007**;1. Art. No.: CD004389.
24. Craig A, Kain K. Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. *J Infect Dis* **1996**; 174:373–9.
25. Kirchgatter K, Del Portillo H. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis* **1998**; 177:511-5.
26. Khusmith S. Antigenic disparity of *Plasmodium vivax* causing initial symptoms and causing relapse. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **1998**; 29:519–24.
27. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, *et al.* Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis* **2007**; 195:927-33.
28. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, *et al.* Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis* **2007**; 195:934-41.
29. Restrepo E, Imwong M, Rojas W, *et al.* High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop* **2011**; 119:23-9.
30. Havryliuk T, Orjuela-Sánchez P, Ferreira MU. *Plasmodium vivax* : microsatellite analysis of multiple - clone infections. *Exp Parasitol* **2008**; 120:330–6.

31. Van den Eede P, Erhart A, Van der Auwera G, *et al.* High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am J Trop Med Hyg* **2010**; 82:223-7.
32. Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C, *et al.* Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J* **2010**; 9:151.
33. Ministério da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Diretoria Técnica de Gestão. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil.* – Brasilia : Ministerio da Saude, **2009**.
34. Rezende A, Tarazona-Santos E, Fontes C, *et al.* Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health* **2010**; 15:718-26.
35. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, *et al.* Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis* **2009**; 199:1074-80.
36. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, *et al.* A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* **1990**; 18:6169.
37. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform* **2007**; Online 1:47–50.
38. Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **1992**; 131:479-91.
39. Van den Eede P, Soto-Calle V, Delgado C, *et al.* *Plasmodium vivax* sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. *PLoS ONE* **2011**; 6:e16257.
40. Koepfli C, Schoepflin S, Bretscher M, *et al.* How Much Remains Undetected? Probability of Molecular Detection of Human Plasmodia in the Field. *PLoS ONE* **2011**; 6:e19010.

41. Imwong M, Boel M, Pagornrat W, *et al.* The first *Plasmodium vivax* relapses of life are usually genetically homologous. *J Infect Dis* **2012**; 205:680–3.
42. Ellegren H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* **2004**; 5:435-45.
43. Ferreira M, Karunaweera N, da Silva-Nunes M, *et al.* Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis* **2007**; 195:1218-26.
44. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, *et al.* Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol* **2007**; 37:1013–22.
45. Gunawardena S, Karunaweera N, Ferreira M, *et al.* Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* **2010**; 82:235–42.
46. Anderson T, Su X, Bockerie M, *et al.* Twelve microsatellite markers for characterisation of *Plasmodium falciparum* from finger prick blood samples. *Parasitology* **1999**; 119:113–26.
47. Anderson T, Haubold B, Williams J, *et al.* Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* **2000**; 17:1467-82.
48. Karunaweera N, Ferreira M, Munasinghe A, *et al.* Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene* **2008**; 410:105-12.

Figure 1.

A



B

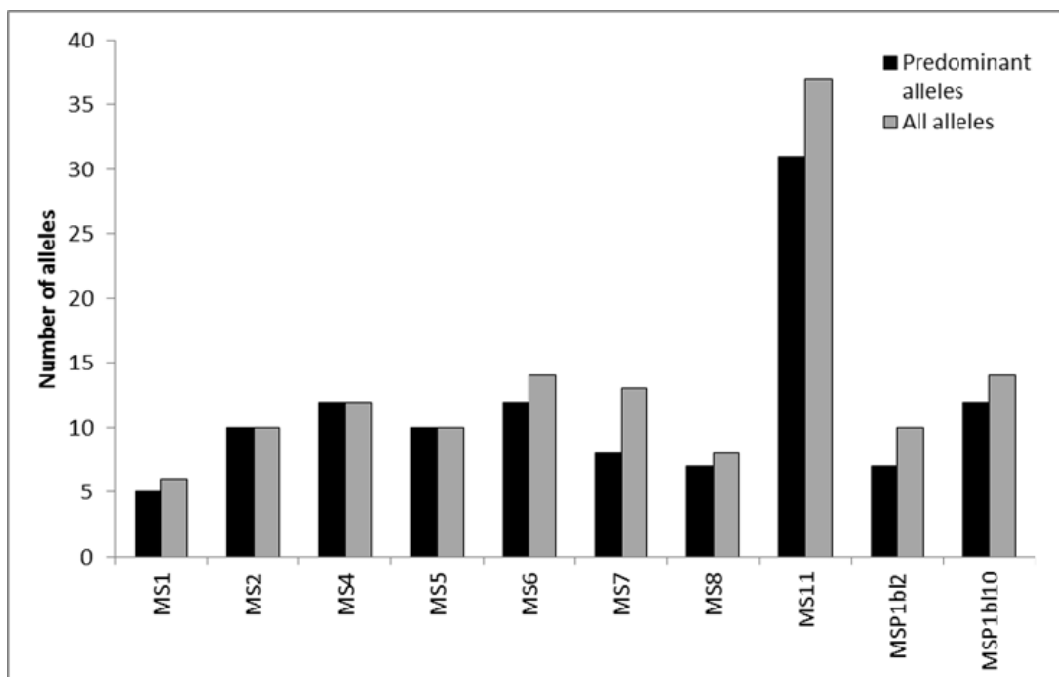


Figure 2.

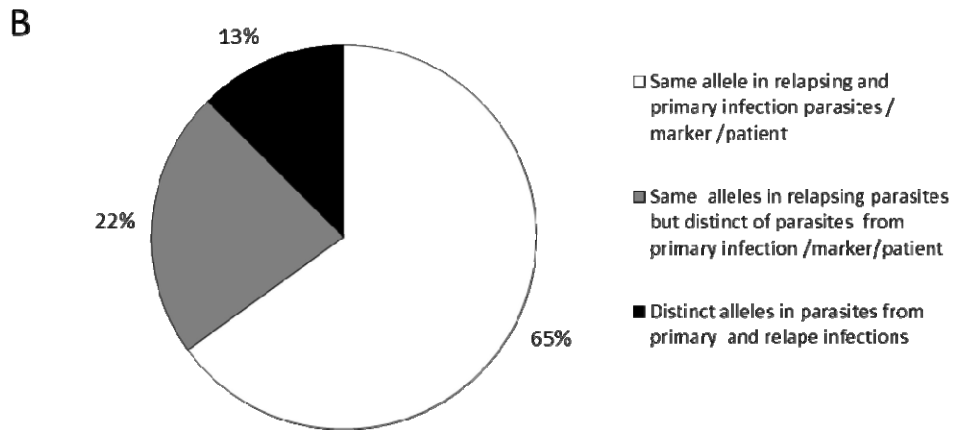
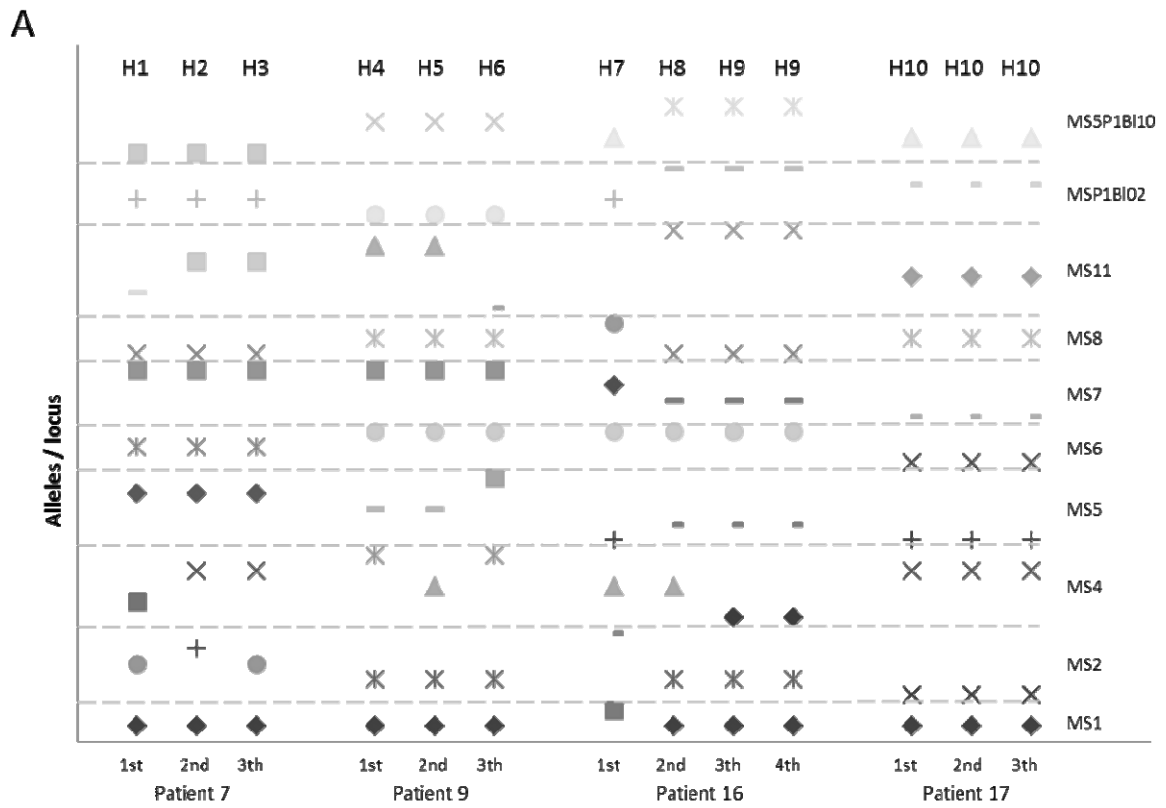


Figure 3.

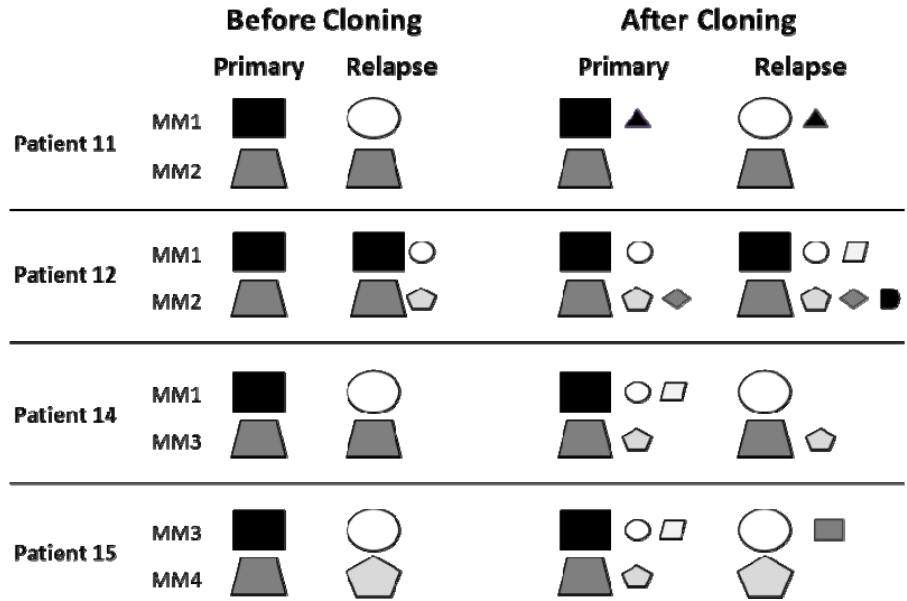


Figure 4.

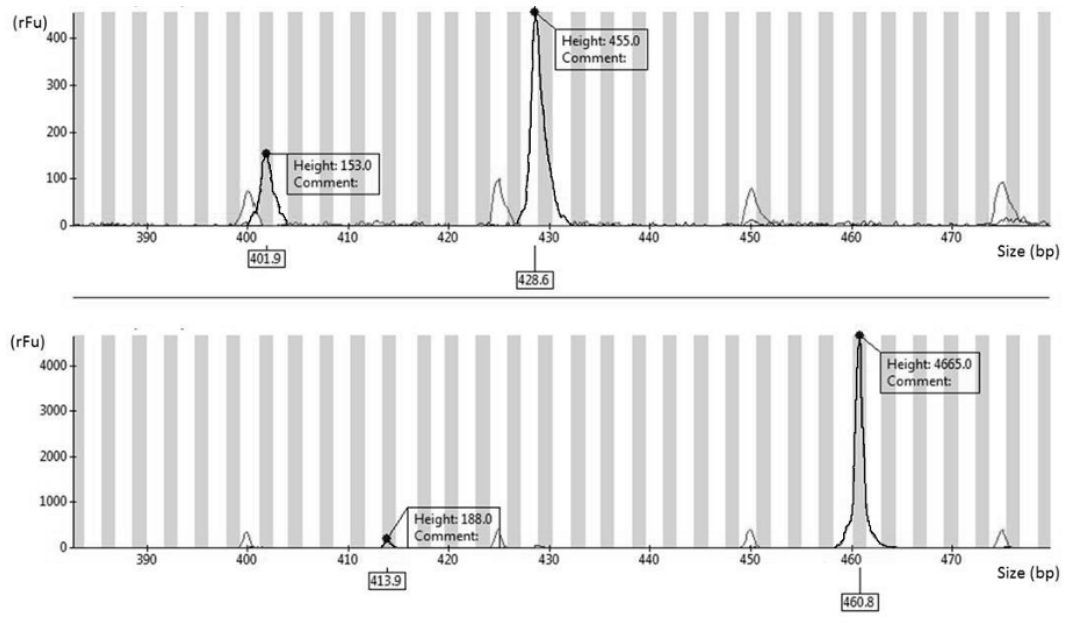
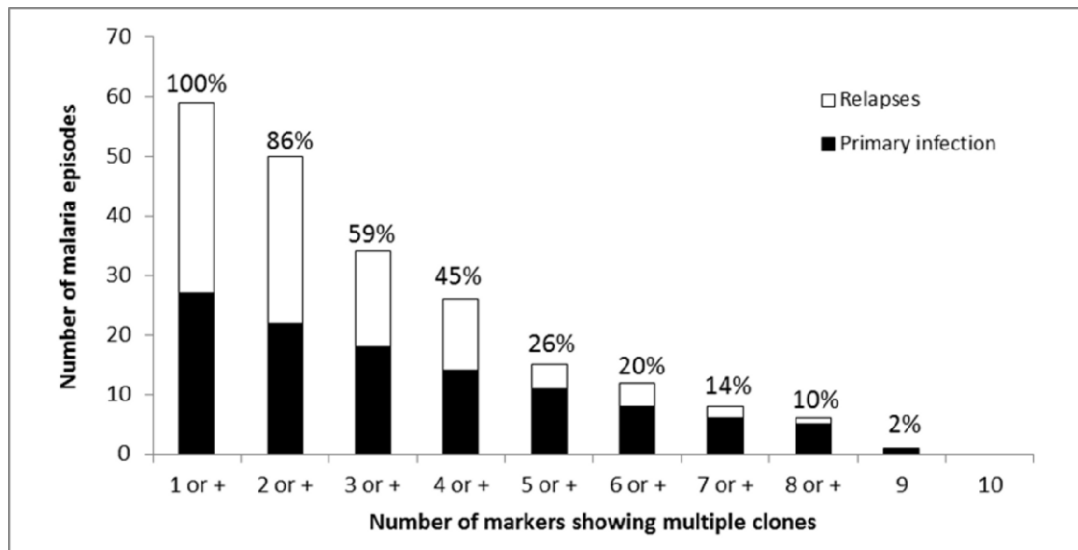


Figure 5.

A



B

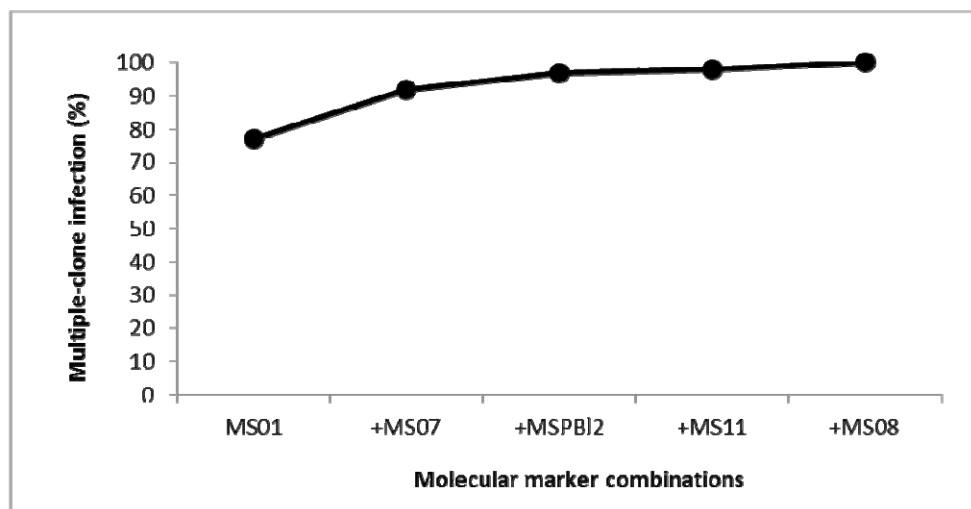
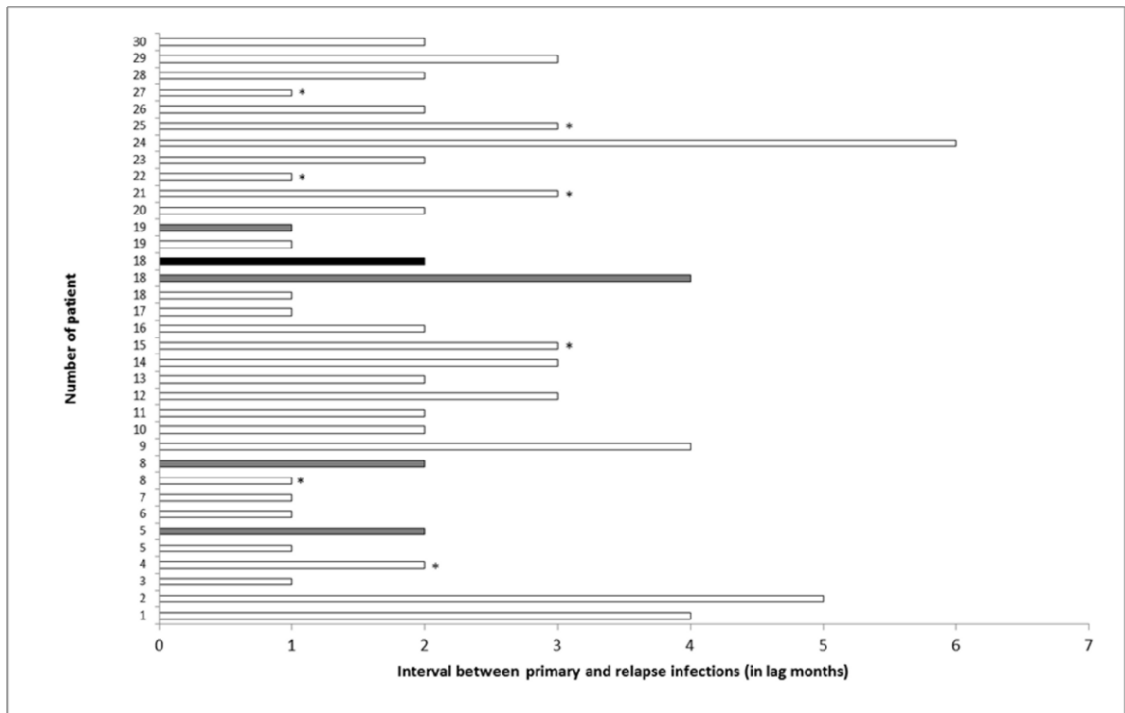


Figure S1

A



B

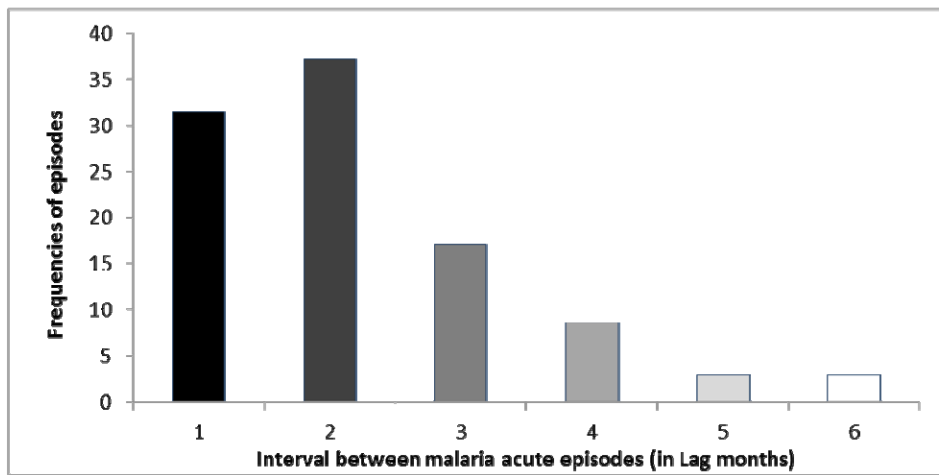


Figure S2

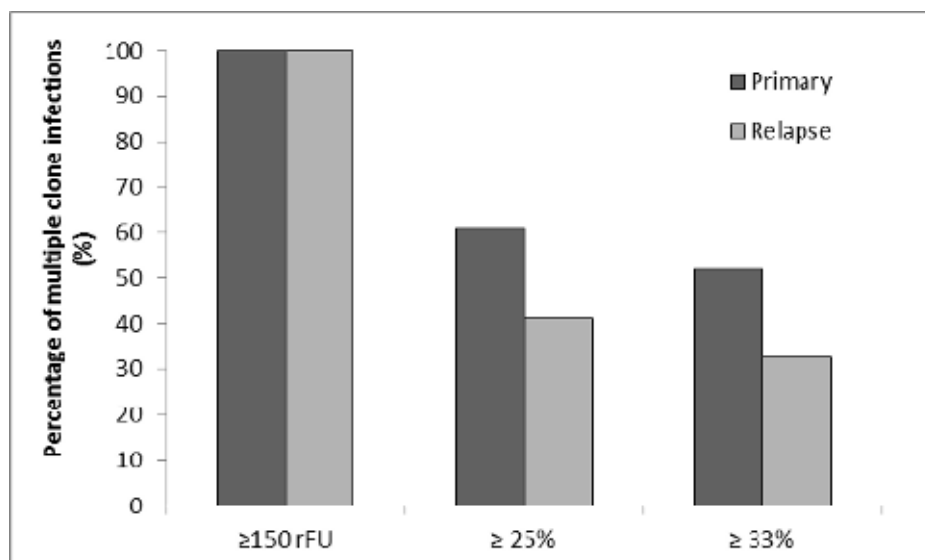


Table 1.

Table 1: Distribution of alleles frequencies through the markers and their number of alleles and expected heterozygosity (H_E) per locus

Alleles	MS1	MS2	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS11	MSP1b12	MSP1b10
1	11	1	11	5	5	3	2	2	1	17
2	9	5	6	28	3	34	3	2	12	5
3	71	3	20	11	9	25	28	3	23	9
4	3	1	1	6	58	5	31	3	8	14
5	6	54	8	31	3	17	16	2	29	15
6		5	1	8	1	12	5	3	8	1
7		8	5	2	1	3	16	8	18	14
8		6	1	5	6	1		3		3
9		15	17	2	1			2		1
10		1	12	3	3			2		15
11			5		5			2		3
12			12		3			11		1
13								2		
14								6		
15								2		
16								2		
17								3		
18								2		
19								3		
20								3		
21								5		
22								2		
23								3		
24								3		
25								3		
26								3		
27								2		
28								8		
29								3		
30								2		
31								3		
Number of										
distinct alleles	5	10	12	10	12	8	7	31	7	12
H_E	0.4817	0.6812	0.8885	0.8080	0.6471	0.7889	0.7832	0.9693	0.8125	0.8856

Table S1: Description of patient's characteristics

Patient number	Malaria episode	Data blood collection (Day/month/year)	Parasitemia (infected RBC/ μ L)	Age	Contagion localities
1	Primary	12/03/2007	2412	31	Itaituba/AM
	Relapse	22/07/2007	686		
2	Primary	06/04/2006	3635	64	Espigão D'Oeste/RO
	Relapse	11/09/2006	5180		
3	Primary	04/07/2005	684	16	São João Del Rey/MT
	Relapse	08/08/2005	425		
4*	Primary	13/10/2005	49	54	Rio Branco/AC
	Relapse	22/12/2005	415		
5	Primary	23/06/2009	750	47	Ariquemes/RO
	Relapse	15/08/2009	750		
6	Primary	22/02/2007	3158	25	Humaitá/AM
	Relapse	11/04/2007	1343		
7	Primary	02/08/2006	5836	23	Ariquemes/RO
	Relapse	05/09/2006	519		
	Relapse	08/11/2006	NA		
8*	Primary	16/02/2007	2145	29	Santo Antônio do Leverger/MT
	Relapse	21/03/2007	1786		
9	Primary	19/02/2005	895	31	Manicoré/AM
	Relapse	28/03/2005	200		
	Relapse	25/05/2005	1460		
10	Primary	18/03/2005	1630	37	Novo Progresso/PA
	Relapse	08/07/2005	719		
11	Primary	21/12/2006	1618	33	British guyana
	Relapse	23/02/2007	2910		
12	Primary	03/10/2006	418	14	Pontes e Lacerda/MT
	Relapse	12/12/2006	32		
13	Primary	06/07/2005	2418	48	Machadinho D'Oeste/RO
	Relapse	30/09/2005	1256		
14	Primary	21/07/2005	NA	36	Porto Velho/RO
	Relapse	28/09/2005	1344		
15*	Primary	05/09/2006	3087	41	Colniza/MT
	Relapse	11/12/2006	8238		
16	Primary	12/09/2005	2610	61	Machadinho D'Oeste/RO
	Relapse	19/10/2005	620		
	Relapse	03/02/2006	2260		
	Relapse	30/03/2006	NA		
17	Primary	09/09/2004	68	48	Feliz Natal/MT
	Relapse	11/10/2004	2004		
	Relapse	20/11/2004	1260		
18	Primary	06/06/2005	NA	42	Ariquemes/RO
	Relapse	11/08/2005	1918		
19	Primary	13/10/2005	5535	19	Rio Branco/AC
	Relapse	14/11/2005	2631		
20	Primary	25/10/2004	815	46	Alto Paraíso/RO
	Relapse	04/01/2005	2810		
21*	Primary	14/11/2005	868	25	Junena/MT
	Relapse	29/12/2005	938		
22*	Primary	17/11/2004	1260	24	Novo Progresso/PA
	Relapse	14/01/2005	1680		
23	Primary	22/06/2005	2714	36	Machadinho D'Oeste/RO
	Relapse	13/09/2005	NA		
24	Primary	26/02/2008	2415	42	Cruzeiro do Sul/AC
	Relapse	14/05/2008	1318		
25*	Primary	26/07/2005	593	63	Humaitá/AM
	Relapse	27/01/2006	2680		
26	Primary	31/07/2001	1142	25	Porto Velho/RO
	Relapse	21/10/2001	5740		
27*	Primary	24/01/2005	675	63	Colniza/MT
	Relapse	09/03/2005	15		
28	Primary	04/07/2005	555	37	Rio Machado/RO
	Relapse	03/10/2005	5106		
29	Primary	24/03/2008	1223	36	Várzea Grande/MT
	Relapse	20/05/2008	468		
30	Primary	14/01/2008	1698	42	Novo Progresso/PA
	Relapse	14/02/2008	3610		

* Primoinfected patients (first sporozoite inoculation)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi avaliada a variabilidade genética de isolados de *Plasmodium vivax* provenientes de amostras pareadas de pacientes infectados que foram clinicamente acompanhados no Hospital Universitário Júlio Muller/MT localizado em área onde não há transmissão ativa da doença e que, após cura e desaparecimento de parasitemia sanguínea com o tratamento recomendado, apresentaram episódio (s) de recaída(s) da malária vivax. Devido a ocorrência de alguns pacientes com múltiplos episódios de recaída, este estudo pode ser uma evidência de parasitos resistentes à primaquina, porém estudos de dosagem plasmáticas da droga são necessários para confirmação desse dado.

Utilizando os critérios de inclusão das amostras foi possível excluir a possibilidade de que as recorrências têm como sua origem a recrudescência ou uma nova infecção, fatores que poderiam interferir nas análises de recaídas e dificultariam a interpretação dos dados.

Utilizando a técnica de eletroforese capilar foi possível determinar o tamanho exato dos fragmentos alélicos dos 10 diferentes marcadores moleculares, identificar infecções múltiplas em episódios sintomáticos e diferenciar, nas infecções múltiplas, os alelos provenientes de parasitos distintos pelo tamanho dos fragmentos e pela intensidade de fluorescência gerados pela leitura do seqüenciador automático.

Este trabalho foi pioneiro em identificar múltiplas infecções nos episódios de recaída, e o alelo da infecção primária geralmente estava presente nos episódios de recaída, na maioria das vezes não como alelo predominante.

Os parasitos apresentam diversidade genética elevada e foram encontrados 56 haplótipos distintos nas 65 amostras estudadas, porém o número de alelos geralmente é limitado por marcador, sendo em média 9 alelos por marcador. Estes dados sugerem que a grande variabilidade haplotípica pode ser resultado de altas taxas de recombinação não meiótica, ou seja, rearranjos mitóticos durante as replicações do parasito por esquizogonia (Ferreira *et al.* 2007).

A ativação de hipnozoítos é principalmente heteróloga, mas os haplótipos são altamente relacionados devido à limitada disponibilidade de alelos. Tanto nas análises que utilizam somente o alelo predominante quanto nas análises que utilizam todos os alelos identificados, os parasitos das recaídas possuem, em sua maioria, alelos com tamanhos idênticos em relação aos parasitos da infecção primária e que infecções múltiplas são muito comuns, como relatado por outros

autores (Havryliuk *et al*, 2009). Com apenas 5 marcadores moleculares utilizados neste estudo, consegue-se identificar todas as infecções múltiplas nas infecções, sendo que com 2 marcadores já consegue-se identificar cerca de 90% das infecções múltiplas.

Nos pacientes que apresentaram mais de um episódio de recaída, acreditamos que exista uma flutuação no nível dos clones parasitários circulantes. Para confirmar essa hipótese, coletas venosas em dias consecutivos dos pacientes infectados seriam necessárias para verificar se os níveis de clones circulantes variam de acordo com o ciclo biológico de cada clone.

Através da técnica de clonagem e posterior genotipagem foi possível identificar infecções com até 4 parasitos distintos. Outro ponto importante é que foi possível verificar que a detecção de alelos raros baseada na proporção dos níveis de fluorescência em relação aos alelos predominantes devido à grande variação na fluorescência máxima dos picos. Assim, estas estratégias estão subestimando as infecções múltiplas que puderam ser confirmadas na clonagem dos fragmentos.

Entretanto, a alta taxa de infecções múltiplas e a alta diversidade haplotípica dificultam a identificação de um marcador específico das recaídas e o entendimento dos mecanismos de ativação dos hipnozoítos. A realização de biópsias hepáticas seria uma das estratégias para esclarecer estes mecanismos, porém, tal técnica se torna inviável em humanos infectados devido a questões éticas e de saúde e os modelos animais também não são de fácil utilização. Outra possibilidade seria o desenvolvimento de um modelo *in vitro* para estudo de hipnozoítos em cultivo de células hepáticas onde seria possível identificar os fatores responsáveis pelo direcionamento de latência e ativação dos hipnozoítos.

Os resultados apresentados são de grande relevância para o entendimento da biologia do parasito que envolve fatores imprescindíveis para o mapeamento de determinantes que contribuem com importantes fenótipos do parasito, tais como o padrão de recaídas, resistência às drogas e variabilidade antigênica.

7 REFERÊNCIAS

Adak T, Sharma VP, Orlov VS. Studies on the Plasmodium vivax relapse pattern in Delhi, India. Am J Trop Med Hyg. 1998 Jul;59(1):175-9.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. Nat Med. 2006 Feb;12(2):220-4

Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, *et al.* Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol Biol Evol. 2000 Oct;17(10):1467-82.

Baird JK, Rieckmann KH. Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? Trends Parasitol. 2003 Mar;19(3):115-20.

Baird JK. Resistance to therapies for infection by Plasmodium vivax. Clin Microbiol Rev. 2009 Jul;22(3):508-34.

Barbosa J. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia. Brasília: SVS, 2011. 21p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf>. Acesso em: 05 dez 2011

Barnwell JW, Galinski MR. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In: IW Sherman editors. Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington DC: ASM Press; 1998. P. 93-120.

Bignami A. Como si prendono la febbri malariche. Recerche speriment. Bull. R. Acad. (Roma) 1898; 2: 1786-1788.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Terapêutica da Malária*. 6. ed. Brasília: FUNASA, 2001. 102 p. (Vigilância Epidemiológica).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Aspectos epidemiológicos da Malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2>. Acesso em: 05 dez 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010b. 36 p. : il. color. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. *Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil*. Brasília:

MS, 2007. 12 p. Disponível em: < <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phi82/index.html> >. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener. Acesso em: 28 dez. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. *Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil*. Brasília: MS, 2008. 2p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf>. Acesso em: 28 dez.2011.

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

Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, *et al.* Genetic diversity and dynamics of *plasmodium falciparum* and *P. vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. Parasitology. 2000 Sep;121 (Pt 3):257-72.

Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. J Infect Dis. 2007 Apr 1;195(7):934-41.

Coatney GR, Cooper WC, *et al.* Studies in human malaria; the suppressive action of a phenanthrene amino alcohol, NIH-204 (SN-1796) against sporozoite-induced vivax malaria (St. Elizabeth strain). Am J Hyg. 1947 Jul;46(1):132-40.

Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell. 2006 Feb 24;124(4):755-66.

Craig AA, Kain KC. Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. J Infect Dis. 1996 Aug;174(2):373-9.

Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. Trends Parasitol. 2003 May;19(5):220-6.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online. 2007 Feb 23;1:47-50.

Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. J Infect Dis. 2007 Apr 15;195(8):1218-26.

Garnham PC. Swellengrebel lecture. Hypnozoites and 'relapses' in *Plasmodium vivax* and in vivax-like malaria. Trop Geogr Med. 1988 Jul;40(3):187-95.

Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium merozoites*. Int J Parasitol. 2004 Dec;34(13-14):1413-29.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1266-76.

Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, *et al*. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 3;4(8):e774.

Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Feb;104(1):67-73.

Havryliuk T, Orjuela-Sánchez P, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of multiple-clone infections. *Exp Parasitol*. 2008 Dec;120(4):330-6.

Huldén L, Huldén L, Heliövaara K. Natural relapses in vivax malaria induced by *Anopheles* mosquitoes. *Malar J*. 2008 Apr 22;7:64.

Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, *et al*. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol*. 2007 Jul;37(8-9):1013-22.

Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, Day NP, *et al*. Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol*. 2006 May;23(5):1016-8

Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, *et al*. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1;195(7):927-33.

Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes* 2007; 7: 172-175.

Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, *et al*. Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*. 2008 Feb 29;410(1):105-12.

Kim JR, Imwong M, Nandy A, Chotivanich K, Nontprasert A, Tonomsing N, *et al*. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata, India. *Malar J*. 2006 Aug 14;5:71.

Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis*. 1998 Feb;177(2):511-5.

Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, *et al*. Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis*. 2009 Apr 1;199(7):1074-80.

Krotoski WA, Krotoski DM, Garnham PC, Bray RS, Killick-Kendrick R, Draper CC, *et al*. Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. *Br Med J*. 1980 Jan 19;280(6208):153-4.

Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, *et al.* Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1982 Nov;31(6):1291-3.

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

Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, *et al.* Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 5;101(40):14455-60. Epub 2004 Aug 24.

Levine HD. Clinical aspects of malaria. In: Coates JB, Havens WP, Heaton LD, United States. Dept. of the Army. Office of the Surgeon General, United States. Army Medical Service. Historical Unit. Internal: Medicine in World War II. Washington, D.C. : Office of the Surgeon General, Dept. of the Army : For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O; 1963. P. 479-92. (Infectious Diseases, vol. II).

Lin JT, Bethell D, Tyner SD, Lon C, Shah NK, Saunders DL, *et al.* *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is associated with subsequent *Plasmodium vivax* relapse after treatment. *PLoS One.* 2011 Apr 20;6(4):e18716.

Manson PT. Experimental Malaria: Recurrence after Nine Months. *Br Med J.* 1901 Jul 13;2(2115):77.

Mclester, J.B. Relapsing malaria. *M Bull Mediterranean Theat* 1945; Op 3: 111-113

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

Miller LH, Greenwood B. Malaria--a shadow over Africa. *Science.* 2002 Oct 4;298(5591):121-2.

Mons B. Preferential invasion of malarial merozoites into young red blood cells. *Blood Cells.* 1990;16(2-3):299-312.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009 Sep;9(9):555-66.

Oh SS, Chishti AH. Host receptors in malaria merozoite invasion. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;295:203-32.

Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Dec;81(6):961-8.

Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ. The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol.* 1980 Jun;45(2):285-95.

Pukrittayakamee S, Imwong M, Chotivanich K, Singhasivanon P, Day NP, White NJ. A comparison of two short-course primaquine regimens for the treatment and radical cure of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Apr;82(4):542-7.

Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop.* 2011 Jul;119(1):23-9.

Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ, Souza JM, Couto AD, Carvalho LH, Brito CF. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health.* 2010 Jun;15(6):718-26.

Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet.* 1989 Nov 18;2(8673):1183-4.

Russell B, Suwanarusk R, Lek-Uthai U. *Plasmodium vivax* genetic diversity: microsatellite length matters. *Trends Parasitol.* 2006 Sep;22(9):399-401. Epub 2006 Jul 11.

Shute PG, Lupascu G, Branzei P, Maryon M, Constantinescu P, Bruce-Chwatt LJ, *et al.* A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the prepatent period. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976;70(5-6):474-81.

Sinden RE. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol.* 2002 Nov;4(11):713-24.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.

Thayer WS: Lectures on the malarial fevers. Appleton 1897; New York, p326.

Van den Eede P, Erhart A, Van der Auwera G, Van Overmeir C, Thang ND, Hung le X, Anné J, D'Alessandro U. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Feb;82(2):223-7.

Véron V, Legrand E, Yrinesi J, Volney B, Simon S, Carme B. Genetic diversity of *msp3alpha* and *msp1_b5* markers of *Plasmodium vivax* in French Guiana. *Malar J.* 2009 Mar 11;8:40.

Wells TN, Burrows JN, Baird JK. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* 2010 Mar;26(3):145-51.

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

World Health Organization, World Malaria Report 2008. Geneva: WHO, 2008.

World Health Organization, World Malaria Report 2010. Geneva: WHO, 2010.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. Cell Microbiol. 2007 May;9(5):1215-22. Epub 2007 Jan 9. Erratum in: Cell Microbiol. 2007 Aug;9(8):2093.